

Université de Montréal

**Étude de l'impact de la grossesse sur l'hépatite
auto-immune dans un modèle expérimental murin**

par

Sara Bourbonnais

Département de Microbiologie 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

Septembre 2013

© Sara Bourbonnais, 2013

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :
**Étude de l'impact de la grossesse sur l'hépatite auto-immune
dans un modèle expérimental murin**

Présenté par :
Sara Bourbonnais

A été évalué par un jury composé par :

Dre Hélène Decaluwe, présidente-rapporteuse
Dr Fernando Alvarez, directeur de recherche
Dre Valérie Abadie, membre du jury

Résumé

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie chronique caractérisée par une destruction progressive du parenchyme hépatique par le système immunitaire. La majorité des patients atteints d'HAI sont des femmes (75% à 90% des cas). L'amélioration des traitements au cours des dernières années a permis à un grand nombre de ces femmes de devenir enceintes. Pendant la grossesse, une rémission spontanée de la maladie a pu être observée chez les femmes atteintes d'HAI. Cette rémission est temporaire et elle est généralement suivie d'une rechute suite à l'accouchement (*post-partum*). Les causes exactes de cette rémission associée à la grossesse et de la rechute *post-partum* ne sont pas connues à ce jour. Nous avons donc tenté de reproduire ces phénomènes dans un modèle murin d'HAI développé dans notre laboratoire, afin de déterminer les mécanismes possiblement impliqués.

Notre modèle d'HAI consiste en une xéno-immunisation de souris C57BL/6 avec les auto-antigènes impliqués dans l'HAI de type 2 chez l'humain. Nous avons ainsi accouplées des souris préalablement xéno-immunisées, puis nous les avons sacrifiées au début de la 3^e semaine de gestation ou 2 à 3 semaines *post-partum*, afin d'évaluer les dommages hépatiques et afin d'étudier la réponse immunitaire. Comme chez les femmes atteintes d'HAI, les souris présentent une rémission de la maladie pendant la grossesse. Nous en sommes venus à cette conclusion par l'observation d'une diminution de l'inflammation hépatique, des niveaux de transaminases sériques et des titres d'auto-anticorps circulants. À l'inverse des humains, les souris xéno-immunisées ne présentent pas de rechute *post-partum*. Une analyse des cellules régulatrices (cellules T régulatrices et cellules B productrices d'IL-10) suggère une implication des Tregs hépatiques dans la rémission, car ceux-ci sont augmentés pendant la gestation. Ces Tregs hépatiques sont majoritairement d'origine thymique et ne semblent pas particulièrement attirés au foie en réponse à l'inflammation. La polarisation T_H2 est un phénomène connu pendant la grossesse, par contre elle ne semble pas influencer la réponse auto-immune dans nos souris. Une meilleure compréhension des mécanismes d'immunosuppression observés lors de la grossesse pourrait mener au développement d'une thérapie mieux ciblée.

Mots-clés : Auto-immunité, tolérance immunitaire, hépatite auto-immune, foie, grossesse, gestation, *post-partum*, fœtus, hormones, lymphocytes T régulateurs.

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a disease of unknown aetiology, characterized by a progressive destruction of the hepatic parenchyma by the immune system. Women are predominantly affected by AIH, with a prevalence of 75% in type 1 AIH and 90% in type 2. Improvement of treatments to control liver inflammation has contributed to increase the number of pregnant patients. During pregnancy, a spontaneous, but temporary, remission of the disease has been observed in women with AIH, often followed by *post-partum* relapse. Currently, this phenomenon is not fully understood. Thus, we aim to study the mechanisms responsible for the pregnancy-related remission and *post-partum* relapses in a murine model of AIH developed in our laboratory.

Xenoimmunization of C57BL/6 mice with the antigens recognized by autoreactive cells of type 2 AIH patients results in a loss of tolerance, with clinical and biochemical features of AIH similar to those observed in patients. For this study, xenoimmunized mice were mated and sacrificed at the beginning of the 3rd week of gestation or 2-3 weeks *post-partum*, and liver disease was evaluated at that time as well as the immune response. As it occurs in women with AIH, pregnancy induces a remission of the disease in our murine model. Pregnant mice show a decrease of liver inflammation, ALT levels and circulating autoantibodies. The mice did not show any sign of relapse during the *post-partum* period. Our analysis of cellular populations with regulatory properties (regulatory T cells and IL-10 secreting B cells) revealed an increase of hepatic Tregs during pregnancy, which suggests an implication of those cells in the remission. Those Tregs infiltrating the liver are mainly originated from the thymus and do not seem to be recruited to the liver in response to inflammation. Although a switch towards a T_H2 response is known to occur during pregnancy, this phenomenon does not seem to be implicated in the remission of AIH in our murine model. A better understanding of the natural immunosuppression occurring during pregnancy could bring important knowledge to design new and improved therapy for AIH.

Keywords : Autoimmunity, immune tolerance, autoimmune hepatitis, liver, pregnancy, *post-partum*, fetus, hormones, regulatory T cells

Table des matières

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	1
1.1.1 Le système immunitaire inné	1
1.1.2 Le système immunitaire adaptatif	2
1.2 LA TOLÉRANCE IMMUNITAIRE	5
1.2.1 Tolérance centrale	5
1.2.2 Tolérance périphérique	6
1.3 L'AUTO-IMMUNITÉ	9
1.4 LE FOIE	10
1.5 L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE (HAI)	12
1.5.1 Historique	12
1.5.2 Hépatite auto-immune de type I	12
1.5.3 Hépatite auto-immune de type II	13
1.5.4 Auto-anticorps communs aux deux types d'HAI	13
1.5.5 Manifestations cliniques et diagnostic	14
1.5.6 Pathogénèse	18
1.5.7 Facteurs de prédispositions	18
1.5.8 Traitements	23
1.6 LES MODÈLES ANIMAUX D'HÉPATITE AUTO-IMMUNE	25
1.6.1 Modèle S-100	25
1.6.2 Modèle de dommage hépatique induit par la Concanavaline A	26
1.6.3 Souris SAP-IFN- γ	27
1.6.4 Souris invalidée pour le TGF- β (TGF- $\beta^{-/-}$)	27
1.6.5 Souris Alb/GP33	28
1.6.6 Souris exprimant un ligand spécifique du CD28 (scFv)	28
1.6.7 Souris TTR-NP	29
1.6.8 Modèle par xéno-immunisation avec le plasmide pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD	30
1.6.9 Modèles basés sur l'utilisation d'un vecteur adénovirus	32
1.7 LE SYSTÈME IMMUNITAIRE PENDANT LA GROSSESSE	33
1.7.1 Modulation de la réponse immunitaire lors de la grossesse	33
1.7.2 Mécanismes de tolérance envers le fœtus	34

1.7.3 Effet des hormones associées à la grossesse	36
1.7.4 Effets de l'immunomodulation associée à la grossesse sur les maladies auto-immunes	38
1.8 OBSERVATIONS RAPPORTÉES CHEZ LA FEMME ENCEINTE ATTEINTE D'HÉPATITE AUTO-IMMUNE	40
1.9 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	42
1.9.1 Hypothèse.....	42
1.9.2 Objectifs	42
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE	43
2.1 MODÈLE MURIN D'HAI DE TYPE II	43
2.2 SUIVI DES MARQUEURS D'HAI DE TYPE II.....	43
2.2.1 Mesure des niveaux d'enzymes hépatiques de type transaminases en circulation	43
2.2.2 Mesure des anticorps et des auto-anticorps.....	44
2.2.3 Mesure des IgG totaux et détermination des isotypes.....	47
2.3 ACCOUPLEMENT DES SOURIS.....	48
2.4 SACRIFICE DES SOURIS.....	49
2.5 HISTOLOGIE DU FOIE.....	49
2.6 ÉTUDE DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE	50
2.6.1 Identification des cellules T _H 1 et T _H 2	51
2.6.2 Analyse des lymphocytes T régulateurs.....	53
2.6.3 Test de lymphoprolifération.....	54
2.6.4 Détermination des niveaux d'interleukine-10 (IL-10)	55
2.6.5 Détermination du pourcentage de cellules B productrices d'interleukine-10 (B10).....	56
2.6.6 Mesure du niveau d'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines au foie par PCR semi-quantitatif	56
2.7 ANALYSE STATISTIQUE.....	59
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	60
3.1 EFFET DE LA GESTATION SUR L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE.....	60
3.1.1 Comparaison de l'inflammation hépatique des souris HAI gestantes par rapport aux souris non-gestantes	60
3.1.2 Détermination des niveaux de transaminases (ALT)	62
3.2 DÉTERMINATION DES NIVEAUX D'ANTICORPS	62
3.2.1 Détermination des niveaux d'auto-anticorps (anti-FTCD murine) en circulation	62
3.2.2 Détermination de la concentration en IgG totaux circulants.....	63

3.2.3 Détermination des ratios IgG1/IgG2c pour les IgG totaux	64
3.3 POLARISATION DE LA RÉPONSE IMMUNITAIRE T _H 1 À T _H 2	65
3.3.1 Production de cytokines T _H 1 et T _H 2	65
3.3.2 Expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3	67
3.4 LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS (TREGS)	68
3.4.1 Détermination des pourcentages de lymphocytes T régulateurs	68
3.4.2 Caractérisation des lymphocytes T régulateurs	69
3.5 LYMPHOPROLIFÉRATION	72
3.6 PRODUCTION D'IL-10 PAR LES CELLULES INCUBÉES AVEC LA PROTÉINE CYP2D6-FTCD	73
3.7 POURCENTAGES DE CELLULES B PRODUCTRICES D'INTERLEUKINE-10 (B10)	74
3.8 NIVEAUX D'EXPRESSION DE MOLÉCULES D'ADHÉSION ET CHIMIOKINES PAR LES CELLULES DU FOIE	75
3.8.1 Expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et VAP-1	75
3.8.2 Expression des chimiokines CXCL9 (MIG) et CXCL10 (IP-10)	75
3.9 ÉVOLUTION DE L'HAI APRÈS L'ACCOUCHEMENT (POST-PARTUM)	77
3.10 COMPARAISON DE PARAMÈTRES ASSOCIÉS À LA GROSSESSE ENTRE SOURIS SAINES ET SOURIS HAI	78
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	79
4.1 LA GROSSESSE INDUIT UNE RÉMISSION DE L'HAI DANS LE MODÈLE MURIN D'HAI	80
4.2 LA RECHUTE POST-PARTUM N'EST PAS REPRODUITE DANS LES SOURIS XÉNO-IMMUNISÉES	80
4.3 LES AUTO-ANTICORPS CIRCULANTS SONT DIMINUÉS PENDANT LA GROSSESSE	81
4.4 LA POLARISATION T _H 2	83
4.5 L'AUGMENTATION DES TREGS : UN MÉCANISME POSSIBLEMENT IMPLIQUÉ DANS LA RÉMISSION DE L'HAI PENDANT LA GROSSESSE	85
4.6 AUTRES POPULATIONS DE CELLULES RÉGULATRICES	88
4.7 LE POTENTIEL DE PROLIFÉRATION DES LYMPHOCYTES FACE À L'AUTO-ANTIGÈNE N'EST PAS AFFECTÉ PENDANT LA GROSSESSE	90
4.8 L'EXPRESSION DES MOLÉCULES PERMETTANT LE RECRUTEMENT DES LYMPHOCYTES AU FOIE N'EST PAS MODIFIÉE PENDANT LA GROSSESSE	91
4.9 L'HAI AFFECTE LA REPRODUCTION DES SOURIS	91
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	94

Liste des tableaux

TABLE I : MAI SPÉCIFIQUES D'ORGANE ET SYSTÉMIQUES, LES ORGANES CIBLÉS ET LEUR MÉCANISME	9
TABLE II : CARACTÉRISTIQUES DISTINCTIVES DE L'HAI DE TYPE I ET DE TYPE II.....	13
TABLE III : ÉCHELLE DE SCORE HISTOLOGIQUE ISHAK	15
TABLE IV : GRILLE DE SCORE POUR LE DIAGNOSTIC DE L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE.....	17
TABLE V: SÉQUENCES DES AMORCES UTILISÉES POUR LES RT-PCR SEMI-QUANTITATIFS, TEMPÉRATURE D'HYBRIDATION, NOMBRE DE CYCLES DE DÉNATURATION-HYBRIDATION-ÉLONGATION ET TAILLE DU FRAGMENT AMPLIFIÉ.	58
TABLE VI: PARAMÈTRES ASSOCIÉS À LA GROSSESSE NOTÉS CHEZ DES SOURIS C57BL/6 SAINES ET CHEZ LES SOURIS C57BL/6 HAI.....	78

Liste des figures

FIGURE 1 : SINUSOÏDE HÉPATIQUE ..	11
FIGURE 2 : VARIATIONS HORMONALES OBSERVÉES PENDANT LA GROSSESSE ..	36
FIGURE 3 : SCHÉMATISATION DU PROTOCOLE D'EXPÉRIMENTATION POUR L'ÉTUDE DE L'IMPACT DE LA GROSSESSE SUR L'HAI.....	48
FIGURE 4: INFILTRATIONS LYMPHOCYTAIRES AU NIVEAU DU FOIE DES SOURIS HAI	60
FIGURE 5: SCORES HISTOLOGIQUES ATTRIBUÉS AUX SOURIS HAI PAR LA MÉTHODE ISHAK SELON LE DEGRÉ D'INFLAMMATION	61
FIGURE 6: NIVEAUX D'ALT MESURÉS CHEZ LES SOURIS HAI.....	62
FIGURE 7: TITRES D'AUTO-ANTICORPS DANS LE SÉRUM DES SOURIS HAI ..	63
FIGURE 8: CONCENTRATION D'IGG TOTAUX DANS LE SÉRUM DES SOURIS	64
FIGURE 9: RATIO EN IGG1/IGG2C DES IGG TOTAUX DANS LE SÉRUM DES SOURIS	65
FIGURE 10: POURCENTAGE DE CELLULES CD4 POSITIVES PRODUISANT DE L'IL-4, DE L'IL-10, DE L'IL-2 ET DE L'IFN- γ PARMIS LES LYMPHOCYTES ISOLÉS DE LA RATE ET DU FOIE DES SOURIS HAI NON-GESTANTES ET HAI GESTANTES	66
FIGURE 11: EXPRESSION RELATIVE DE T-BET ET GATA-3 DANS LES LYMPHOCYTES ISOLÉS DE LA RATE DES SOURIS HAI.....	67
FIGURE 12: POURCENTAGES DE LYMPHOCYTES T RÉGULATEURS (CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ PARMIS CD4 ⁺)	68
FIGURE 13: POURCENTAGES DE TREGS THYMIQUES (HELIOS ⁺)	69
FIGURE 14: POURCENTAGE DE TREGS EXPRIMANT CXCR3 ..	70
FIGURE 15: POURCENTAGE DE TREGS EN DIVISION (KI67 ⁺) ET POURCENTAGE DE TREGS PRODUISANT DU TGF- β	71
FIGURE 16: LYMPHOPROLIFÉRATION DES CELLULES CD4 ⁺ , CD8 ⁺ ET CD19 ⁺ DE RATE EN PRÉSENCE DE L'AUTO-ANTIGÈNE	72
FIGURE 17: PRODUCTION D'IL-10 PAR LES LYMPHOCYTES CULTIVÉS EN PRÉSENCE DE LA PROTÉINE CHIMÉRIQUE CYP2D6-FTCD.....	73
FIGURE 18: POURCENTAGES DE CELLULES B10	74

FIGURE 19: NIVEAUX D'EXPRESSION DES MOLÉCULES D'ADHÉSION ICAM-1, VCAM-1 ET VAP-1 ET DE CHIMIOKINES MIG ET IP-10	76
FIGURE 20: ÉVOLUTION DE L'HAI CHEZ LES SOURIS HAI EN PÉRIODE <i>POST-PARTUM</i>	77
FIGURE 21 : SCHÉMA RÉSUMANT LES EFFETS DE LA GROSSESSE SUR L'HÉPATITE AUTO-IMMUNE, DANS NOTRE MODÈLE MURIN D'HAI PAR XÉNO-IMMUNISATION	93

Abréviations

ADCC :	« Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (Cytotoxicité dépendante des anticorps)
ADN :	Acides désoxyribonucléiques
AIRE :	« Autoimmune regulator » (Régulateur de l'auto-immunité)
ALT :	Alanine aminotransférase
ANA :	« Anti nuclear antibodies » (Anticorps anti-noyaux)
APECED :	« Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy »
AR :	Arthrite rhumatoïde
ARN :	Acides ribonucléiques
ASGP-R :	Récepteur de l'asialoglycoprotéine
AST :	Aspartate aminotransférase
BCR :	« B-cell receptor » (Récepteur des cellules B)
BrdU :	Bromodésoxyuridine
CD4:	« Cluster of differentiation 4 »
CD8:	« Cluster of differentiation 8 »
CD19:	« Cluster of differentiation 19 »
CD25:	« Cluster of differentiation 25 »
CFSE :	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMH :	Complexe d'histocompatibilité majeur
CMH I :	Complexe d'histocompatibilité majeur de classe 1
CMH II :	Complexe d'histocompatibilité majeur de classe 2

ConA :	Concanavaline A
CPA :	Cellule présentatrice d'antigènes
CTL :	« Cytotoxic T lymphocyte » (Lymphocyte T cytotoxique)
CTLA-4 :	« Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 » (Antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques)
CYP2D6 :	Cytochrome P450 2D6
DC :	Cellule dendritique
D.O. :	Densité optique (absorbance)
EAE :	« Experimental autoimmune encephalitis » (Encéphalite auto-immune expérimentale)
ELISA :	« Enzyme-linked immunosorbent assay » (Dosage d'immunosorption lié à l'enzyme)
EBV :	Virus Epstein-Barr
Foxp3 :	« Forkhead box P3 »
FTCD :	Formiminotransférase cyclodésaminase
GP-33 :	Glycoprotéine 33
HAI :	Hépatite auto-immune
HBsAg :	Petit antigène de surface de l'hépatite B
HHV-6 :	« Human herpes virus 6 » (Virus de l'herpès humain 6)
HLA :	« Human leukocyte antigen » (Antigène de leucocyte humain)
ICAM-1 :	« Intercellular adhesion molecule 1 » (Molécule d'adhésion intercellulaire 1)
IgG :	Immunoglobuline de type G
IL-2 :	Interleukine-2

IL-4 :	Interleukine-4
IL-5 :	Interleukine-5
IL-6 :	Interleukine-6
IL-10 :	Interleukine-10
IL-17 :	Interleukine-17
IFN- γ :	Interféron-gamma
IP-10 :	« Interferon-gamma-inducible protein 10 » (Protéine induite par l'interféron-gamma 10)
JPC :	Jour(s) post-conception
LC1 :	« Liver cytosol type 1 » (Antigène cytosolique du foie 1)
LCMV :	« Lymphocytic Choriomeningitis Virus » (Virus de la chorioméningite lymphocytaire)
LED :	Lupus érythémateux disséminé
LKM1 :	« Liver kidney microsome type 1 » (Antigène microsomique du foie et des reins 1)
LSEC :	« Liver sinusoidal endothelial cell » (Cellule endothéliale sinusoidale hépatique)
MAI :	Maladie auto-immune
MIG :	« Monocyte induced by interferon gamma » (Monocyte induit par l'interféron-gamma)
mFTCD :	Formiminotransférase cyclodésaminase murine
MMF :	Mycophenolate mofetil
NK :	« Natural killer cell »
p-ANCA :	« Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies » (Anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques périnucléaires)

- PCR : « Polymerase chain reaction »
(Réaction en chaîne par polymérase)
- PP : *Post-partum*
(Après accouchement)
- qPCR : PCR quantitatif
- RT-PCR : « Reverse transcriptase polymerase chain reaction»
(Réaction en chaîne par polymérase précédée d'une transcriptase inverse)
- pTreg : Lymphocyte T régulateur périphérique
- SEP : Sclérose en plaques
- SMA : « Smooth muscle antibodies »
(Anticorps anti-muscles lisses)
- SNP : « Single nucleotide polymorphism »
(Polymorphisme nucléotidique)
- TCR : « T-cell receptor »
(Récepteur des lymphocytes T)
- TGF- β : « Tumor growth factor beta »
(Facteur de croissance tumorale beta)
- Tim-3 : « T cell immunoglobulin and mucin domain 3 »
(Domaine 3 analogue des immunoglobulines et mucines associé aux cellules T)
- Tol-DC : Cellules dendritiques tolérogéniques
- Treg : Lymphocyte T régulateur
- tTreg : Lymphocyte T régulateur thymique
- VAP-1 : « Vascular adhesion protein-1 »
(Protéine vasculaire d'adhésion 1)
- VCAM-1 : « Vascular cell adhesion protein-1 »
(Protéine vasculaire d'adhésion cellulaire 1)

VDR : « Vitamin D receptor »
(Récepteur de vitamine D)

VHC: Virus de l'hépatite C

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Fernando Alvarez, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Ses précieux conseils et son support constant tout au long de ma maîtrise ont grandement contribué à l'accomplissement de ce projet et m'ont permis de garder un esprit positif face aux obstacles rencontrés.

J'aimerais également remercier mes deux collègues de laboratoire, Kathie Béland et Gabriel Marceau, qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche et qui ont su à plusieurs moments me donner des conseils qui m'ont été d'une grande utilité. Grâce à eux, j'ai eu la chance de travailler dans un laboratoire avec une ambiance amicale où tous priorisent le travail d'équipe. Merci gang!

Je remercie aussi ma famille et mes amis pour m'avoir soutenu tout au long de mes études, ainsi que mon conjoint, pour son encouragement pendant mes années de maîtrise et pour m'avoir dit que j'étais "la meilleure" dans les moments plus difficiles. Merci à Jean-Philippe Provost pour ses conseils de rédaction.

Finalement j'aimerais remercier tous les gens du centre de recherche du CHU Sainte-Justine pour l'agréable atmosphère qui y règne. Je garderai toujours un bon souvenir des années passées dans cet hôpital.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Le système immunitaire

Les microorganismes font partie de notre environnement. C'est pourquoi l'être humain possède plusieurs moyens de défense contre des agressions telles que les infections bactériennes, virales ou fongiques. L'entrée d'un pathogène dans un hôte humain est généralement limitée par la présence de barrières physiques, agissant comme premier mécanisme de défense. La peau est une barrière physique jouant un rôle majeur en bloquant l'entrée de microorganismes de l'environnement ou de la flore épidermique normale à l'intérieur d'un hôte. Les muqueuses (intestinales, uro-génitales ou oro-pharyngées) sont également d'importantes barrières assurant notre protection. Lorsque l'intégrité d'un de ces tissus est atteinte, par exemple lorsqu'il y a présence d'une plaie ouverte, une porte d'entrée vers l'intérieur de l'hôte devient accessible pour un potentiel pathogène. Lorsqu'une telle situation se produit, le système immunitaire doit intervenir de façon à restreindre la propagation de l'infection à travers le corps. Une réponse rapide et non-spécifique est alors nécessaire afin d'éliminer le plus rapidement possible le pathogène en circulation ou les cellules infectées. Il s'agit de la réponse immunitaire innée. Celle-ci précède la réponse immunitaire adaptative, qui est plus tardive, dont les cellules impliquées sont spécifiques à des composantes antigéniques du microorganisme et pour laquelle une certaine mémoire des cellules est possible.

1.1.1 Le système immunitaire inné

Lors de la réponse immunitaire innée, des cellules de type phagocytaire vont s'assurer de la capture de l'agent envahisseur. Ces phagocytes comprennent les neutrophiles, les monocytes et macrophages ainsi que les cellules dendritiques (DC). Celles-ci vont dégrader le pathogène en question, ce qui mène à sa mort. D'autre part, cette dégradation va également permettre l'apprêtement des antigènes par les phagocytes, qui sont également des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), principalement les macrophages et les DC. La migration de ces CPA vers les ganglions lymphatiques va permettre une éventuelle activation de la réponse immunitaire adaptative. Dans le cas d'une infection intracellulaire, par exemple une infection virale, des

cellules « Natural Killer » (NK) vont intervenir à titre de réponse innée afin d'éradiquer les cellules infectées. Les NK ont en fait le potentiel d'éliminer toute cellule présentant un phénotype anormal, ce qui leur confère aussi un rôle important dans l'élimination de cellules cancéreuses.

1.1.2 Le système immunitaire adaptatif

La réponse immunitaire adaptative survient lorsque les CPA migrent vers les ganglions lymphatiques qui constituent les sites où elles entrent en contact avec des lymphocytes naïfs (T et B), c'est-à-dire des lymphocytes matures n'ayant pas encore rencontré d'antigène. Le contact entre les CPA et les lymphocytes à ces endroits va permettre l'activation de ces derniers par la présentation antigénique. Plus spécifiquement, l'interaction entre le complexe d'histocompatibilité majeur (CMH) portant le peptide antigénique exprimé à la surface des CPA et le récepteur des lymphocytes T (TCR) induit l'activation des lymphocytes.

La présentation d'antigènes intracellulaires (tels que des virus et certaines bactéries intracellulaires) se fait par le CMH de classe I (CMHI) aux lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD8. Ces lymphocytes T une fois activés sont également nommés lymphocytes T cytotoxiques (CTL) puisqu'ils ont la capacité d'éliminer les cellules infectées. Les CTL peuvent éradiquer les cellules cibles par différents mécanismes menant à l'apoptose, tels que la production de perforine et de granzyme ainsi que l'expression du Fas ligand.

La présentation d'antigènes extracellulaires se fait par le CMH de classe II (CMHII) aux lymphocytes T exprimant le co-récepteur CD4. Ces cellules sont nommées lymphocytes T auxiliaires et vont favoriser l'activation des cellules nécessaires à l'élimination de l'antigène extracellulaire, telles que les CTL, les lymphocytes B et les macrophages.

L'activation des lymphocytes B se fait par la liaison de leurs immunoglobulines liées à la membrane (BCR) avec l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, sans passer par le biais d'une cellule présentatrice d'antigène. Suite à la liaison du BCR à un antigène, la cellule B peut dégrader l'antigène lié afin de présenter le fragment résultant aux cellules T auxiliaires. Ces cellules T auxiliaires activées permettent le maintien de la réponse humorale afin qu'il y ait une différenciation des cellules B en cellules mémoires ou en plasmocytes, c'est-à-dire des

cellules B sécrétrices d'anticorps. Les anticorps produits peuvent être divisés en cinq classes ou isotypes, soit les IgM, les IgD, les IgG, les IgA et les IgE. Lorsqu'une cellule se différencie en plasmocyte, celle-ci produit en premier lieu des IgM. Suite à la commutation de classe, elle acquiert la capacité de produire des anticorps d'isotypes différents en fonction du contexte inflammatoire, tout en gardant sa spécificité pour l'antigène. La production d'IgA sera entre autres favorisée lorsqu'une réponse immunitaire est requise au niveau des muqueuses, tandis que les IgE sont associés aux réactions allergiques. Le long temps de demi-vie des IgG en fait un des isotypes prédominant en circulation et au niveau des tissus.

Enfin, les lymphocytes T auxiliaires peuvent se différencier en plusieurs sous-types (T_H1 , T_H2 , T_H17 , Tregs), en fonction des cytokines présentes dans l'environnement inflammatoire créé par les cellules de la réponse innée et selon le type de réponse immunitaire nécessaire.

1.1.2.1 Les sous-types de lymphocytes T auxiliaires

La présence d'interleukine-12 (IL-12) favorise la différenciation des lymphocytes T auxiliaires en cellules T_H1 , soit des cellules productrices d'interféron-gamma (IFN- γ). L'interaction entre l'IFN- γ produit par la cellule et son propre récepteur déclenche l'activation d'une voie de signalisation intracellulaire de type JAK/STAT, induisant l'expression du facteur de transcription T-bet, typiquement exprimé par les cellules de type T_H1 [1]. Ce facteur de transcription augmente l'expression génique des cytokines produites par les cellules T_H1 , essentiellement l'IFN- γ et de l'IL-2. Les cellules T_H1 sont impliquées dans la réponse immunitaire cellulaire, c'est-à-dire la réponse impliquant les CTL. Un rôle important leur est donc associé lors d'une infection par un virus ou une bactérie intracellulaire. Toutefois, ces cellules peuvent également être impliquées dans certaines maladies auto-immunes où les CTL générées sont auto-réactives.

Les cellules T_H2 favorisent plutôt la réponse immunitaire humorale, soit une réponse immunitaire impliquant les anticorps. En présence d'IL-4, les lymphocytes T auxiliaires se différencient en cellules T_H2 , suite à l'induction de l'expression du facteur de transcription GATA-3 [2]. Ce facteur de transcription induit à son tour l'expression de gènes des cytokines produites par les cellules T_H2 . Ces cellules produisent communément les cytokines IL-4, IL-5 et IL-10. La réponse humorale s'avère ainsi importante contre des composantes

extracellulaires, par exemple lors d'une infection par une bactérie extracellulaire, mais peut aussi être impliquée dans les maladies auto-immunes pour lesquelles une production d'auto-anticorps pathologiques est observée.

Les cellules T_H17 sont, pour leur part, associées à la réponse inflammatoire. Bien que ces cellules soient utiles lors de certaines infections, elles sont également impliquées dans plusieurs maladies auto-immunes. En présence de TGF- β (*tumor growth factor beta*) et d'IL-6, les lymphocytes T auxiliaires peuvent se différencier en cellules T_H17 , exprimant le facteur de transcription ROR γ T et produisant de l'IL-17 [3].

Les lymphocytes T CD4 positifs peuvent également se différencier en cellules T régulatrices (Tregs) afin d'atténuer la réponse immunitaire. En présence de TGF- β et lorsqu'une réponse immunitaire est en place et s'avère non-nécessaire ou aberrante, par exemple lorsque l'infection a été résolue ou lorsqu'il y a présence de cellules réactives contre des antigènes du soi, les lymphocytes T auxiliaires peuvent se différencier en Tregs. Ces cellules expriment le facteur de transcription Foxp3, le récepteur de l'IL-2 CD25 et peuvent produire des cytokines régulatrices telles que TGF- β et IL-10 [4]. Récemment il a été montré que ces cellules peuvent être d'origine thymique (tTregs) ou induits en périphérie (pTregs) en présence de TGF- β [5]. Plusieurs études sont en cours afin de trouver des marqueurs permettant de différencier ces deux types de Tregs. À ce jour, le facteur de transcription helios est un des marqueurs les plus utilisés. Celui-ci est exprimé dans les tTregs mais absent dans la majorité des pTregs [6]. Les tTregs seraient en général spécifiques aux antigènes du soi avec un grand potentiel suppresseur tandis que les pTregs seraient spécifiques à des antigènes provenant de l'extérieur et seraient moins suppresseurs que les tTregs [7, 8].

1.2 La tolérance immunitaire

Lorsqu'une réponse immunitaire est engendrée chez un individu, celle-ci doit être dirigée contre le pathogène ou l'élément agresseur. Toutefois, elle ne doit pas réagir contre les cellules de l'individu. Dans le cas échéant, la reconnaissance d'antigènes du soi par les cellules immunitaires peut mener au développement de maladies auto-immunes. Il est donc primordial que le système immunitaire parvienne à faire une distinction entre le soi et le non-soi. Différents mécanismes de tolérance sont ainsi mis en place afin d'éliminer les cellules auto-réactives produites.

1.2.1 Tolérance centrale

Les lymphocytes B et T sont générés dans moelle osseuse (et dans le foie fœtal pour les cellules B). La maturation des cellules B se fait dans la moelle osseuse, tandis que la maturation des cellules T se fait dans le thymus. La maturation des lymphocytes T est donc possible après qu'il y ait eu migration des précurseurs, originaires de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, vers le thymus. La maturation des lymphocytes à ces deux sites a pour but de générer un répertoire de cellules B et T dont les récepteurs sont capables de reconnaître plusieurs épitopes, grâce à la recombinaison somatique, afin de générer la réponse humorale ou cellulaire nécessaire pour éliminer le pathogène en question.

Dans le thymus, à mesure qu'il y a maturation des lymphocytes T, une sélection des cellules compétentes est effectuée, il s'agit de la sélection positive. Seuls les thymocytes qui sont capables de reconnaître les CMH sont conservés. Après avoir éliminé les cellules non-compétentes, une seconde sélection est effectuée afin d'éliminer les cellules qui reconnaissent les peptides du soi. On parle à cette étape de sélection négative qui a pour but d'éliminer les thymocytes qui ont le potentiel de devenir des lymphocytes auto-réactifs [9]. Ainsi, seulement les lymphocytes qui ont la capacité d'engendrer une réponse immunitaire, ne réagissant pas contre les antigènes du soi, sont conservés et pourront quitter le thymus. Dans la moelle osseuse, les lymphocytes B sont également soumis à un contrôle des cellules auto-réactives. Lorsqu'une cellule est auto-réactive, elle peut procéder à l'édition de son récepteur afin de ne plus reconnaître les antigènes du soi. Ce mécanisme se produit principalement pour les cellules B auto-réactives [9].

Afin d'éliminer les cellules auto-réactives au niveau des sites de maturation des lymphocytes, les antigènes du soi doivent être exprimés dans le thymus et par les cellules de la moelle osseuse. Le facteur de transcription AIRE (*autoimmune regulator*) est exprimé par les cellules épithéliales médullaires du thymus et régule l'expression des antigènes tissulaires du soi à cet endroit [10]. Le gène AIRE est ainsi nécessaire afin qu'il y ait une expression des antigènes du soi dans le thymus, reconnaissance par les clones auto-réactifs, puis délétion de ceux-ci. Une mutation de ce gène mène au syndrome APECED (*autoimmune polyendocrinopathy candidiasis-ectodermal dystrophy*), un syndrome auto-immun affectant plusieurs organes [11].

1.2.2 Tolérance périphérique

Les lymphocytes auto-réactifs peuvent parfois échapper aux mécanismes de tolérance centrale, par exemple lorsqu'il s'agit de lymphocytes reconnaissant des antigènes tissulaires qui ne sont pas exprimés dans le thymus. Ceux-ci doivent donc pouvoir être éliminés ou inactivés en périphérie, d'où l'importance des mécanismes de tolérances périphériques. Plusieurs de ces mécanismes sont essentiels afin de contrôler les cellules auto-réactives en périphérie et peuvent également être impliqués dans l'atténuation d'une réponse immunitaire qui n'est plus nécessaire, par exemple lorsqu'une infection a été combattue. Parmi ces mécanismes se trouvent des facteurs intrinsèques, présents sur les lymphocytes, et des facteurs extrinsèques, nécessitant l'implication de cellules ayant des propriétés tolérogéniques.

1.2.2.1 Facteurs intrinsèques

En absence de signal de co-stimulation fourni par les CPA, le lymphocyte se trouve dans un état inactif que l'on appelle anergie et qui s'avère être essentiel au maintien de la tolérance immunitaire. Des signaux inhibiteurs peuvent également être transmis pour limiter la prolifération cellulaire. Les molécules CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) et PD-1 (*program death-1*), exprimées à la surface des lymphocytes T, vont transmettre un signal inhibiteur à la cellule lorsqu'il y a liaison avec leur ligand B7 sur les CPA [12, 13].

La délétion d'une cellule est un autre mécanisme de tolérance périphérique permettant l'élimination des cellules auto-réactives. La molécule Fas est exprimée à la surface des lymphocytes et, lorsqu'elle s'engage avec son ligand (FasL), la mort par apoptose est induite, c'est-à-dire la mort programmée d'une cellule [14].

Certains sites sont peu accessibles pour les cellules immunitaires et celles-ci ne peuvent donc pas rencontrer l'antigène pour lequel elles sont spécifiques, ce qui empêche leur activation. Ce phénomène nommé « ignorance » se produit entre autre au niveau de l'œil, des testicules et du système nerveux central et il s'agit d'un moyen d'éviter l'activation de cellules auto-réactives.

1.2.2.2 Facteurs extrinsèques

Différentes sous-populations de cellules sont présentes en périphérie afin de limiter l'expansion des lymphocytes auto-réactifs. On retrouve entre autre dans cette catégorie de cellules les Tregs. Ces cellules $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ sont particulièrement importantes dans la prévention de l'auto-immunité. Un défaut en nombre ou en fonction de ces cellules semble être impliqué dans plusieurs maladies auto-immunes [15]. La mutation du gène FOXP3 mène d'ailleurs au développement d'un syndrome auto-immun généralisé nommé IPEX (*immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X linked*) [16]. Les individus portant cette mutation décèdent généralement en très bas âge suite au développement de diverses maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1 (T1D), l'entéropathie sévère, l'eczéma, l'anémie, la thrombocytopenie et l'hypothyroïdie [16]. Les Tregs agissent par différents mécanismes afin de supprimer la prolifération lymphocytaire, en agissant directement sur les lymphocytes (mécanismes directs) ou en agissant sur les CPA (mécanismes indirects).

Les mécanismes de suppression directs comprennent entre autre l'arrêt de la division cellulaire par des cytokines suppressives (IL-10, TGF- β , IL-35) ou par l'interaction de galectines avec leurs ligands [17]. Les Tregs pourraient également induire l'apoptose des lymphocytes par cytolysse, via la sécrétion de granzyme B ou par consommation de l'IL-2 grâce à leur forte expression du récepteur de l'IL-2 (CD25). Toutefois, ces mécanismes se sont avérés difficiles à prouver et sont encore quelque peu obscurs à ce jour [17].

Parmi les mécanismes de suppression indirects se trouve la diminution de la co-stimulation par les CPA via un blocage des molécules CD80 et CD86 grâce au CTLA-4 constitutivement exprimé par les Tregs [17]. Les Tregs peuvent également favoriser le maintien d'un phénotype immature des DC, par l'interaction de LAG-3 avec le CMHII, ou par contact prolongé entre les deux cellules via la neuropiline Nrp-1 [17].

Il est d'avis commun à ce jour que les Tregs ont un rôle majeur dans la tolérance immunitaire. Des populations cellulaires additionnelles ayant des propriétés régulatrices ont néanmoins été identifiées au cours des dernières années, dont plusieurs pourraient également contribuer au maintien de la tolérance. Parmi ces cellules régulatrices se trouvent les cellules dendritiques tolérogéniques (tol-DC) dont le rôle est primordial dans la tolérance périphérique. Les tol-DC ont un phénotype particulier, immature, afin de limiter l'activation de cellules effectrices [18]. Ces cellules expriment moins fortement les molécules de co-stimulation CD40, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) ainsi que le CMH, résultant en une présentation antigénique atténuée [19]. Elles expriment également de l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO), une enzyme impliquée dans la dégradation du tryptophane, menant à l'arrêt de la prolifération des lymphocytes environnants [20]. Les lymphocytes B produisant de l'IL-10 (cellules B10) sont également des cellules ayant des propriétés régulatrices. Grâce à la production de cette cytokine, les cellules B10 parviennent à réguler négativement la réponse immunitaire, entre autres en limitant la production des cytokines T_H1 et T_H17 , en atténuant l'activation des macrophages et en diminuant la présentation antigénique par les CPA [21-23].

1.3 L'auto-immunité

Malgré les mécanismes de tolérance existants, il arrive que des cellules auto-réactives se retrouvent en circulation, ce qui peut mener à une atteinte des organes exprimant les auto-antigènes reconnus par ces cellules. C'est ainsi que se développent les maladies auto-immunes (MAI), qui touchent entre 3 et 5% de la population mondiale [24]. Les cellules auto-réactives peuvent attaquer un seul organe lorsque l'antigène est localisé ou elles peuvent s'en prendre à de multiples organes lorsque l'expression de l'antigène est répandue dans le corps. On peut donc catégoriser ces maladies en MAI spécifique d'un organe ou en MAI systémique. Des exemples de maladies pour chacune de ces catégories sont présentés dans la Table I. Une seconde méthode de classification des MAI est selon le mécanisme à l'origine des dommages observés. Plus précisément, l'attaque immunitaire des organes exprimant les auto-antigènes peut être causé par des cellules auto-réactives ou par des auto-anticorps. Les CTL auto-réactifs mènent à la lyse des cellules cibles tandis que les auto-anticorps forment des complexes immuns qui se déposent dans certains organes et nuisent à leur fonctionnement. Bien qu'un seul mécanisme soit souvent directement responsable des dommages tissulaires, pour plusieurs MAI les deux mécanismes sont impliqués dans la réponse auto-immune.

Table I : MAI spécifiques d'organe et systémiques, les organes ciblés et le mécanisme responsable des dommages

Maladie	Organe(s) ou cellules ciblé(es)	Mécanisme(s)
Thyroidite de Hashimoto	Thyroïde	Cellules T
Gastrite	Estomac	Cellules T
Maladie de Grave	Thyroïde	Anticorps
Vitiligo	Mélanocytes	Cellules T/Ac
Diabète de type 1 (T1D)	Cellules β pancréatiques	Cellules T
Sclérose en plaque	Cerveau et moelle épinière	Cellules T
Pemphigus	Peau	Anticorps
Hépatite auto-immune (HAI)	Foie	Cellules T
Myasthénie gravis	Muscles	Anticorps
Cirrhose biliaire primitive (PBC)	Canaux biliaires	Cellules T
Arthrite rhumatoïde (AR)	Articulations, poumons, coeur	Anticorps
Lupus érythémateux disséminé (LED)	Peau, articulations, reins, cerveau, poumons, coeur	Anticorps
Polymyosite/Dermatomyosite	Muscle squelettique, poumons, cœur, articulations	Cellules T/Ac

MAI spécifiques d'organe MAI systémiques Ac : Anticorps (Table inspirée de P.Marrack *et al.*, 2001)[24]

1.4 Le foie

Le foie est un organe connu pour ses fonctions métaboliques, de détoxification et de stockage. Toutefois, il a également un rôle important dans la tolérance orale. Puisque 75% de l'apport sanguin du foie provient de la rate et de l'intestin, celui-ci entre constamment en contact avec des antigènes alimentaires et bactériens. Il est donc primordial que des mécanismes de tolérance immunitaire soient présents dans le foie, afin qu'il ne réagisse pas contre ces antigènes du non-soi, mais il doit par contre être apte à se défendre contre des pathogènes potentiels.

Le foie est constitué de plusieurs types de cellules. La majorité des cellules constituant cet organe sont des hépatocytes, qui correspondent à 60% des cellules hépatiques. On y retrouve également des cellules endothéliales (LSEC), des macrophages résidents nommés cellules de Kupffer, des cellules de l'épithélium biliaire nommées cholangiocytes, ainsi que des cellules en forme étoilée nommées cellules Ito. Ces cellules forment les sinusoides hépatiques permettant la circulation des lymphocytes, des DC, des cellules NK et NKT (Figure 1). La présence de pores fenestrées dans les cellules endothéliales permet l'interaction entre les cellules immunitaires et les hépatocytes. Entre les hépatocytes et les LSEC se trouve l'espace de Disse où sont localisées les cellules Ito impliquées dans le stockage de la vitamine A et la synthèse du collagène [25].

Les populations de cellules immunitaires infiltrant le foie diffèrent en proportions par rapport au sang périphérique. Contrairement au sang où l'on retrouve 38% de lymphocytes CD8⁺ et 60% de CD4⁺, le foie présente 72% de CD8⁺ et 22% de CD4⁺. Les cellules NK et NKT sont également présentes en plus grande proportion dans le foie que dans le sang, soit 31% de NK hépatiques et 26% de NKT hépatiques comparativement à 13% de NK et 5% de NKT dans le sang périphérique [25].

Les LSEC expriment à leur surface les molécules d'adhésion VCAM-1 (*vascular adhesion molecule 1*), ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule 1*) et VAP-1 (*vascular adhesion protein 1*), ce qui permet la rétention au foie des lymphocytes traversant les sinusoides hépatiques [26]. ICAM-1 est également exprimé sur le prolongement des hépatocytes [27]. Lorsque le foie est inflammé, une surexpression des molécules d'adhésion se produit. Les

lymphocytes activés se lient à ICAM-1 via LFA-1 et à VCAM-1 via l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. En plus des molécules d'adhésion, diverses chimiokines sont exprimées au niveau du foie lorsqu'il y a une infection ou une réaction auto-immune, ce qui permet l'attraction des lymphocytes vers ce site. Par exemple, les chimiokines CXCL9 (ou MIG, « *monocyte induced by interferon gamma* ») et CXCL10 (ou IP-10, « *interferon gamma induced protein 10* ») deviennent surexprimées lorsqu'il y a une inflammation au foie engendrée par une réaction auto-immune et les cellules exprimant le récepteur de ces chimiokines, CXCR3, sont présentes en plus grand nombre [26]. Les chimiokines RANTES se lient au CCR5 ainsi que CXCL12 dont le récepteur est CXCR4 peuvent également être exprimés dans certains contextes d'inflammation hépatique [26].

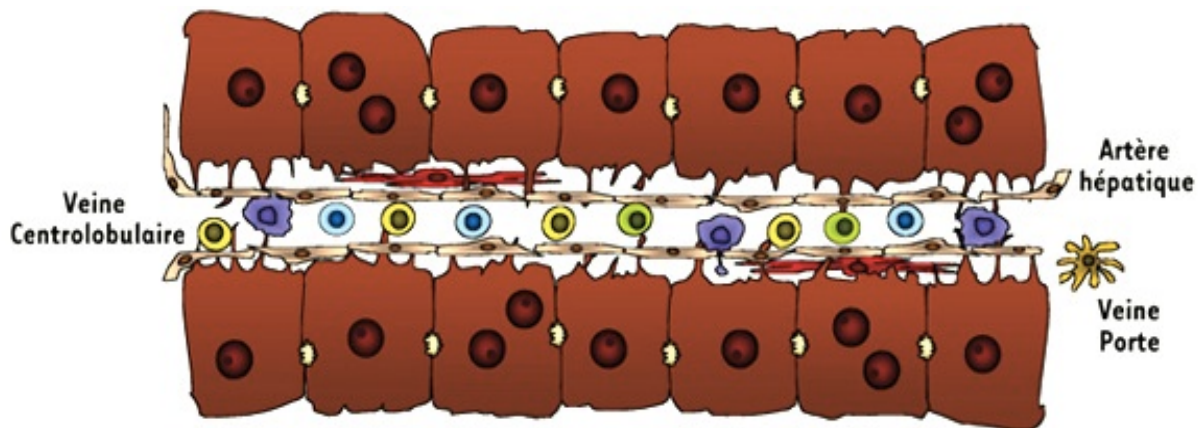


Figure 1 : Sinusoié hépatique. Ces capillaires sont formés par des hépatocytes (brun), des cellules endothéliales LSEC (beige) au travers desquelles se positionnent les cellules de Kupffer (violet). Entre ces deux couches de cellules se trouve l'espace de Disse, où sont localisées les cellules Ito (rouge). Dans la lumière du sinusoié circulent les lymphocytes T (bleu), les cellules NK (jaune) et les NKT (vert). Figure adaptée de P. Lapierre et al., 2007 [25].

1.5 L'hépatite auto-immune (HAI)

1.5.1 Historique

Dès les années 1940, des médecins rapportent des cas d'inflammation hépatique chronique, donnant naissance au terme hépatite active chronique, qui fut la première appellation utilisée pour désigner les hépatites auto-immunes telles que dénommées à ce jour. Le concept d'auto-immunité étant récent à l'époque, les médecins attribuent d'abord cette inflammation à une infection hépatique non-résolue ou à une séquelle d'infections antérieures plutôt qu'à une manifestation auto-immune. Dans les années 1950, le Dr Jan Gösta Waldenström décrit ces cas plus en détails et met en évidence la prépondérance de cette condition chez les femmes, caractérisée par une hypergammaglobulinémie et la présence d'infiltrations de cellules plasmatiques dans le foie [28]. Des auto-anticorps sont ensuite identifiés chez ces patients dans les années 1960. C'est à cette époque que le Dr Ian McKay introduit à cette époque le terme hépatite lupoïde pour désigner la maladie. Ce n'est qu'en 1965 que l'on commence à attribuer le nom d'hépatite auto-immune (HAI) à la pathologie [28].

1.5.2 Hépatite auto-immune de type I

Il existent deux types d'hépatite auto-immune qui se distinguent par les auto-anticorps présents dans la circulation. Les patients atteints d'HAI de type I présentent des anticorps nommés SMA (*anti-smooth muscle autoantibodies*) ainsi que des ANA (*anti-nuclear autoantibodies*). Les anticorps SMA reconnaissent comme cible antigénique les filaments d'actines se trouvant entre autres dans le cytosquelette des cellules et dans les fibres musculaires [29]. Les anticorps ANA reconnaissent des composantes du noyau des cellules telles que les histones, les centromères et les ribonucléoprotéines [30].

L'HAI est une maladie qui se manifeste généralement à l'enfance. Dans 40% des cas d'HAI de type I le diagnostic se fait avant l'âge de 18 ans avec un âge moyen au moment du diagnostic de 10 ans [31]. La prépondérance de la maladie chez les femmes s'observe à un ratio de 3 à 4 femmes atteintes pour 1 homme atteint d'HAI de type I [31].

1.5.3 Hépatite auto-immune de type II

Les patients atteints d'HAI de type II présentent généralement des anticorps anti-LKM1 (*anti-liver-kidney microsomes type 1*) et anti-LC1 (*anti-liver cytosol type 1*). Dans 40% des cas d'HAI de type II on retrouve en circulation la présence des deux auto-anticorps, tandis que 50% des cas ne présentent que de l'anti-LKM1 et 10% des cas ne présentent que de l'anti-LC1. Les anticorps anti-LKM1 reconnaissent comme cible antigénique la protéine CYP2D6 du cytochrome P450 faisant parti d'un complexe d'enzymes oxydatives [32, 33]. L'anti-LC1 est dirigé contre la protéine formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD), une enzyme exprimée par les hépatocytes impliqués dans le métabolisme du folate [34].

La majorité des cas d'HAI de type II (80%) sont diagnostiqués avant l'âge de 18 ans, en moyenne vers l'âge de 6,5 ans [31]. Les femmes sont grandement majoritaires dans l'HAI de type II, on retrouve ainsi un ratio de 8 à 9 femmes atteintes pour 1 homme atteint [31].

1.5.4 Auto-anticorps communs aux deux types d'HAI.

Les auto-anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 sont seulement observés chez les patients atteints d'HAI de type II, toutefois les ANA qui sont observés chez les patients atteints du type I peuvent aussi dans de rares cas être présents dans le type II [31].

Des auto-anticorps anti-SLA/LP (*soluble liver antigen/liver pancreas*) sont trouvés en circulation chez 30% des patients atteints d'HAI de type I et II [35]. Leur cible antigénique est un complexe protéique associé à l'ARN de transfert (ARNt) UGA-supresseur (tRNP^{(Ser)Sec}), impliqué dans la synthèse de polypeptides [36]. Bien qu'ils ne soient pas spécifiques au type I ou au type II, ces auto-anticorps sont très spécifiques de l'HAI [37].

Table II : Caractéristiques distinctives de l'HAI de type I et de type II

	HAI Type I	HAI Type II
Ratio femmes : hommes	3 : 1	9 : 1
Âge moyen (diagnostic)	10 ans	6,5 ans
Diagnostic avant 18 ans (%)	40%	80%
Auto-anticorps	SMA, ANA	Anti-LKM1, anti-LC1

1.5.5 Manifestations cliniques et diagnostic

Au moment du diagnostic, les patients atteints d'HAI présentent généralement des caractéristiques cliniques telles qu'un ictère, de la fatigue et des douleurs articulaires (arthralgies) [38]. Dans plusieurs cas, il est également possible de noter chez ces patients une perte de poids, une perte d'appétit ainsi que des douleurs abdominales [31]. Des tests biochimiques révèlent généralement des niveaux sériques de transaminases 1,5 à 50 fois plus élevés que la normale [31]. L'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST) sont deux types de transaminases libérées dans la circulation lorsqu'il y a du dommage hépatique et s'avèrent des marqueurs importants dans le diagnostic. L'histologie du foie à partir d'une biopsie peut par la suite permettre de confirmer la présence d'une inflammation responsable de la destruction du parenchyme hépatique, dont la sévérité peut être déterminée selon une échelle de score établie par K.Ishak (Table III).

Table III : Échelle de score histologique Ishak

	Score
A) Hépatite d'interface périportale ou périseptale	
Absente	0
Faible (focale, quelques zones portales)	1
Faible/Modérée (focale, principalement dans les zones portales)	2
Modérée (continue autour de moins de 50% des espaces portes)	3
Sévère (continue autour de plus de 50% des espaces portes)	4
B) Nécrose confluente	
Absente	0
Nécrose confluente focale	1
Nécrose confluente à quelques endroits	2
Nécrose confluente à plusieurs endroits	3
Nécrose avec ponts portal-central occasionnels	4
Nécrose avec multiples ponts portal-central	5
Nécrose panlobulaire ou multilobulaire	6
C) Nécrose focale lytique, apoptose et inflammation focale	
Absente	0
Un foyer par objectif 10X	1
2 à 4 foyers par objectif 10X	2
5 à 10 foyers par objectif 10X	3
Plus de 10 foyers par objectif 10X	4
D) Inflammation portale	
Aucune	0
Faible, dans quelques-uns ou tous les espaces portes	1
Modérée, dans quelques-uns ou tous les espaces portes	2
Modérée/Sévère, dans tous les espaces portes	3
Sévère, dans tous les espaces portes	4
TOTAL	18

Table adaptée de l'échelle établie par K.Ishak en 1995 (*Histological grading and staging of chronic hepatitis*)[39]

Bien que les dommages hépatiques soient causés par des cellules auto-réactives (principalement T_H1), la réponse humorale est également exacerbée chez les patients atteints d'HAI. Une hypergammaglobulinémie est ainsi généralement détectée lors de l'analyse sérologique du patient, causée par une prolifération des lymphocytes B menant à une surproduction d'IgG [31]. Parmi les anticorps retrouvés dans le sérum des patients se trouvent les auto-anticorps ANA et SMA chez les patients atteints du type I et les anti-LKM1 et anti-LC1 chez les patients atteints du type II. Toutefois, d'autres auto-anticorps peuvent être détectés de façon non-spécifique au type I ou au type II. Des anticorps anti-ASGP-R peuvent ainsi être retrouvés dans le sérum des patients atteints d'HAI. Ces anticorps sont dirigés contre le récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGP-R), exprimé entre autre par les hépatocytes et impliqué dans l'internalisation et la clairance de glycoprotéines de la circulation [40]. Comme pour plusieurs maladies auto-immunes du foie, des anticorps anti-neutrophiles cytoplasmiques périnucléaires (p-ANCA) sont présents dans 90% des cas d'HAI [41]. De plus, des anticorps dirigés contre un glycosphingolipide exprimé entre autre dans les hépatocytes (sulfatide) ont également été détectés chez les patients HAI dans le passé [42]. Aucun rôle pathologique n'a pu être attribué aux divers auto-anticorps, ceux-ci seraient plutôt une conséquence de l'exacerbation de la réponse immunitaire.

Ainsi, les critères suivant peuvent mener au diagnostic d'une HAI : Une histologie du foie présentant des infiltrations lympho-plasmocytaires, des niveaux de transaminases élevés, une hypergammaglobulinémie et la détection d'auto-anticorps. Afin d'éliminer les causes externes pouvant mener à des symptômes similaires, les patients doivent également présenter une séronégativité quant aux virus de l'hépatite A, B et C et ne doivent pas avoir une forte consommation en alcool. Si le patient est une femme en bas âge ou ménopausée ou qu'il possède au niveau du complexe majeur d'histocompatibilité l'haplotype HLA-DR3 ou HLA-DR4, une HAI peut davantage être suspectée [38]. Le comité international de l'hépatite auto-immune a donc établi une grille de score pour faciliter le diagnostic de l'HAI (Table IV). Un score supérieur à 15 avant traitement et supérieur à 17 après traitement mène au diagnostic d'une « HAI certaine », tandis qu'un score entre 10 et 15 avant traitement et entre 12 et 17 après traitement mène au diagnostic d'une « HAI probable » [38].

Table IV : Grille de score pour le diagnostic de l'hépatite auto-immune

Paramètres	Score
Sexe	
Femme	2
Biochimie	
Ratio phosphatase alcaline/AST ou ALT : supérieur à 3, inférieur à 3	-2, +2
Gammaglobulines (n x limite supérieure de la normale) supérieur à 2, 1.5 à 2, 1 à 1.5, inférieur à 1	+3, +2, +1, 0
Auto-anticorps	
ANA, SMA ou LKM1 : titre supérieur à 1:80, égal à 1:80, égal 1:40, inférieur à 1:40	+3, +2, +1, 0
Anti-mitochondries	-2
Marqueurs d'hépatite virale	
IgM anti-VHA, HbsAg ou IgM anti-HBc	-3
Anti-VHC (ELISA ou RIBA)	-2
ARN VHC (PCR)	-3
Infection active par un autre virus	-3
Absence de marqueurs viraux	+3
Autres facteurs étiologiques	
Utilisation récente d'un médicament hépatotoxique ou exposition à des produits sanguins : oui, non	-2, +1
Consommation moyenne d'alcool	
Homme < 35g/jour, Femme < 25g/jour	+2
Homme 35-50 g/jour, Femme 25-40 g/jour	0
Homme 50-80 g/jour, Femme 40-60 g/jour	-1
Homme > 80 g/jour, Femme > 60 g/jour	-2
Facteurs génétiques	
Autres MAI chez patient ou parent au premier degré	+1
Haplotype HLA B8-DR3 ou DR4	+1
Histologie	
Hépatite d'interface	+3
Atteinte lobulaire (présente ou absente) et nécrose en pont	+2
Cellules en rosettes	+1
Infiltrations plasmocytaires	+1
Atteintes biliaires	-1
Autre type d'atteinte (granulome, surcharge ferrique ou cuivrique)	-3
Aucune atteinte histologique	-5
Réponse à la corticothérapie	
Réponse complète	+2
Aucune réponse	+2
Rechute	+3

Adapté de la table émise par le groupe international sur l'hépatite auto-immune, F.Alvarez *et al.* 1999 [38]

1.5.6 Pathogénèse

Les causes exactes menant au développement d'une hépatite auto-immune ne sont pas connues jusqu'à maintenant, bien que plusieurs facteurs de prédisposition ont pu être mis en évidence. L'hypothèse retenue à ce jour suggère que chez les individus prédisposés, un élément déclencheur pourrait mener au bris de la tolérance immunitaire envers les antigènes du soi, plus précisément des antigènes hépatiques, et mener à une réaction auto-immune dirigée contre le foie.

1.5.7 Facteurs de prédispositions

1.5.7.1 Âge et sexe

Les maladies auto-immunes sont majoritairement observées chez les femmes. Environ 60% de cas de sclérose en plaques (SEP), 65% des cas d'arthrite rhumatoïde (AR), 90% des cas de lupus érythémateux disséminé (LED) et plus de 90% des cas de syndrome de Sjögren sont observés chez des patients de sexe féminin [43]. Comme pour ces maladies auto-immunes, la majorité des patients atteints d'HAI sont des femmes. Ainsi, 75% des cas d'HAI de type I et 90% des cas de type II sont diagnostiqués chez des femmes [31]. Cette observation suggère une implication du sexe dans la pathogénèse de l'HAI. Il existe plusieurs différences au niveau de la réponse immunitaire chez la femme comparativement à la réponse chez l'homme, qui pourraient expliquer en partie les différences observées en terme d'incidence de la maladie chez les femmes. Par exemple, suite à une vaccination, la réponse humorale activée est beaucoup plus forte chez les femmes que chez les hommes, menant à une plus grande production d'anticorps chez celles-ci [44]. Aussi, il a été montré que l'on retrouve plus de lymphocytes T CD4⁺ chez les femmes que chez les hommes [45]. Enfin, une plus grande production de cytokines T_H1 a pu être observée chez les femmes que chez les hommes, ce qui corrèle avec des études faites chez la souris où l'estrogène induit la production de cytokines T_H1 tandis que l'androgène inhibe cette production [46, 47].

En plus du sexe, l'âge semble également avoir un rôle important dans la pathogénèse de l'HAI. La maladie se développe dans la majorité des cas à l'enfance, avant la puberté [31]. Chez les femmes, la maladie peut également se développer lors de la ménopause, ce qui suggère à nouveau un rôle potentiel des hormones sexuelles dans la pathologie [48].

1.5.7.2 Prédilection génétique

Bien qu'aucun gène n'ait pu être identifié comme étant directement responsable du développement d'une HAI, certaines variations génétiques semblent rendre les individus portant ces variantes plus à risque de développer la maladie. La majorité de ces variations sont associées au HLA (*human leucocyte antigen*) [37]. Ces gènes codent pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et les variations génétiques qui s'y trouvent permettent de diversifier la reconnaissance antigénique du CMH. Cette région hypervariable se trouve sur le bras court du chromosome 6. Les régions HLA-A, HLA-B et HLA-C codent pour le CMH de classe I tandis que les régions HLA-DP, HLA-DR et HLA-DQ codent pour le CMH de classe II. Des variations au niveau du HLA-DR et HLA-DQ ont été répertoriées de façon plus fréquente chez les patients avec une HAI que chez les individus sains. Les allèles HLA-DR3 et HLA-DR4 semblent particulièrement impliqués dans l'HAI [31]. Dans les populations nord-américaines et européennes, les haplotypes *HLA-DRB1*0301* et *HLA-DRB1*0401* ont été observés à une plus grande fréquence chez les patients présentant une HAI que chez les sujets sains [49]. L'haplotype *HLA-DRB1*0301* est associé au type II tandis que le *HLA-DRB1*0401* est associé au type I seulement. On retrouve plutôt chez les patients atteints d'HAI de la population mexicaine l'haplotype *HLA-DRB1*0404* et l'haplotype *HLA-DRB1*0405* dans les populations argentine et japonaise [37, 48]. Chez les patients atteints du type II, l'haplotype *HLA-DRB1*0701* (DR7) a été associé à une plus grande susceptibilité et les patients portant cet haplotype ont généralement une forme sévère de la maladie que les patients ne portant pas l'haplotype [50]. Certains allèles de la région HLA-DQ sont également associés au type II, plus spécifiquement les haplotypes *HLA-DQB1*0201* et *HLA-DQB1*0601*.

En plus des gènes du HLA, plusieurs SNP (*single nucleotide polymorphism*) ont pu être identifiés parmi des gènes impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire. Parmi ces gènes se trouve CTLA-4, un gène codant pour la protéine du même nom, exprimée à la surface des lymphocytes T et impliquée dans l'atténuation de la réponse immunitaire. Lorsque CTLA-4 se lie aux molécules B7 sur une CPA, un signal inhibiteur est transmis à la cellule T. Chez les patients atteints d'HAI de type I, une fréquence plus élevée du nucléotide « G » dans un SNP A/G de l'exon 1 du gène codant CTLA-4 a pu être notée et corrélée avec la présence de l'haplotype *HLA-DRB1*0301* [51].

De plus, certains polymorphismes du promoteur du gène Fas se sont avérés différents chez les patients atteints d'une HAI comparativement aux sujets sains, entre autres à la position 670 du gène ainsi qu'au niveau des régions IVS 2nt176, 3nt46 et 5nt82 [52, 53]. On remarque aussi pour ce gène une association préférentielle de certains allèles (déséquilibre de liaison) avec le HLA-DR4 [52]. La molécule Fas, lorsque liée à son ligand (FasL), induit la mort par apoptose de la cellule qui l'exprime, permettant d'éliminer les lymphocytes auto-réactifs en périphérie [14].

Un polymorphisme au niveau du promoteur du gène codant pour le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), soit l'allèle *TNFA*2*, a également été observé chez les patients atteints d'HAI de type I. Cet allèle est associé à une plus grande production de TNF- α . Toutefois, son rôle fonctionnel demeure incertain puisque l'on observe une association préférentielle avec le *HLA-DRB1*0301* fortement retrouvé chez les patients avec une HAI [54, 55]. La proximité de cet allèle par rapport à la région HLA pourrait expliquer le déséquilibre de liaison observé.

Par ailleurs, des délétions au niveau du gène codant pour le facteur du complément 4a (C4a) ont été observées chez de jeunes patients atteints d'HAI dont la sérologie présentait des niveaux plus faibles que la normale de C4a sérique [48]. Différents polymorphismes dans le gène du récepteur de la vitamine D (VDR) sembleraient également contribuer au développement de l'HAI puisque certains allèles sont plus fréquemment observés chez les patients que chez les sujets sains [56]. Le VDR a fait l'objet de plusieurs études concernant les maladies auto-immunes puisqu'il a été montré que celui-ci pouvait induire la production de

certaines cytokines inflammatoires et divers polymorphismes ont pu être associés à des maladies auto-immunes telles que le diabète de type I [56].

Enfin, le gène AIRE (*autoimmune regulator*) a pour rôle de réguler la sélection négative des cellules auto-réactives dans le thymus. Son implication dans les maladies auto-immunes a grandement été étudiée puisqu'une mutation de ce gène mène au syndrome APECED. Certains polymorphismes du gène AIRE ont pu être observés chez des patients atteints d'HAI [57, 58].

1.5.7.3 Facteurs environnementaux

Puisque les facteurs de prédispositions génétiques ne sont pas toujours retrouvés chez les patients et que des sujets sains peuvent porter ces variantes génétiques sans développer de pathologie, on suppose que d'autres facteurs pourraient prédisposer au développement d'une HAI. Comme pour plusieurs maladies auto-immunes, des facteurs environnementaux, tels que certaines infections, pourraient représenter un signal déclencheur de la maladie chez des individus génétiquement prédisposés. À ce sujet, le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus qui agirait comme élément déclencheur pour plusieurs maladies auto-immunes [59]. Ce virus induit d'une part une activation non-spécifique des lymphocytes. D'autre part, il comporte des protéines virales ayant une homologie avec l'épitope de la protéine CYP2D6 reconnue comme cible antigénique chez les patients avec une HAI de type II [59]. Le virus EBV a d'ailleurs pu être détecté chez certains de ces patients [59]. Son rôle dans le développement de l'HAI peut donc être suspecté, toutefois des études supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir confirmer son implication dans la pathogénèse. D'autres virus de la famille herpès ont également été suggéré dans le passé comme éléments déclencheurs de l'HAI puisque certaines similarités ont pu être observées entre la protéine FTCD et des protéines virales du virus de l'herpès humain 6 (HHV-6) [60]. Une similarité a également été observée entre la protéine CYP2D6 et une protéine virale du virus herpes simplex de type 1 (HSV-1) [61, 62]. Certaines observations chez des patients chroniquement infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) ont mené à l'hypothèse que ce virus pourrait peut-être déclencher une HAI chez certaines personnes. Entre autres, des anticorps anti-LC1 et anti-LKM1 ont pu être détectés chez des patients chroniquement infectés par le HCV [63, 64]. Une homologie a d'ailleurs pu être observée entre les protéines virales NS3 et NS5a et la protéine CYP2D6 [64]. Ces exemples

suggèrent que le mimétisme moléculaire est un des mécanismes suspectés comme élément déclencheur de la réponse auto-immune impliquée dans l'HAI. Des modèles animaux d'HAI ont d'ailleurs été développés en se basant sur ce principe [65, 66]. Dans le cas de virus hépatotropiques, les dommages causés aux cellules du foie suite à l'infection pourrait mener à une libération d'antigènes normalement séquestrés au foie [48]. Le système immunitaire n'ayant jamais rencontré ces auto-antigènes pourrait alors réagir contre ceux-ci.

En plus des infections virales, la consommation de certains médicaments a été suggérée comme potentiel déclencheur d'une HAI. Parmi ces médicaments, des cas d'HAI ont été rapportés chez des adolescents sous traitement par minocycline contre l'acné et chez des adultes génétiquement prédisposés sous traitements de statines [31, 48]. Certaines herbes médicinales retrouvées dans le thé japonais ont également été suspectées d'être en lien avec le déclenchement d'une HAI [48]. Tous ces facteurs environnementaux suggérés comme éléments déclencheurs de l'HAI demeurent à ce jour hypothétiques et nécessitent de plus amples investigations.

1.5.7.4. Dérégulations du système immunitaire

Certaines dérégulations du système immunitaire ont pu être mise en évidence chez les patients avec une HAI. Lorsqu'un élément déclencheur induit une réponse immunitaire potentiellement auto-réactive, des mécanismes de régulation sont présents afin d'atténuer cette réponse une fois l'agression terminée. Si ces mécanismes sont défectueux, la réponse immunitaire n'est plus aussi bien régulée et il se peut qu'une réponse auto-immune se développe. Il a été observé chez les patients avec une HAI que le nombre et la fonction des cellules T régulatrices (Tregs) seraient défectueux [67, 68]. Cette observation est toutefois controversée à ce jour puisqu'une équipe de recherche a montré que la population de Tregs chez les patients avec une HAI n'est pas modifiée comparativement aux individus sains [69]. Aussi, il semblerait que la voie d'inhibition par les Tregs Tim-3/Gal-9 serait déficiente chez les patients présentant une HAI. En fait, l'expression de Galectine-9 sur les Tregs et de Tim-3 (*T cell immunoglobulin and mucin domain 3*) sur les cellules CD4⁺ effectrices serait altérée, ayant comme conséquence un potentiel suppresseur réduit des Tregs et une moins grande susceptibilité à la régulation de la prolifération des cellules CD4⁺ effectrices [70]. Également, bien que la maladie soit associée à une réponse auto-immune de type T_H1, il semblerait que des cellules T_H17 soit induites chez

les patients HAI [71]. Toutes ces observations n'ont toutefois pas encore été approfondies et il demeure difficile de déterminer s'il s'agit de causes ou de conséquences de la maladie.

1.5.8 Traitements

L'HAI est une maladie incurable à ce jour. Toutefois, il est possible de la contrôler par des traitements d'immunosuppresseurs. Le traitement standard consiste en l'administration de corticostéroïdes et d'azathioprine, en combinaison ou individuellement [31]. L'azathioprine est un inhibiteur de la voie de synthèse des purines tandis que les corticostéroïdes agissent comme anti-inflammatoires en altérant la transcription de certains gènes codant pour des molécules inflammatoires. Dans 80% des cas, ce traitement permet de maintenir la rémission [31]. La cyclosporine peut également être administrée comme première ligne de traitement ou lorsque le patient ne répond pas au traitement standard [72, 73]. Un traitement à l'aide de cet inhibiteur de calcineurine a montré une rapide diminution de l'inflammation et des niveaux de transaminases et le peu d'effets secondaires rapporté s'avère intéressant dans la pratique pédiatrique [72-74].

Bien que la plupart des patients répondent bien au traitement par corticostéroïdes associés ou non à l'azathioprine, de nouveaux traitements sont constamment recherchés puisque ces immunosuppresseurs comportent plusieurs effets secondaires importants. Chez des patients non-répondants ou pour qui les effets secondaires de l'azathioprine ou des corticostéroïdes étaient trop importants, le mycophenolate mofetil (MMF) s'est avéré être un traitement efficace [75]. Cette molécule, une fois convertie en acide mycophénolique, cause une déplétion des nucléotides guanosine et désoxyguanosine qui cible principalement les cellules T et B en diminuant leur prolifération. Des anticorps monoclonaux ciblant la molécule CD20 (Rituximab^R) ont également été utilisés chez des patients en rechute comme thérapie alternative au traitement standard [76, 77]. Puisque les lymphocytes B expriment le CD20, ce traitement induit une déplétion des lymphocytes B. Bien que les cellules causant le dommage au foie soient principalement des cellules T, la déplétion des cellules B s'est avéré une thérapie efficace, suggérant un rôle indirect de ces cellules dans la pathologie [76]. Récemment, l'usage d'un anticorps monoclonal anti-TNF- α a permis d'atteindre un stade de rémission chez des patients avec une HAI pour qui aucun autre traitement ne s'était avéré

efficace [78]. Un traitement à l'aide d'anticorps monoclonaux ciblant les cellules T pourrait consister en un traitement potentiel plus spécifique que les traitements actuels. Des études utilisant des anticorps monoclonaux ciblant le CD3 sur les lymphocytes T sont présentement à l'essai sur des modèles animaux.

Dans la majorité des cas, les traitements à l'aide d'immunosuppresseurs parviennent à maintenir les patients en rémission. Chez les patients pour qui la thérapie conventionnelle est peu efficace, il peut y avoir une évolution de la condition vers une cirrhose ou une insuffisance hépatique pouvant nécessiter une transplantation de foie [31]. La recherche de nouvelles thérapies a pour but ultime de développer des traitements ciblant spécifiquement les cellules auto-réactives ou les mécanismes responsables de la réponse auto-immune causant une HAI, plutôt que d'induire une immunosuppression globale.

1.6 Les modèles animaux d'hépatite auto-immune

Bien que plusieurs facteurs prédisposant au développement d'une HAI aient pu être mis en évidence au cours des dernières années, les causes exactes menant à la pathologie demeurent inconnues. Le diagnostic peut également être difficile chez certains patients ne présentant pas les caractéristiques typiques de la maladie. Le traitement constitué d'azathioprine et de corticostéroïdes permet d'atteindre un état de rémission chez la plupart des patients. Toutefois, les effets secondaires peuvent grandement nuire à la qualité de vie de ces derniers. Pour toutes ces raisons, il s'avère essentiel d'avoir des modèles animaux d'HAI, permettant de mener des études dans le but de mieux comprendre certains aspects de la maladie et de développer de nouvelles thérapies. Différents modèles d'HAI ont été développés dans le passé, principalement chez la souris. Chacun de ces modèles présentent quelques caractéristiques typiques de l'HAI mais aucun de ces modèles ne les présentent toutes. À ce sujet, les souris ont un foie particulièrement résistant à l'inflammation avec un très bon potentiel de régénération, ce qui pourrait expliquer pourquoi, dans la plupart de ces modèles, la fibrose hépatique n'est pas observée.

Différents principes ont été exploités pour développer ces modèles. Certains ont été obtenus suite à l'injection d'une substance chimique (modèle ConA). Plusieurs ont été développés à l'aide de souris transgéniques (modèles SAP-IFN- γ , TGF- $\beta^{-/-}$, Alb/GP33, CD28-scFv, TTR-NP) ou encore par immunisation (modèle S-100 et pCMV-CTLA4-2D6-FTCD) afin de rendre possible l'induction d'une pathologie similaire à l'HAI chez des animaux.

1.6.1 Modèle S-100

Le modèle S-100 ou EAH pour « *experimental autoimmune hepatitis* » a été un des premiers modèles à être développé. Il consiste en l'immunisation de souris C57BL/6 avec du surnageant d'homogénat de foie syngénique, obtenu par centrifugation à 100 000 x g puis émulsifié dans de l'adjuvant complet de Freund [79]. L'immunisation a été faite originalement par la voie intra-musculaire, mais s'est avérée par la suite plus efficace par la voie intra-péritonéale [79, 80]. Les souris immunisées présentent d'importantes infiltrations lymphocytaires au niveau du foie. L'inflammation observée est causée par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques aux lipoprotéines du foie et des auto-anticorps dirigés contre ces protéines ont

également pu être détectés chez les souris [79, 81]. Lorsque les splénocytes provenant de souris immunisées au S-100 sont transférées à des souris non-immunisées, les souris receveuses présentent des lésions hépatiques qui ne sont pas observées quand les cellules transférées sont préalablement traitées avec un anticorps anti-Thy1,2 afin d'éliminer les cellules T [81]. Parmi les souches de souris immunisées lors des premières études se trouvaient les C57Bl/6, les Balb/c et les C3H. La souche C57Bl/6 s'est avérée la plus susceptible de développer une hépatite, ce qui a pu être confirmé par des modèles qui ont été développés par la suite [79, 80, 82]. Ce modèle a toutefois été abandonné car les souris ayant été traitées avec l'adjuvant complet de Freund seul présentaient également de l'inflammation hépatique remettant en question la spécificité du modèle [83].

1.6.2 Modèle de dommage hépatique induit par la Concanavaline A

La Concanavaline A (ConA) est une lectine, qui lorsqu'administrée à des souris induit une réaction inflammatoire menant à la nécrose, spécifiquement localisée au niveau du foie. Lorsqu'une dose de 1,5mg/kg de ConA est injectée par voie intra-veineuse à des souris NMR1 ou Balb/c, un recrutement de lymphocytes a pu être observé sur les cellules endothéliales hépatique (LSEC) et les hépatocytes de celles-ci [84]. Ces souris présentent des niveaux élevés de transaminases ainsi qu'une lymphoprolifération principalement des cellules de type T_H1 [82]. La prolifération des cellules T semblerait être orchestrée par les macrophages puisque la déplétion de ces cellules chez les souris injectées à la ConA empêche le développement du dommage hépatique [84]. Ce modèle murin représente un bon outil pour l'étude de l'inflammation et du dommage hépatique. Toutefois, aucune réponse spécifique aux auto-antigènes n'est observée. Ces souris ne produisent d'ailleurs pas d'auto-anticorps. Les dommages observés n'étant pas associés à une réaction des cellules contre des antigènes du soi, sont plutôt dus à une forte production de cytokines inflammatoires induite par la ConA, telles que l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-2 [84]. Ces cytokines semblent grandement impliquées dans le dommage hépatique, ce qui a entre autres pu être démontré par l'efficacité du traitement à l'anti-TNF- α [78].

1.6.3 Souris SAP-IFN- γ

L'IFN- γ est une cytokine principalement produite par les cellules T_H1. Les cellules auto-réactives chez les patients atteints d'HAI sont des cellules produisant de l'IFN- γ [85]. Un rôle important dans la pathogénèse de l'HAI a donc pu être attribué à cette cytokine. Un modèle d'HAI s'est basé sur l'expression de cette cytokine spécifiquement au niveau du foie, afin d'induire une inflammation hépatique. Des souris transgéniques ont ainsi été générées, pour lesquelles l'expression du gène de l'IFN- γ est sous le contrôle d'un promoteur exprimé au niveau des cellules du foie, le promoteur SAP (*serum amyloid P*) [86]. Ces souris ont des niveaux de transaminases élevés ainsi qu'une histologie présentant des infiltrations lymphocytaires [86]. Le transgène semble toutefois affecter la viabilité des souris puisque la majorité de celles-ci meurent en un an, alors que l'espérance de vie normale d'une souris est généralement de deux ans. Comme pour le modèle induit par la ConA, aucune réponse antigène-spécifique n'est présente, donc aucun auto-anticorps n'est également produit. Il s'agit plutôt d'un modèle permettant de cibler le rôle de l'IFN- γ dans l'inflammation hépatique.

1.6.4 Souris invalidée pour le TGF- β (TGF- $\beta^{-/-}$)

Le TGF- β est cytokine nécessaire à la régulation de la réponse immunitaire. L'invalidation de ce gène chez la souris mène au développement de réponses inflammatoires affectant plusieurs organes. Chez des souris Balb/c, l'invalidation du TGF- β mène au développement d'une réaction nécro-inflammatoire principalement localisée au foie [87]. Cette hépatite létale se développe spécifiquement chez les souris Balb/c ce qui suggère encore une fois l'importance du fond génétique [87]. De plus, l'hépatite se développe seulement lorsque le gène de l'IFN- γ est exprimé, ce qui appuie l'importance de cette cytokine dans la pathogène et l'implication de la réponse T_H1 dans l'HAI [87]. Ce phénotype est toutefois peu viable puisque les souris meurent massivement vers l'âge de 15 jours. Il est donc impossible d'utiliser ce modèle pour étudier l'effet de traitements à long terme [82, 87, 88].

1.6.5 Souris Alb/GP33

Pour ce modèle, des souris transgéniques exprimant la glycoprotéine 33 (GP33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sous le contrôle du promoteur de l'albumine ont été développées [89]. La GP33 est ainsi exprimée principalement au niveau du foie des souris et très légèrement au niveau du thymus. Puisque la protéine est exprimée au thymus, une délétion clonale de cellules se produit à 90%. Bien qu'il reste 10% de cellules dont le TCR est spécifique à l'épitope de GP33, l'infection par le LCMV ne cause pas le bris de tolérance nécessaire pour induire une réaction croisée menant au développement d'une hépatite. Un transfert adoptif de ce 10% de cellules ne résulte également pas en une hépatite. Il a donc fallu croiser des souris Alb-GP33 avec des souris exprimant l'antigène HBsAg de l'hépatite B (lignée transgénique 107.5) de façon constitutive au niveau du foie, infecter cette nouvelle lignée avec le LCMV et procéder à un transfert adoptif de cellules dont le TCR est spécifique à l'épitope de la GP33 pour enfin pouvoir observer une réponse inflammatoire hépatique [89]. L'expression de HBsAg au foie amènerait une susceptibilité accrue aux cytokines inflammatoires produites lors de la réponse antivirale dirigée contre le LCMV. Les multiples conditions nécessaires au développement d'une hépatite transitoire dans ce modèle font de celui-ci un modèle peu représentatif de l'HAI.

1.6.6 Souris exprimant un ligand spécifique du CD28 (scFv)

Un modèle a été développé récemment en se basant sur l'interaction de CD28 avec un ligand spécifique en absence du signal CTLA-4 [90]. Par leurs interactions avec les molécules B7-1 et B7-2 exprimées sur les CPA, CD28 et CTLA-4, exprimés sur les cellules T, induisent respectivement l'activation et l'inhibition des lymphocytes T suite à l'engagement du TCR au CMH [91]. La souris transgénique développée exprime une région du fragment variable d'un anticorps anti-CD28 au niveau membranaire nommé scFv (*single chain fragment variable*), sur un fond génétique déficient au niveau des gènes B7-1 et B7-2 [90]. L'absence des molécules B7 empêche la signalisation via CD28 et CTLA-4, toutefois le transgène induit une activation constitutive des cellules T par l'interaction du CD28 avec son ligand scFv. Ces souris présentent une inflammation hépatique dont les infiltrats sont principalement constitués de lymphocytes T CD8⁺, produisant de grandes quantités d'IFN- γ . La présence de splénomégalie et d'hépatomégalie a également pu être observées, telle que reportée chez

plusieurs patients atteints d'HAI [31]. Les niveaux de transaminases sont élevés chez ces souris et, contrairement à plusieurs modèles, celles-ci développent une fibrose. Les souris scFv ne développent cependant pas d'auto-anticorps et une légère inflammation a pu être observée occasionnellement dans des organes autres que le foie, tels que les poumons, les reins, le pancréas et la peau [90]. Aucune étude à ce jour n'a utilisé ce modèle afin de tester des thérapies en développement ou à des fins de compréhension de la maladie. Ce modèle s'avère intéressant puisque la voie CTLA-4/B7 pourrait être impliquée dans la pathogénèse considérant les polymorphismes identifiés dans le passé [92]. Des études plus approfondies seront néanmoins nécessaires afin de s'assurer de la validité de ce modèle récemment développé.

1.6.7 Souris TTR-NP

En 2002, le modèle TTR-NP a été développé dans notre laboratoire [66]. Pour ce faire, une souris transgénique exprimant de façon constitutive la nucléoprotéine (NP) du virus LCMV au niveau du foie a été générée. Le transgène construit afin de permettre cette expression localisée de la protéine est sous le contrôle du promoteur transthyrétine (TTR), un promoteur spécifique au foie. La protéine est ainsi seulement exprimée au niveau du foie, contrairement au promoteur de l'albumine utilisé dans le modèle Alb-GP33 qui induit une expression majoritairement au niveau du foie mais tout de même un peu dans le thymus, ce qui entraîne la sélection négative des clones auto-réactifs [89]. Le transgène est donc injecté aux embryons de souris fécondés, qui peut ensuite être transmis à la descendance afin de générer la lignée TTR-NP [66].

L'expression constitutive de la NP dans le foie n'est toutefois pas suffisante pour induire à elle seule une réponse immunitaire menant à une hépatite, il doit y avoir un élément déclencheur. Afin d'induire une réponse immunitaire qui pourra ensuite se diriger contre les hépatocytes, ces souris sont immunisées avec un plasmide codant pour la protéine NP. Le plasmide comprend également la région extra-membranaire du CTLA-4 afin de favoriser le transport de la protéine aux CPA et ainsi augmenter la présentation antigénique nécessaire à l'activation des cellules T. Les souris sont donc injectées avec le plasmide à trois reprises par la voie intramusculaire. Cette voie permet la captation de la protéine au niveau des nodules lymphatiques

proches du site d'injection et un temps d'expression relativement long [93]. Un plasmide codant pour l'IL-12 est également injecté aux mêmes moments afin de favoriser le développement d'une réponse immunitaire de type T_H1 [66, 93].

Cinq mois suivant la dernière injection les souris présentent des niveaux de transaminases plus élevés que la normale ainsi qu'une inflammation hépatique [66]. L'histologie du foie des souris a révélée la présence d'infiltrations lymphocytaires accompagnées d'une hépatite d'interface qui est fréquemment observée chez les patients atteints d'HAI [31]. Aucune fibrose n'a toutefois pu être observée. Les souris développent une réponse immunitaire principalement de type T_H1 et produisent des auto-anticorps anti-NP [66]. Le long temps requis pour que les souris développent une hépatite est probablement attribuable au temps nécessaire, d'abord à l'activation des cellules T, ensuite à leur migration vers le site en question, puis à la division cellulaire pour finalement atteindre un seuil causant des dommages hépatiques [66].

1.6.8 Modèle par xéno-immunisation avec le plasmide pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD

Le modèle TTR-NP a permis de montrer qu'il était possible d'induire un modèle d'HAI par mimétisme moléculaire. En 2004, suivant ce même principe, notre laboratoire a développé un second modèle d'HAI. Il consiste en l'immunisation de souris sauvages C57Bl/6 avec de l'ADN codant pour les antigènes humains impliqués dans la réponse auto-immune chez les patients atteints d'HAI de type II, soit les protéines CYP2D6 et FTCD [65]. Le plasmide construit comprend les régions antigéniques des gènes codant pour CYP2D6 et FTCD chez l'humain, sous le contrôle du promoteur CMV, ainsi que la région N-terminale du gène codant pour le CTLA-4 murin [65]. Comme pour le modèle TTR-NP, la portion transcrite du CTLA-4 est la partie extra-membranaire de la molécule afin de favoriser la captation de la protéine par les CPA. L'immunisation se fait également à 3 reprises, à 2 semaines d'intervalles, par voie intra-musculaire, en co-injection avec un plasmide codant pour l'IL-12 (pVR-IL-12) afin d'induire une réponse T_H1 [93]. Puisque le plasmide code pour une protéine de fusion en grande partie humaine, les souris immunisées développent d'abord une réponse immunitaire contre la protéine considérée comme du non-soi, puis, par mimétisme moléculaire, celles-ci

développent éventuellement une réponse immunitaire contre leurs propres protéines menant au développement d'une hépatite auto-immune.

Huit mois suivant la dernière injection, les souris xéno-immunisées présentent d'importantes infiltrations lymphocytaires au niveau du foie, principalement constituées de lymphocytes T CD4⁺ mais aussi de lymphocytes T CD8⁺ et de lymphocytes B [65]. Ces infiltrations sont localisées dans les zones lobulaires, portales et périportales et une hépatite d'interface est généralement présente [65]. Les souris ne développent toutefois pas de fibrose hépatique. Les niveaux de transaminases sériques sont significativement plus élevés que la normale chez les souris à ce moment et celles-ci développent une hypergammaglobulinémie [94]. Dans les mois suivant l'immunisation, des anticorps contre la protéine de fusion sont détectés puis, après quelques mois, les souris se mettent à produire des auto-anticorps, soit des anticorps dirigés contre leur propre FTCD, tout comme l'humain avec une HAI de type II qui produit des anti-LC1. Ces anticorps sont principalement des IgG2, ce qui suggère une réponse immunitaire de type T_H1. [65]

Comme chez l'humain, certaines prédispositions telles que l'âge, le sexe et le fond génétique ont pu être observées dans ce modèle. En effet, suite à l'immunisation, les souris femelles développent une importante inflammation au niveau du foie tandis que les mâles ne développent que très peu d'inflammation hépatique [95]. La caractérisation de ce modèle a donc été faite à partir de femelles. Aussi, l'âge auquel les souris sont immunisées influence le développement de la maladie puisque celles-ci doivent recevoir leur première injection entre 6 et 7 semaines de vie afin de développer la réponse immunitaire nécessaire à l'induction de l'hépatite. Avant et après cet intervalle d'âge, la réponse auto-immune est beaucoup plus faible [95]. Finalement, le fond génétique semble également influencer le développement de la pathologie chez les souris. Les souris C57Bl/6 utilisées dans ce modèle développent une forte réponse auto-immune menant à la destruction du parenchyme hépatique suite à l'immunisation. La souche 129/Sv possède les mêmes haplotypes de CMH de classe I et II que la souris C57BL/6 mais diffère au niveau de gènes non-CMH, tandis que la souche Balb/c diffère au niveau des gènes associés au CMH et des gènes non-CMH. Ainsi, suite à l'immunisation, les souris 129/Sv ne développent qu'une faible inflammation et les souris Balb/c ne développent aucune forme d'hépatite, ce qui soutient l'importance du fond génétique [94].

1.6.9 Modèles basés sur l'utilisation d'un vecteur adénovirus

Le modèle de xéno-immunisation avec le plasmide pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD a montré la capacité de générer une réaction auto-immune par mimétisme moléculaire à l'aide des antigènes humains de l'HAI chez des souris. En se basant sur ce principe, un modèle a été développé dans notre laboratoire utilisant un vecteur adénovirus recombinant codant pour ces antigènes [96]. Le tropisme de l'adénovirus pour le foie permet l'expression des protéines codées par le vecteur recombinant dans cet organe. L'hypothèse ayant mené au développement de ce modèle était qu'en exprimant les antigènes au foie, la réponse auto-immune pourrait se produire plus rapidement que lors d'une expression périphérique telle qu'il est le cas dans le modèle pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD qui prend 8 mois à se développer. L'injection par voie intra-musculaire et par voie intra-veineuse d'un vecteur adénovirus codant pour les antigènes humains a en effet permis d'observer une hépatite auto-immune chez des souris C57BL/6, toutefois celle-ci prend également 8 mois à se développer [96]. D'autres équipes ont développé des modèles d'HAI utilisant des vecteurs adénovirus codant soit pour la protéine humaine FTCD ou CYP2D6 [97, 98]. Ces deux modèles requièrent également plusieurs semaines afin qu'il y ait développement d'une HAI et la fibrose observée n'est que très faible. Tous ces modèles tentaient de corriger les lacunes observées dans le modèle pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD telles que le long temps requis pour induire l'inflammation hépatique ainsi que l'absence de fibrose. Aucun de ceux-ci n'a su amener une amélioration significative de ces paramètres.

1.7 Le système immunitaire pendant la grossesse

L'amélioration des traitements, du diagnostic et les meilleures connaissances de l'HAI acquises au cours des dernières années ont permis un meilleur contrôle des rechutes, ce qui a permis à plusieurs femmes d'entreprendre une grossesse une fois leur état stabilisé. Il est ainsi nécessaire de tenir compte des modifications immunologiques se produisant lors de la grossesse afin de comprendre l'impact de ceux-ci sur la réponse auto-immune.

1.7.1 Modulation de la réponse immunitaire lors de la grossesse

Le système immunitaire de la femme enceinte fait face à un paradoxe important : Celui-ci doit procurer une tolérance chez la mère envers les antigènes paternels exprimés par le fœtus tout en la protégeant contre les infections potentielles. On parle ainsi d'immunomodulation plutôt que d'immunosuppression pendant la grossesse [99]. On dit du fœtus qu'il est semi-allogénique, puisque la moitié de son matériel génétique provient du père et l'autre moitié provient de la mère. Les antigènes paternels exprimés par le fœtus sont donc considérés comme du non-soi par le système immunitaire de la mère et il est donc nécessaire que des mécanismes de tolérance soient en place afin d'éviter le rejet. Lorsque ces mécanismes sont déficients, le système immunitaire peut s'attaquer au fœtus et mener à une fausse-couche [99].

Chez les mammifères, la zone où se rencontrent le *decidua*, un tissu dérivé de l'endomètre, et le placenta constitue l'interface mère-fœtus [100]. C'est principalement à cet endroit que des mécanismes de tolérance sont nécessaires pour contrer la prolifération des cellules immunitaires dirigées contre les antigènes fœtaux, bien que des mécanismes de tolérance soient également observés de façon systémique chez la mère [101, 102]. Cette dernière observation s'explique par la relâche de cellules et de particules fœtales dans la circulation de la mère pendant la grossesse. Des antigènes fœtaux sont même exprimés dans divers tissus chez la mère pendant sa grossesse, un phénomène nommé microchimérisme [100, 103]. Des cellules souches hématopoïétiques fœtales CD34⁺ sont entre autres retrouvées dans le sang de cordon ombilical, mais également dans la circulation chez la femme enceinte [104]. Les antigènes fœtaux présents dans le sang de la mère permettent la présentation antigénique par les CPA en circulation, qui peuvent ensuite activer des cellules CD4⁺ effectrices dirigées

contre ces antigènes, d'où l'importance d'avoir des mécanismes de tolérance en place [105, 106].

1.7.2 Mécanismes de tolérance envers le fœtus

Parmi les mécanismes impliqués dans la tolérance envers le fœtus se trouve la génération de cellules T régulatrices. En effet, une expansion systémique des cellules T régulatrices a pu être observée dès le début de la grossesse, qui atteint un maximum au 2^e trimestre, puis diminue jusqu'à l'accouchement [101, 103]. Ce phénomène se produit autant chez l'humain que chez la souris. Chez la souris, l'expansion des Tregs a pu être observée dans le sang, la rate, le thymus et dans les ganglions inguinaux et iliaques [101, 107]. Cette population cellulaire s'avère nécessaire afin que le fœtus ne soit pas rejeté. La déplétion des cellules T régulatrice par un système d'IL-2 couplé à la toxine diphtérique ciblant le récepteur CD25 (*denileukin diftotox*), mène au rejet des fœtus [105]. De plus, dans le modèle murin spontané de fausses couches récurrentes, où des femelles CBA/J sont croisées avec des mâles DBA/2J, les femelles présentent des niveaux de Tregs en circulation qui sont réduits [103]. Le transfert adoptif de Tregs parvient à rétablir une tolérance envers les fœtus et diminuer le nombre de rejets chez ces souris [103, 108].

Chez une personne en santé, les cellules T régulatrices constituent de 5 à 10% des cellules T CD4⁺ se trouvant dans le sang périphérique, tandis que 15% des cellules T CD4⁺ se trouvant au niveau du *decidua* sont des Tregs [99, 109]. Cette proportion peut aller jusqu'à 30% chez la souris [101]. Les Tregs peuvent être recrutés à l'interface mère-fœtus grâce à l'expression de différents récepteurs de chimiokines dont les ligands sont exprimés dans l'utérus. L'expression des récepteurs CCR4 et CCR5 sur les Tregs permet leur recrutement au *decidua* où ils peuvent ensuite proliférer afin d'atteindre un nombre suffisant pour contrôler la réponse dirigée contre le fœtus [110, 111].

L'origine des Tregs induits pour contrôler la réponse immunitaire à l'interface mère-fœtus demeure quelque peu incertaine. Plusieurs études soutiennent que ces cellules sont induites en périphérie chez la mère. Toutefois, une expansion des Tregs d'origine thymique est également observée [101, 112]. En effet, l'expression du facteur CNS1 (*conserved noncoding sequence 1*) dans les Tregs augmente l'expression du facteur de transcription Foxp3 et est essentielle à

la génération des Tregs périphériques (pTregs) [112]. Le facteur CNS1 est présent dans les Tregs du placenta et, lorsque son gène est invalidé chez la souris, le pourcentage de cellules CD4⁺ effectrices est grandement augmenté, de même que la proportion de résorptions fœtales [112]. De plus, une augmentation du pourcentage de Tregs a pu être notée au niveau du thymus chez des souris en gestation, ce qui suggère une implication des Tregs thymiques (tTregs) [107]. Considérant l'augmentation des populations de pTregs et de tTregs pendant la grossesse, il semblerait que ces deux types de cellules T régulatrices soient impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire lors de cette période.

La spécificité des Tregs induits pendant la grossesse a également été grandement étudiée dans les dernières années. Grâce à un modèle de souris où les fœtus mâles expriment les antigènes paternels H-Y, il a été montré qu'une prolifération de cellules CD4⁺ spécifiques à ces antigènes était observée, dont une portion de ces cellules était des Tregs [105]. Plus le nombre de fœtus mâles était grand, plus cette prolifération cellulaire était importante. Chez ces souris, une seconde grossesse correspond en quelques sortes à un rappel. La réponse immunitaire est donc déclenchée plus rapidement et une proportion encore plus grande de Tregs est générée pour atténuer cette réponse [105]. Ces observations suggèrent une spécificité des Tregs pour les antigènes fœtaux paternels. Toutefois, cette population cellulaire s'est également avérée essentielle lors de grossesses syngéniques, c'est-à-dire lorsque le mâle et la femelle sont génétiquement identiques. En effet, les cellules T régulatrices sont fortement augmentées lors de grossesses allogéniques mais une augmentation est tout de même présente dans le cas de grossesses syngéniques [101]. De plus, la déplétion des Tregs lors de grossesses allogéniques amène un rejet des fœtus, observé par une augmentation du nombre de sites de résorption, ce qui est également observé lorsque les Tregs sont déplétés chez des femelles en gestation syngénique [101]. Ces observations, quelque peu contradictoires quant à la spécificité des Tregs, suggèrent l'implication de cellules spécifiques et non-spécifiques aux antigènes fœtaux dans le contrôle de la réponse immunitaire engendrée par la grossesse.

Les cellules T régulatrices induites en réponse au fœtus agissent par différents mécanismes de suppression. À ce sujet, les Tregs se trouvant au *decidua* sont majoritairement CTLA-4 positives, ce qui suggèrent un rôle associé à cette molécule [109]. L'IL-10 semble également être un des mécanismes par lesquels les Tregs agissent dans la tolérance envers le fœtus. Suite

au transfert adoptif de Tregs chez la souris CBA/J croisées avec DBA/2J, le fait de bloquer l'IL-10 empêche le rétablissement du pourcentage de résorption à un niveau normal [103]. L'IL-10 est d'ailleurs régulé à la hausse pendant la grossesse [113]. La suppression par l'intermédiaire de la molécule PD-1 (*program death 1*) est également un mécanisme qui semble permettre la régulation de la réponse envers le fœtus. Le ligand de PD-1, PDL-1, est d'ailleurs exprimé à la surface des syncytiotrophoblastes et une augmentation du taux de rejet a pu être observée dans des grossesses allogéniques chez la souris lorsque celui-ci est bloqué [114].

En plus des cellules T régulatrices, les cellules dendritiques peuvent également avoir un rôle important dans la tolérance. Les tol-DCs, avec leur phénotype particulier, vont ainsi limiter l'activation de cellules effectrices dirigées contre les antigènes fœtaux. Certains caractères tolérogènes, tels qu'une diminution de l'expression du HLA-DR impliqué dans la présentation antigénique, du CD86, ou encore du CD54 impliqué dans la synapse immunologique ont pu être observés au niveau des cellules dendritiques de la femme enceinte [106, 115].

1.7.3 Effet des hormones associées à la grossesse

L'environnement hormonal pendant la grossesse est grandement modifié. L'hormone gonadotrophine chorionique (HCG), synthétisée par l'embryon, est drastiquement augmentée dans la circulation de la mère au début de la grossesse puis son niveau redescend pour atteindre un niveau plus bas pendant le 2^e et le 3^e trimestre [116]. À l'inverse, les estrogènes (estradiol, estriol et estrone) et la progestérone sont augmentés à partir du 2^e trimestre, atteignent un maximum au 3^e trimestre, puis leur niveau chute rapidement à l'accouchement (Figure 1) [117].

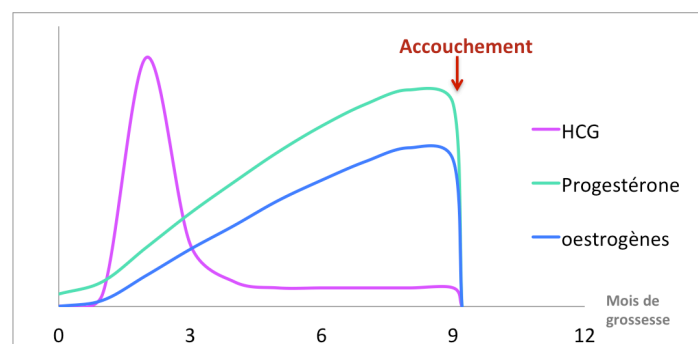


Figure 2 : Variations hormonales observées pendant la grossesse

L'environnement hormonal pendant la grossesse semble avoir un impact sur la réponse immunitaire. La présence des hormones en grandes concentrations à différents stades de la grossesse semble favoriser un environnement immunitaire tolérogène.

L'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) est augmentée jusqu'à 100 fois les niveaux basaux en début de la grossesse [116]. Différents mécanismes lui sont attribués afin d'induire la tolérance immunitaire nécessaire pour tolérer le fœtus. Le récepteur de l'hCG est exprimé dans presque tous les tissus et par la majorité des cellules [20]. Chez la souris, il a été montré qu'un traitement avec des doses physiologiques de hCG favorise un phénotype tolérogène des cellules dendritiques [118]. Dans un modèle de souris développant spontanément un diabète de type 1 (T1D), soit la souris NOD, ces cellules dendritiques tolérogéniques (tol-DC) permettent la prévention du développement de la maladie [119]. Ces tol-DCs, induits suite à l'administration de hCG, expriment la molécule IDO, qui inhibe la prolifération des cellules T [20]. La molécule IDO est également exprimée par les Tregs et les trophoblastes afin de supprimer la prolifération cellulaire à l'interface mère-fœtus [20, 103, 120]. Les tol-DCs induits par le hCG mèneraient également à une augmentation de la production d'IL-10 [118]. Cette hormone serait également impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire par l'interaction Fas/Fas-L entre les trophoblastes et les lymphocytes à l'interface mère-fœtus [121].

La progestérone peut également favoriser certains mécanismes de tolérance. En effet, chez la souris, une injection de progestérone mène à une augmentation du pourcentage de Tregs en circulation et dans la zone utérine [122]. Aussi, il a été montré que la progestérone favorise la production d'IL-10 [123]. Dans un modèle murin de sclérose en plaques (*experimental autoimmune encephalitis*, EAE), lorsque les souris reçoivent une dose de progestérone similaire à la concentration en progestérone mesurée chez des souris gestantes, leurs splénocytes produisent plus d'IL-10 et il est possible d'observer une rémission de la maladie [123]. Des études *in vitro* ont également suggéré que la progestérone favorisait la polarisation des cellules T auxiliaires CD4⁺ vers un phénotype T_H2. La grossesse est d'ailleurs connue pour favoriser une polarisation des cellules T auxiliaires CD4⁺ vers un phénotype T_H2 plutôt que T_H1. Ainsi, une étude a montré que lorsqu'une lignée de cellules T CD4⁺ est mise en

culture en présence de progestérone à des concentrations ressemblant aux maximums atteints chez la femme enceinte, les cellules produisent plus de cytokines T_{H2} [124].

Les estrogènes peuvent transmettre des signaux intracellulaires par leurs interactions avec les récepteurs d'estrogènes alpha ($ER-\alpha$) et beta ($ER-\beta$), qui sont exprimés par la majorité des cellules humaines dont les cellules immunitaires [125-127]. Plusieurs études ont démontré leur rôle primordial dans la régulation de la réponse immunitaire associée à la grossesse. Ces hormones influencent principalement la réponse T_{H1} et T_{H2} . Leur rôle est toutefois complexe puisqu'elles ont un effet biphasique sur les cellules T auxiliaires $CD4^+$ [128]. À de faibles concentrations, les estrogènes favorisent une réponse immunitaire de type T_{H1} tandis qu'à de fortes concentrations elles induisent une réponse T_{H2} [129]. L'estradiol, à faible dose, induit une augmentation de la réponse à l'IL-12, ce qui augmente l'expression du facteur de transcription Stat4, qui à son tour augmente l'expression de T-bet et favorise le développement de cellules T_{H1} [129]. Pendant la grossesse, les concentrations d'estrogènes augmentent de façon exponentielle, pouvant expliquer la polarisation T_{H2} observée. Pendant cette période, les cytokines T_{H2} , soit l'IL-4, IL-5 et IL-10, sont augmentées tandis que l'IFN- γ , une cytokine T_{H1} , est diminuée [130, 131]. L'estriol qui est produit par le placenta et qui augmente également drastiquement pendant la grossesse, favorise la sécrétion d'IL-10 [132]. Cette hormone a également le potentiel d'induire les cellules dendritiques tolérogéniques [19]. Il a été montré que le fait d'administrer de l'estriol à des souris EAE génère des tol-DCs qui induisent une rémission de la maladie [19, 132].

1.7.4 Effets de l'immunomodulation associée à la grossesse sur les maladies auto-immunes

Les modifications de la réponse immunitaire qu'apporte la grossesse ont un effet important chez les personnes atteintes de maladies auto-immunes. Pour certaines maladies, la grossesse amène une rémission tandis que pour d'autres, elle peut induire une rechute. Chez les femmes atteintes d'arthrite rhumatoïde (AR), une rémission de la maladie est observée dans 75% des cas, la majorité survenant à partir de la mi-gestation et au 3^e trimestre [133]. Les femmes atteintes de sclérose en plaques (SEP) sont également majoritairement en rémission au cours du dernier trimestre de leur grossesse [134]. À l'inverse, les patientes atteintes de lupus

érythémateux disséminé (LED) présentent généralement une rechute lorsqu'elles sont enceintes [99]. Une observation intéressante à noter est la rémission observée pour les maladies auto-immunes associées à une réponse T_H1 , telles que l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, tandis qu'une rechute survient pour les maladies associées à une réponse T_H2 , tel que le lupus érythémateux disséminé [135]. Chez les patientes atteintes de LED, les auto-anticorps dirigés contre l'ADN ont un rôle pathologique [99]. Le fait de favoriser la réponse T_H2 pendant la grossesse peut mener à une exacerbation de la production de ces auto-anticorps qui peut être néfaste pour la patiente [99]. La polarisation vers une réponse T_H2 favorisée au détriment de la réponse T_H1 semble ainsi un facteur clé dans la rémission. Aussi, le nombre de Tregs semble être un élément nécessaire à la rémission, car celui-ci a pu être corrélé avec une atténuation des symptômes chez les patients atteints de AR [136]. Puisque la rémission est généralement observée pendant le 3^e trimestre une implication des estrogènes et de la progestérone peut être suspectée, car leurs concentrations sont fortement augmentées à ce moment [120]. Il est toutefois à noter que la charge en antigènes fœtaux paternels est également augmentée pendant cette période. Autant la présence du fœtus que les hormones peuvent donc avoir un rôle à jouer sur la rémission de certaines maladies auto-immunes pendant la grossesse.

Bien que dans plusieurs cas, une rémission de la maladie se produise pendant la grossesse, les patientes doivent être suivies de près puisque, selon le trimestre, une rechute est tout de même envisageable et certaines complications associées à la grossesse sont fréquemment observées [99]. De plus, après l'accouchement (*post-partum*), ces femmes doivent encore être suivies de près puisque celles-ci vont fréquemment subir une rechute de la maladie. Dans 90% des cas de AR, une rechute se produit dans les 6 mois suivant l'accouchement [133].

1.8 Observations rapportées chez la femme enceinte atteinte d'hépatite auto-immune

Autrefois on croyait que la grossesse représentait un risque important pour les femmes atteintes d'HAI. Il n'était donc pas conseillé à ces femmes d'entreprendre une grossesse. Grâce à l'amélioration des traitements de l'HAI survenue au cours des dernières années, il est maintenant fréquent de voir des femmes enceintes atteintes d'HAI. Certaines complications chez ces patientes sont toutefois à considérer, autant pour le bébé que pour la mère. Les risques associés au bébé incluent la perte du fœtus, la naissance prématurée, ainsi que le faible poids à la naissance [137]. Un des risques les plus importants pour la mère est la pré-éclampsie [137, 138]. En général des complications sont plus fréquemment observées lorsque l'état hépatique de la mère n'est pas stable au moment de la conception [137]. Les femmes atteintes d'HAI ont souvent plus de difficultés à devenir enceintes, ce qui peut être une conséquence de l'oligoménorrhée/aménorrhée (menstruations faibles ou absentes) ou de l'anovulation observée chez certaines patientes [138, 139]. Les risques accrus pour la mère et le fœtus, ont ainsi portés les médecins à suivre de près ces grossesses.

Malgré les risques présents, la grossesse peut avoir un impact positif sur la réponse auto-immune chez les patientes atteintes d'HAI. Dans la majorité des cas, une rémission de la maladie est observée pendant la grossesse, se traduisant par une baisse des niveaux de transaminases sériques et une diminution de l'inflammation hépatique [138]. Les mécanismes impliqués dans cette rémission ne sont pas connus à ce jour. On peut suspecter les différents mécanismes de tolérance observés pendant la grossesse, en réponse au fœtus et à l'augmentation des hormones, d'être responsables de cette rémission [137]. Au cours du premier trimestre de la grossesse, les patientes présentent ainsi parfois une rechute, tandis qu'une rémission survient fréquemment chez celles-ci à partir de second trimestre [137]. Dans la plupart des cas, cette rémission est temporaire et elle est suivie d'une rechute suite à l'accouchement (*post-partum*). Une étude montre un taux de rechute *post-partum* atteignant les 86% (12 patientes en rechute sur 14 suivies) [138]. Une HAI peut également se développer suite à l'accouchement chez des femmes n'ayant jamais présenté de symptôme de la maladie auparavant [138, 140].

L'allaitement serait potentiellement un facteur qui influence la rechute *post-partum*. Un effet de la prolactine sur la réponse immunitaire est ainsi suspecté et pourrait avoir des conséquences néfastes chez les personnes atteintes de maladies auto-immunes. La prolactine est une hormone impliquée dans la synthèse du lait maternel [141]. L'allaitement n'est pas conseillé chez ces patients, entre autre en raison du rôle potentiel de la prolactine sur la réponse immunitaire.

L'azathioprine est considéré comme un traitement sécuritaire, pouvant être administré pendant la grossesse. Toutefois, dans la majorité des cas, la thérapie peut être interrompue puisqu'une rémission est généralement observée à partir du second trimestre [142]. Des études suggèrent un effet néfaste de l'azathioprine pour le fœtus chez le lapin, mais aucune donnée ne supporte cette affirmation pour le fœtus humain [140]. En raison de contraintes éthiques, il est difficile de bien étudier l'effet des médicaments chez les femmes enceintes. Les données permettant de déterminer si l'azathioprine est sécuritaire pendant la grossesse proviennent donc d'études rétrospectives compilant des cas de femmes enceintes accidentellement exposées au médicament [142]. Certains cliniciens vont ainsi favoriser un traitement composé uniquement de prednisone, puisqu'une incertitude demeure présente quant aux risques de l'azathioprine pour le fœtus. Le traitement est souvent fortement augmenté après l'accouchement, afin de prévenir la rechute *post-partum*, et une portion de l'azathioprine est sécrétée dans le lait maternel, soit 1,2% de la dose absorbée [139]. Cette dose retrouvée dans le lait ne semble pas avoir d'effet néfaste pour l'enfant allaité, mais peut certainement influencer la décision prise relative au choix de l'allaitement [139].

L'immunomodulation se produisant pendant la grossesse semble avoir également un effet sur les hépatites virales. En effet, les mécanismes de tolérance induits par la grossesse semblent favoriser la réplication du virus. On observe ainsi chez les femmes chroniquement infectées par le virus de l'hépatite C (HCV) une augmentation de la charge virale pendant la grossesse, ainsi qu'une diminution des niveaux de transaminases sériques [143].

1.9 Hypothèse et objectifs

1.9.1 Hypothèse

Les mécanismes impliqués dans la rémission temporaire de l'HAI observée pendant la grossesse ne sont pas connus à ce jour. La présence du fœtus et les modifications hormonales semblent influencer la réponse immunitaire de façon bénéfique chez les patientes enceintes atteintes d'HAI. Les mécanismes de tolérance associés à la grossesse tels que la polarisation T_H2 , la proportion de cellules T régulatrices augmentée, la présence de cytokines régulatrices et les cellules dendritiques ayant un phénotype tolérogène pourraient être responsables de cette rémission.

1.9.2 Objectifs

Le premier objectif de ce travail de maîtrise est donc d'abord de reproduire le phénomène de rémission spontanée observé pendant la grossesse et de rechute *post-partum* dans un modèle murin d'HAI de type II développé par notre laboratoire (modèle par xéno-immunisation à l'aide du plasmide pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD codant pour les antigènes humains de l'HAI).

Le deuxième objectif est de déterminer les mécanismes impliqués dans cette rémission temporaire de l'HAI pendant la grossesse à l'aide du modèle murin d'HAI. En connaissant les mécanismes qui favorisent la rémission chez les patientes enceintes atteintes d'HAI, ceux-ci pourraient ultimement être exploités afin de développer des thérapies plus spécifiques que les traitements actuels composés d'immunosuppresseurs non-spécifiques.

Ces deux objectifs vont ainsi étudier l'effet de la grossesse sur l'HAI. En parallèle, différents paramètres de la grossesse seront comparés entre des souris avec une HAI et des souris saines gestantes afin d'étudier l'impact de l'HAI sur la grossesse.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODE

2.1 Modèle murin d'HAI de type II

Des souris C57BL/6 femelles âgées de 6 à 7 semaines (Charles River, Montréal, Canada) ont été injectées avec le plasmide pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD codant pour une protéine chimérique comprenant les deux auto-antigènes humains associés à l'HAI de type 2 [65]. Ce plasmide a été co-injecté avec le plasmide pVR-IL-12 afin d'induire une réponse T_H1 , fourni par le Dr G. Prud'homme (Montréal, Canada). Les souris ont été immunisées à trois reprises, à deux semaines d'intervalle, à raison de 100 µg de chaque plasmide par souris, dans un volume total de 100 µl de DPBS (Life Technologies, États-Unis). L'injection a été faite par voie intramusculaire au niveau du muscle *tibialis cranialis*. Les plasmides utilisés pour l'immunisation ont été reproduits à plusieurs reprises à l'aide de la trousse « Endofree Plasmid Giga kit » (Qiagen, Santa Clarita, CA), à partir d'aliquots conservés à -80°C de bactéries transformées exprimant chacun des plasmides. Un groupe de souris contrôles, soit des souris n'ayant pas été injectées avec le plasmide, a également été utilisé à des fins de comparaison. Ces souris avaient le même âge que les souris immunisées au moment de l'expérimentation. Les animaux utilisés ont été manipulés selon les lignes directrices du Conseil Canadien de la Protection des Animaux (CCPA). Le protocole a été approuvé par le Conseil Institutionnel de Bonnes Pratiques Animales en Recherche du CHU Sainte-Justine.

2.2 Suivi des marqueurs d'HAI de type II

2.2.1 Mesure des niveaux d'enzymes hépatiques de type transaminases en circulation

Les niveaux d'alanine aminotransférases (ALT) ont été suivis mensuellement à partir du mois suivant la dernière injection de plasmides, jusqu'au moment du sacrifice des souris, afin de suivre le degré de dommage hépatique. Les sérums ont été recueillis après centrifugation (1500 x g, 10 minutes) de prélèvements sanguins effectués au niveau de la queue, ou de ponctions cardiaques lorsque les souris ont été sacrifiées. Le dosage des ALT de ces sérums a été fait à l'aide de l'appareil Beckman Synchron CX9.

2.2.2 Mesure des anticorps et des auto-anticorps

Les anticorps dirigés contre la protéine chimérique CYP2D6-FTCD, les auto-anticorps dirigés contre la FTCD murine (mFTCD) et les IgG totaux ont été titrés à partir des sérums, à l'aide d'un test ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) de type indirect.

2.2.2.1 Purification des protéines CYP2D6-FTCD et mFTCD

L'antigène qui a été fixé au fond des plaques ELISA permettant la détection des anticorps est la protéine chimérique CYP2D6-FTCD, produite à partir d'une culture de bactéries BL21 transformées portant le plasmide pMal-CYP2D6-FTCD [144]. Une purification par un système de « *maltose binding protein* » (MBP) a donc été effectuée. Les bactéries transformées ont ainsi été mises en culture dans un bouillon Luria-Bertani (LB) (1% peptone, 0,5% d'extrait de levure et 1% de NaCl) contenant 0.1mg/ml d'ampicilline (Multicell, Woonsocket, RI) à 37°C avec agitation pendant toute une nuit. La culture a été diluée 1/1000 puis elle a été ré-incubée pendant 2 heures et demi. Le synthèse de la protéine a par la suite été induite pendant 1 heure et demi à 37°C par l'ajout de 0.3 mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Multicell, Woonsocket, RI). Les cellules ont été récoltées par centrifugation (2000 x g pendant 10 minutes) et resuspendues dans du tampon de lyse (10mM NaPO₄, 0.5M NaCl, 0.25% Tween 20, 10mM EDTA, 10mM EGTA), puis congelées à -80°C jusqu'au lendemain. La solution de bactéries a ensuite été décongelée, soniquée puis centrifugée 20 minutes à 4°C à 14 000 x g. Le surnageant, contenant la protéine d'intérêt, a été dilué 1/5 dans du tampon de colonne (tampon phosphate de sodium pH 7.2 contenant 10mM NaCl et 0.25% Tween 20) puis passé à travers une colonne d'amylose (New England Biolabs, Canada). La colonne a été lavée avec 5 à 10 volumes de tampon de colonne puis éluée avec une solution de PBS contenant 10mM de maltose.

L'auto-antigène utilisé afin de détecter les auto-anticorps est la protéine FTCD murine (mFTCD). Des bactéries BL21 transformées pour exprimer le plasmide pET30c-mFTCD ont été mises en culture dans un bouillon LB contenant 0.1mg/ml de kanamycine (Multicell, Woonsocket, RI) à 37°C avec agitation pendant toute une nuit. La synthèse de la protéine a ensuite été induite pendant 5 heures à 37°C avec agitation par l'ajout d'IPTG (Multicell, Woonsocket, RI) à une culture diluée 1/50 1 heure auparavant. Les cellules ont ensuite été

récoltées par centrifugation (2000 x g pendant 10 minutes) puis congelées à -80°C jusqu'au lendemain. Les cellules ont été décongelées puis lysées par l'ajout de tampon NPI₁₀ (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM d'imidazole) contenant 10mg/ml de lysozyme (Sigma Aldrich, Canada) et par sonication. Le lysat bactérien a par la suite été centrifugé 30 minutes à 4°C à 15 000 x g afin d'en récolter le surnageant contenant la protéine d'intérêt, qui a ensuite été dilué 1/10 dans du tampon NPI₁₀. La protéine a été purifiée sur une colonne « NI-NTA Superflow » (QIAGEN, Santa Clarita, CA) par un système de tag histidine selon le protocole du manufacturier. Le lavage de la colonne s'est fait dans du tampon NPI₂₀ (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM d'imidazole) et l'élution avec du tampon NPI₂₅₀ (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM d'imidazole).

La protéine mFTCD utilisée pour les tests de lymphoprolifération, de pureté supérieure, a été purifiée par un système MBP tel que décrit pour la protéine chimérique.

2.2.2.2. Dosage des protéines CYP2D6-FTCD et mFTCD

Les éluats recueillis des colonnes ont été concentrés par centrifugation à 1500 x g pendant 10 minutes sur un filtre de cellulose Amicon (Millipore, Carrigtwohill, Irlande). Les protéines concentrées ont ensuite été dosées par la méthode de Bradford. Une courbe standard en quatre points d'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma Aldrich, Canada) allant de 2.5µg/ml à 10µg/ml a été effectuée dans une solution de NaCl 0.15M. Les protéines ont été diluées 1/20 et 1/50 en duplicatas. Un millilitre de solution de Bleu de Coomassie (0.01% p/v Bleu de Coomassie G-250, 4.75% éthanol, 8.5% acide phosphorique) a été ajouté à 100µl de chaque dilution et des protéines diluées. Les densités optiques (D.O.) mesurées à 595nm à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman DU 640 (Beckman, Mississauga, Canada) ont permis la quantification des protéines.

2.2.2.3 Gel SDS-PAGE

Afin de vérifier la pureté des protéines purifiées, celles-ci ont été analysées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Un gel d'acrylamide 10% a été préparé à partir d'acrylamide/Bis 37.5 :1 (Biorad, Mississauga, Canada), selon les directives du fabricant. Environ 2 µg de protéines ont été chauffés à 100°C pendant 5 minutes puis chargés dans les puits du gel. La migration s'est fait sous une tension de 75V pendant 3 heures. Les protéines ont été fixées sur le gel par

une incubation de 15 minutes dans une solution de fixation (25% isopropanol, 10% acide acétique), puis colorées au bleu de Coomassie (Biorad, Mississauga, Canada) pendant 30 minutes. Le gel a ensuite été décoloré dans de l'acide acétique 10% pendant toute une nuit, puis sécher afin d'être conservé.

2.2.2.4 Titrage des anticorps anti-CYP2D6-FTCD et des auto-anticorps anti-mFTCD par ELISA indirect

L'antigène ou l'auto-antigène (protéine CYP2D6-FTCD ou mFTCD) a été fixé au fond des puits d'une plaque à 96 puits, à raison de 0.2 µg par puits dans un volume de 100 µl par puits de solution de NaHCO₃ 0.1M à pH 8.6, puis conservé à 4°C pendant une nuit. Afin d'empêcher la liaison des anticorps à des sites non-spécifiques, la solution se trouvant dans les puits a par la suite été remplacée par une solution de blocage, soit une solution de NaHCO₃ 0.1M à pH 8.6 contenant 5 mg/ml d'albumine bovine sérique (BSA) (Sigma Aldrich, Canada), et a été incubée à 4°C pendant 2 heures. Les puits ont ensuite été lavés 6 fois avec une solution TBST 1X à pH 7.4 (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20). Les sérums de souris ont ensuite été déposés dans les puits de façon à obtenir des dilutions en série allant de 1/100 à 1/12 800, dans du TBST 1X contenant 5 mg/ml de BSA, pour une incubation de 2 heures à température pièce. Les puits ont ensuite été lavés de nouveau 6 fois avec une solution TBST 1X à pH 7.4. Un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (Jackson, Canada) dilué 1/500 dans du TBST 1X contenant 5 mg/ml de BSA a ensuite été ajouté aux puits de la plaque, qui a été incubée à température pièce pendant une heure. Les puits ont ensuite été lavés à nouveau tel que décrit ci-haut, avant d'appliquer une solution de révélation contenant 0.05M de tampon sodium carbonate/bicarbonate à pH 9.8, 0.001M de MgCl₂ et 1 mg/ml de substrat de la phosphatase alcaline (p-nitrophénylphosphate (PNPP)) (Sigma Aldrich, Canada). La plaque a été incubée avec sa solution de révélation pendant 30 à 60 minutes à température pièce et à la noirceur, jusqu'à ce que le contrôle positif atteigne un titre prédéterminé. La densité optique (D.O.) du contenu des puits a été prise à 405 nm à l'aide du lecteur de plaque Tecan Spectra Rainbow. Une correction pour l'absorbance du plastique de la plaque a été appliquée aux données en soustrayant la D.O. à 570 nm de la mesure prise à 405 nm. Les titres attribués correspondaient au facteur de dilution auquel la D.O. était

supérieure au double de la densité optique du contrôle négatif, soit un sérum de souris C57BL/6 n'ayant pas été immunisée.

2.2.3 Mesure des IgG totaux et détermination des isotypes

2.2.3.1 Dosage des IgG totaux

Les IgG totaux ont été dosés dans le sérum des souris par ELISA. Les sérums ont d'abord été pré-dilués 1/100 dans du NaHCO₃ 0.1M pH 8.6 puis dilués en série afin d'obtenir des concentrations finales allant de 1/1000 à 1/128 000 dans 50 µl. Un standard d'IgG (Sigma Aldrich, Canada) d'une concentration de 1mg/ml a été également dilué de 1/100 à 1/12 800. Les sérums et le standard dilués en série ont été incubés à 4°C pendant une nuit dans une plaque ELISA afin de permettre la fixation des anticorps au fond de la plaque. Un blocage des liaisons non-spécifiques a été fait en remplaçant le surnageant des dilutions par la solution de blocage (NaHCO₃ 0.1M à pH 8.6 contenant 5mg/ml de BSA) suivi d'une incubation de 2 heures à 4°C. Les lavages, l'incubation avec l'anticorps secondaire et la révélation par ajout du substrat de la phosphatase alcaline ont été effectués tels que décrits en 2.2.2.2. La concentration en IgG des sérums a été déterminée à l'aide de la courbe standard.

2.2.3.2 Détermination des isotypes des IgG totaux

Les sérums ont été dilués 1/16 000 puis incubés à 4°C pendant toute une nuit dans une plaque ELISA en duplicatas. Deux anticorps secondaires différents ont été utilisés séparément à une dilution 1/500, soit un anti-IgG1 et un anti-IgG2a de souris couplés à la phosphatase alcaline (Santa Cruz Biotechnology, Santa-Cruz, CA). L'anti-IgG2a utilisé reconnaît également l'isotype IgG2c exprimé chez la souris C57BL/6 qui n'exprime pas l'IgG2a. La révélation ainsi que la lecture des plaques se sont déroulés tel que précédemment décrits. Un ratio IgG1/IgG2c a été déterminé à partir des D.O. moyennes obtenues après 30 minutes de révélation.

2.3 Accouplement des souris

Les souris ont été accouplées 6 mois suivant la dernière injection de pCMV-CTLA4-2D6-FTCD et pVR-IL-12 (figure 1). Les souris contrôles n'ayant pas été immunisées ont été accouplées à un âge équivalent à celui des souris immunisées. L'accouplement a été effectué avec des mâles C57BL/6 (croisement syngénique) ou C3H (croisement allogénique) âgés au minimum de 10 semaines (Charles River, Montréal, Canada). Les souris femelles étaient disposées dans une cage où se trouvait un mâle, à raison de une ou deux femelles par mâle, pendant une à deux semaines. Afin de s'assurer de la réussite de l'accouplement, la présence de bouchons vaginaux a été vérifiée quotidiennement par le personnel animalier. Une certaine proportion des souris n'était pas mise en accouplement afin de pouvoir comparer les résultats entre souris gestantes et non-gestantes.

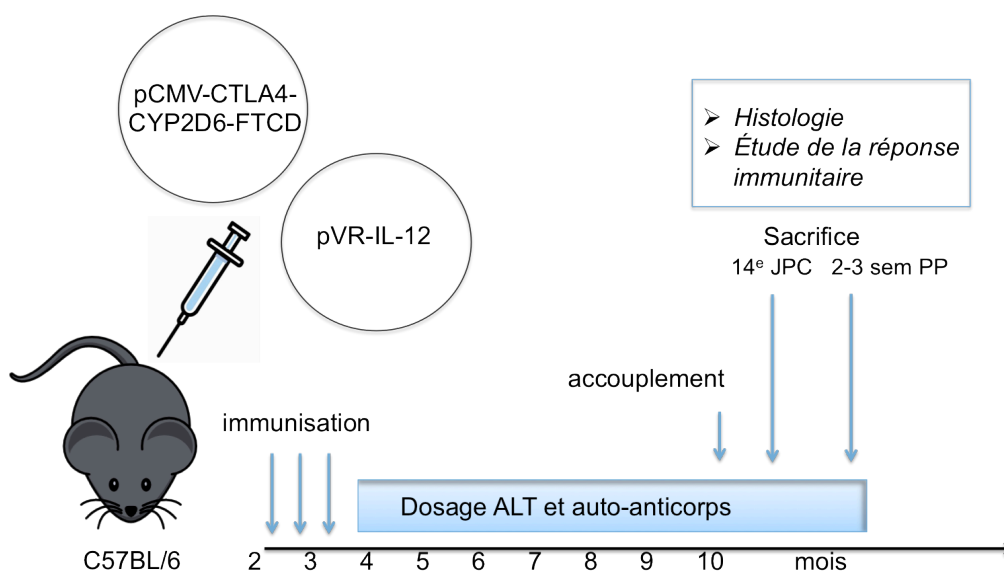


Figure 3 : Schématisation du protocole d'expérimentation pour l'étude de l'impact de la grossesse sur l'HAI. Les souris ont d'abord été immunisées à trois reprises avec le plasmide codant pour les antigènes humains de l'HAI. Un suivi de l'évolution de l'HAI a été fait dans les 6 mois suivant l'immunisation, puis les souris ont été accouplées. Elles ont été sacrifiées au début du dernier tiers de la gestation (14 jours post-conception) pour en faire l'étude de l'inflammation hépatique et de la réponse immunitaire.

2.4 Sacrifice des souris

La durée de la gestation chez une souris est d'environ 3 semaines. Les souris ont donc été sacrifiées autant que possible au début de la 3^e semaine de gestation (14 jours post-conception, soit 2 semaines suivant la présence du bouchon vaginal), qui a en quelques sortes été associé au début du 3^e trimestre chez la femme. Il s'agit du moment où une rémission de la maladie est généralement observée.

Les souris ont premièrement été mises sous anesthésie générale par injection intra-péritonéale de 5,5 mg de pentobarbital sodique par souris (CEVA Santé Animale, Canada), puis une ponction du sang au niveau du coeur a été effectuée pour induire la mort des souris, à l'aide d'une seringue contenant de l'EDTA et une aiguille 26G 5/8. Les plasmas recueillis des ponctions cardiaques ont pu être utilisés pour des dosages d'ALT, d'anticorps, d'auto-anticorps, des IgG ainsi que pour la détermination des isotypes de ces derniers, tels que décrit précédemment. Le foie et la rate des souris ont ensuite été prélevés de façon stérile pour en isoler les cellules. Les fœtus ont également été recueillis des cornes utérines afin de les compter, de les mesurer et de déterminer le nombre de fœtus résorbés. Certaines souris ont été sacrifiées en période *post-partum*, soit 2 à 3 semaines suivant l'accouchement, afin de voir si une rechute se produit. Différents paramètres de l'accouchement ont été comparés entre les souris HAI et les souris saines du même âge (groupe contrôle). Le nombre de bébés et leur poids ainsi que les complications à l'accouchement ont été notés. Parmi les complications observées se trouvent les dystocies, soit la difficulté de la mère à accomplir le travail mécanique nécessaire à la sortie des bébés, pour lesquelles une dose d'oxytocine a été administrée afin de favoriser les contractions.

2.5 Histologie du foie

Afin de comparer le niveau d'inflammation au foie des souris gestantes et des souris non-gestantes, une portion du foie prélevé des souris a été utilisée pour des fins d'histologie. Les morceaux de foie ont été déposés dans une solution de formaline 10% (Sigma Aldrich, Canada) pendant plus de 24h afin de fixer le tissu. Les étapes d'inclusion, de coupe et de coloration HES (hématoxyline, éosine et safran) ont été effectuées par le service de pathologie du CHU Sainte-Justine. Les lames histologiques étaient ensuite observées au microscope à

l'aveugle par deux observateurs afin d'attribuer un score histologique selon la score Ishak, en fonction du nombre d'infiltrations lymphocytaires. Les scores ont été déterminés par le Dr. Fernando Alvarez.

2.6 Étude de la réponse immunitaire

Isolation des lymphocytes de la rate

Les rates ont été déposées dans du RPMI (Life technologies, USA), coupées en petits morceaux, puis triturées à l'aide du piston d'une seringue, pour finalement dissocier les amas en faisant passer la solution dans une seringue ayant une aiguille de grosseur 26G. Après centrifugation des cellules à 1000 x g pendant 5 minutes, les cellules ont été resuspendues dans une solution de lyse froide (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA) puis incubées pendant 5 minutes à température pièce, afin de lyser les globules rouges. La solution de lyse contenant les cellules a ensuite été diluée avec 1 volume de RPMI (Life technologies, USA), puis centrifugée (1000 x g, 5 minutes). Deux lavages ont ensuite été effectués en resuspendant les culots de cellules dans du RPMI et en les centrifugeant par la suite (1000 x g, 5 minutes). Après les lavages, les cellules ont été resuspendues dans 5ml de RPMI complet (RPMI-1640, penicilline/streptomycine/neomycine 1X, 10% SVF, 50uM β-mercaptoéthanol). Elles ont ensuite été dénombrées à l'aide d'un hémacytomètre, par coloration au bleu de trypan (Sigma Aldrich, Canada).

Isolation des lymphocytes du foie

Les foies ont été déposées dans du RPMI complet, coupées en petits morceaux, puis triturées à l'aide du piston d'une seringue, pour enfin filtrer le tout à l'aide d'un tamis ayant des pores de 100 µm. Une digestion à la collagénase IV (Sigma Aldrich, Canada) a ensuite été effectuée afin de libérer le maximum de cellules, à raison de 3mg de collagénase par foie, incubé pendant 10 minutes à 37°C. Les lymphocytes ont ensuite été isolés des autres cellules du foie à l'aide d'un gradient discontinu de Percoll 40% et 80% (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada), par centrifugation à 1500 x g pendant 20 minutes. Les cellules récoltées à l'interface du gradient ont ensuite été lavées au DPBS. Les globules rouges ont été lysés de la suspension cellulaire selon la méthode décrite précédemment. Les lymphocytes ont finalement été

resuspendus dans 1 ml de RPMI complet et dénombrée à l'aide d'un hémacytomètre, par coloration au bleu de trypan.

2.6.1 Identification des cellules T_H1 et T_H2

2.6.1.1 Profil T_H1/T_H2 en fonction des cytokines produites par les lymphocytes T CD4⁺

Les cellules extraites du foie et de la rate ont d'abord été stimulées afin de produire des cytokines. Un million de lymphocytes du foie et 4 millions de lymphocytes de la rate ont été stimulées *in vitro*, grâce à une incubation à 37°C avec 5% de CO₂ dans du RPMI complet contenant au final 0.74 µg/ml d'ionomycine (Sigma Aldrich, Canada) et 0.02 µg/ml de phorbol myristate acétate (PMA) (Sigma Aldrich, Canada), pendant 5 heures. Afin de retenir les cytokines produites au niveau du cytoplasme, de la Brefeldin A (BFA) (Sigma Aldrich, Canada) a été ajoutée au milieu à raison de 1 µg/ml, 1 heure suivant le début de l'incubation. Les cellules ont ensuite été marquées en surface pour la cytométrie, avec 0.125 µg d'anti-CD4/APC (EBioscience, clone RM4-5) et d'anti-CD8/PerCP-Cy5.5 (EBioscience, clone 53-6.7) pendant 30 minutes à 4°C à la noirceur. Après fixation et perméabilisation des cellules (EBioscience, CA), un blocage des récepteurs Fc a été effectué par incubation avec 2 µg d'anti-CD16/32 (EBioscience, CA) pendant 15 minutes à 4°C dans la noirceur. Un marquage intracellulaire des cytokines retenues au cytoplasme a ensuite été fait en incubant les cellules avec 0.125 µg d'anti-IL-10/PE (EBioscience, clone JES5-16E3) et 0.250 µg d'anti-IFN-γ/FITC (EBioscience, clone XMG1.2) dans une réaction, puis 0.250 µg d'anti-IL-2/FITC (EBioscience, clone JES6-5H4) et 0.125 µg d'anti-IL-4/PE (EBioscience, clone 11B11) dans une seconde réaction. L'IL-4 et l'IL-10 sont associées à une réponse de type T_H2 tandis que l'IL-2 et l'IFN-γ à une réponse T_H1. Afin de contrôler pour les liaisons non-spécifiques des anticorps ciblant les cytokines, un tube de cellules a été préparé où le même protocole de marquage était effectué pour des cellules n'ayant pas été mises en conditions de stimulation. L'analyse des résultats fournis par le FACS Calibur (BD, Mississauga, ON) a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo v.8.7 (Tree Star, Ashland, OR).

2.6.1.2 Mesure du niveau d'expression des facteurs de transcription exprimés par les cellules T_H1 et T_H2

2.6.1.2.1 Isolation de l'ARN des lymphocytes de la rate des souris

Les lymphocytes ont été isolés des souris tel que décrit précédemment. L'ARN a été purifié à partir d'un million de cellules, à l'aide de la trousse « RNeasy mini kit » (Qiagen, Santa Clarita, CA). Brièvement, les lymphocytes ont été homogénéisés dans un tampon de lyse, puis l'ARN a été purifié à l'aide des colonnes fournies par la trousse. Après 3 lavages de la colonne, l'ARN a été élué dans 50 µl d'eau RNase-Free. Afin de s'assurer qu'il n'y ait aucune contamination d'ADN, une digestion à la DNase a ensuite été effectuée pendant 1 heure à température pièce, à l'aide de la trousse « RNase-Free DNase Set » (Qiagen, Santa Clarita, CA).

2.6.1.2.2 RT-PCR semi-quantitatif à partir de l'ARN extrait des lymphocytes pour déterminer le niveau d'expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3.

Des RT-PCR semi-quantitatifs ont été effectués à partir de l'ARN isolé des lymphocytes à l'aide de la trousse « One Step RT-PCR » (Qiagen, Santa Clarita, CA). La réaction de transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) et la réaction d'amplification de cet ADNc sont faits en une seule réaction. Les amorces utilisées pour les molécules facteurs de transcription étaient concentrées à 50 pM, tandis que les amorces utilisées pour le contrôle interne d'actine étaient concentrées à 12.5 pM (voir séquences des amorces table V). La température d'hybridation pour les réactions de RT-PCR était de 55°C. 35 cycles d'amplification ont été effectués (table I). Les produits d'amplification de T-bet ont été mis sur gel d'agarose 1.5% avec bromure d'éthidium et ont migré pendant 1 heure sous une tension de 75V, tandis que les produits d'amplification de Gata-3 ont été mis sur gel 2.5% et ont migré pendant 1 heure et demie à 60V. La quantification de bandes amplifiées a été faite grâce au logiciel Gel Pro Analyser 3.1 (Cybernetics, Rockville, MD), par comparaison avec la bande du contrôle interne d'actine.

2.6.2 Analyse des lymphocytes T régulateurs

2.6.2.1 Détermination du pourcentage de cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

Un marquage pour la cytométrie en flux a été effectué à l'aide de la trousse « Mouse regulatory T cell staining kit » (EBioscience, CA) afin de déterminer le pourcentage de cellules T régulatrices se trouvant à la rate et parmi les lymphocytes infiltrant le foie. Ainsi, un million de cellules ont premièrement été incubées pendant 30 minutes à 4°C à la noirceur avec 0.125 µg d'anticorps anti-CD4/FITC (EBiosciences, clone RM4-5) ou d'anti-CD4/APC-eFluor 780 (EBioscience, clone GK1.5) et 0.120 µg d'anticorps anti-CD25/APC ou anti-CD25/PerCP-Cy5.5 (EBiosciences, clones PC61.5). Après perméabilisation et fixation, les cellules ont été marquées au niveau intranucléaire avec un anticorps anti-Foxp3/PE (EBioscience, clone FJK-16s) à raison de 0.5 µg d'anticorps par million de cellules, pendant 45 minutes à 4°C à la noirceur. Afin de minimiser les liaisons non-spécifiques, un blocage des récepteurs Fc a été effectué grâce à une pré-incubation avec l'anticorps anti-CD16/32 (EBioscience, clone 93). Un contrôle isotypique (EBioscience, rat IgG2a clone eBR2a) était également inclus à chaque expérience afin de déterminer les populations négatives et positives pour le facteur de transcription Foxp3. Les cellules marquées ont été passées au cytomètre en flux FACS Calibur (BD, Mississauga, ON) ou FACS FortessaLSR (BD, Mississauga, ON) pour ensuite être analysées grâce au logiciel FlowJo v.8.7 (Tree Star, Ashland, OR).

2.6.2.2 Caractérisation des cellules T régulatrices CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Tregs exprimant le récepteur de chimiokine CXCR3

L'expression du récepteur de chimiokines CXCR3 a été étudiée puisque l'expression de ce récepteur à la surface des Tregs favorise la migration vers un site inflammé lorsque ce dernier exprime le(s) ligand(s) (tel que le foie) [145]. Pour ce faire, 0.25 µg d'anticorps anti-CXCR3/PerCP-Cy5.5 (EBioscience, clone CXCR3-173) a été ajouté à la solution de marquage de surface ciblant CD4 et CD25 décrite plus haut.

Tregs exprimant la cytokine TGF- β

Le TGF- β est une cytokine régulatrice de la réponse immunitaire produite entre autre par les Tregs [17]. Afin d'étudier la production de cette cytokine par les Tregs, les cellules ont premièrement été stimulées *in vitro* avec une solution d'ionomycine, de PMA et de brefeldine A, tel que décrit pour la stimulation des cytokines T_H1 et T_H2, puis un marquage des cellules T régulatrices a ensuite été effectué tel que décrit plus haut avec l'ajout de 0.5 μ g d'anticorps anti-TGF- β 1/Brilliant Violet 421 (Biolegend, clone TW7-16B4).

Tregs en division (KI67⁺)

Les cellules en division expriment la protéine nucléaire KI67 tandis que les cellules en arrêt de division ne l'expriment pas [146]. Afin de déterminer si les cellules T régulatrices présentes dans la rate et le foie prolifèrent, 0.125 μ g d'anticorps anti-KI67/PE-Cy7 (EBioscience, clone SolA15) a été ajouté à la solution de marquage intranucléaire lors du marquage des cellules T régulatrices tel que décrit plus haut.

Tregs thymiques et Tregs périphériques (expression du facteur de transcription helios)

En général, les Tregs thymiques expriment le facteur de transcription helios alors que les Tregs induits en périphérie ne l'expriment pas [6]. Afin d'étudier la proportion de Tregs thymiques, 0.125 μ g d'anticorps anti-helios/Alexa Fluor 647 (EBioscience, clone 22F6) a été ajouté à la solution de marquage intranucléaire lors du marquage des cellules T régulatrices décrit plus haut.

2.6.3 Test de lymphoprolifération

Dans le but de comparer la capacité des lymphocytes à proliférer en présence de l'auto-antigène entre les souris HAI gestantes et non-gestantes, un test de lymphoprolifération par dilution du CFSE a été effectué à partir des cellules isolées de la rate. Un million de cellules ont été marquées avec du carboxyfluorescéine diacétate succinimidyl ester (CFDA-SE) (Invitrogen, Oregon, É-U) à une concentration finale de 5 μ m pendant 10 minutes à 37°C à la noirceur. Les cellules ont ensuite été lavées à trois reprises avec du DPBS 1X + 5% SVF, elles ont été resuspendues dans du RPMI complet contenant 40 U/ml d'IL-2 (Invitrogen, CA, É-U),

puis incubées pendant 48 à 72 heures avec 10 µg de protéine mFTCD. La protéine mFTCD étant couplée à la MBP, des cellules incubées avec seulement la MBP (10 µg) ont servi de contrôle afin de soustraire le pourcentage de prolifération basal des cellules. Un contrôle positif de prolifération a également été effectué en incubant des cellules avec 0.2 mg/ml de Concanavaline A (SIGMA, St-Louis MO, É-U). Les lymphocytes ont ensuite été récoltés puis marqués avec 0.2 µg d'anticorps anti-CD4/PE (EBioscience, clone GK1.5), 0.25 µg d'anti-CD8/PerCP-Cy5.5 (EBioscience, clone 53-6.7) et 0.126 µg d'anti-CD19/APC (EBioscience, clone EBio1D3). Les cellules ont été passées au cytomètre en flux FACS Calibur (BD, Mississauga, ON) et l'analyse des données recueillies a été effectuée avec le logiciel FlowJo v.8.7 (Tree Star, Ashland, OR).

2.6.4 Détermination des niveaux d'interleukine-10 (IL-10)

L'IL-10 est une cytokine régulatrice de la réponse immunitaire, produite entre autre par les cellules T_{H2} et les cellules T régulatrices [17]. Les niveaux d'IL-10 ont donc été mesurés du surnageant de culture des lymphocytes du foie et de la rate des souris en présence de l'antigène humain 2D6-FTCD et de l'auto-antigène murin FTCD. Les cellules ont été cultivées à raison de 50 000 (foie) à 100 000 (rate) cellules en duplicatas pendant 48 heures dans du RPMI complet contenant 40 U/ml d'IL-2 et 10 µg de protéine antigénique. Le surnageant a ensuite été récolté, puis un dosage de l'IL-10 a été fait grâce à un test ELISA de type sandwich, à l'aide de la trousse « Mouse IL-10 ELISA Ready-SET-Go » (EBioscience, CA). Les surnageants de culture ont été ajoutés aux puits sans être dilués et ont été incubés pendant 2 heures à température pièce. Une courbe standard allant de 31.25 pg/ml à 4000 pg/ml d'IL-10 a servi pour le dosage. L'ajout d'un anticorps anti-mouse IL-10 couplé à la biotine pendant 2 heures à température pièce, puis d'une solution d'avidine couplée à la peroxydase (HRP) pendant 30 minutes à température pièce a permis la détection de l'IL-10. La révélation s'est fait par l'ajout du substrat tetraméthylbenzidine (TMB). Les D.O. ont été prises à 450 nm après arrêt de la réaction de révélation, suite à l'ajout de H₂SO₄ 2N.

2.6.5 Détermination du pourcentage de cellules B productrices d'interleukine-10 (B10)

Les cellules extraites du foie et de la rate ont été stimulées afin de produire des cytokines. Un million de lymphocytes du foie et 2 millions de lymphocytes de la rate ont été stimulés *in vitro*, grâce à une incubation dans du RPMI complet contenant 1 µg/ml d'ionomycine (Sigma Aldrich, Canada), 0.1 µg/ml de PMA (Sigma Aldrich, Canada) et 20 µg/ml de BFA (Sigma Aldrich, Canada) à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 5 heures. Les cellules ont ensuite été marquées en surface pour la cytométrie, avec 0.3 µg d'anti-CD44/PerCP-Cy5.5 (EBioscience, clone 30-F11), 0.2 µg d'anti-CD19/FITC (EBioscience, clone eBio1D3) et bloquée au niveau des récepteurs Fc avec 2 µg d'anti-CD16/32 (EBioscience, CA), pendant 30 minutes à 4°C à la noirceur. Après fixation et perméabilisation des cellules (EBioscience, CA), un marquage intracellulaire de l'IL-10 a été fait en incubant les cellules avec 0.125 µg d'anti-IL-10/PE (EBioscience, clone JES5-16E3). Comme contrôle négatif pour la production d'IL-10, un tube de cellules a été préparé suivant le même protocole de marquage mais pour des cellules n'ayant pas été mises en conditions de stimulation. L'analyse des résultats fournis par le FACS Calibur (BD, Mississauga, ON) a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo v.8.7 (Tree Star, Ashland, OR).

2.6.6 Mesure du niveau d'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines au foie par PCR semi-quantitatif

2.6.6.1 Isolation de l'ARN du foie des souris

Au moment du sacrifice des souris, un morceau de foie a été congelé à -80°C. Ces morceaux ont été utilisés afin d'en extraire l'ARN, à l'aide de la trousse « RNeasy mini kit » (Qiagen, Santa Clarita, CA). Brièvement, 30 mg des foies congelés ont été homogénéisés, puis l'ARN a été purifié et digéré à la DNase tel que décrit précédemment. L'ARN a été dilué 1/10 (dans l'eau) comme solution de travail pour les réactions de RT-PCR.

2.6.6.2 RT-PCR semi-quantitatif à partir de l'ARN extrait de biopsies de foie pour déterminer le niveau d'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, VAP-1) et de chimiokines (IP-10, MIG).

Des PCR semi-quantitatifs ont été effectués sur l'ARN isolé des foies de souris à l'aide de la trousse « One Step RT-PCR » (Qiagen, Santa Clarita, CA) tel que décrit précédemment. La température d'hybridation pour les réactions d'amplification de ICAM-1, VCAM-1, MIG, IP-10 était de 55°C, tandis que la température pour l'amplication de VAP-1 était de 59°C. 27 cycles d'amplification ont été effectués pour les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, tandis que 30 cycles ont été effectués pour les chimiokines MIG et IP-10 et 35 cycles pour VAP-1 (table I). Les produits d'amplification de ICAM-1, VCAM-1, VAP-1 et MIG ont migré sur gel d'agarose 1% avec bromure d'éthidium pendant 1 heure à 75V, tandis que les produits d'amplification de IP-10 ont migré sur gel 2% pendant 1 heure et demie à 60V. La quantification a été faite à l'aide du logiciel Gel Pro Analyser 3.1 (Cybernetics, Rockville, MD), par comparaison avec la bande d'actine.

Table V: Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR semi-quantitatifs, température d'hybridation, nombre de cycles de dénaturation-hybridation-élongation et taille du fragment amplifié.

Molécule	Amorce	Température d'hybridation	Nombre de cycles	Longueur du fragment amplifié
ICAM-1 [147]	F : TCGGAGGATCACAAACGAAGC R : AACATAAGAGGCTGCCATCACG	55°C	27	432 pb
VCAM-1 [147]	F : CCTCACTTGCAGCACTACGGGCT R : TTTCCAATATCCTCAATGACGGG	55°C	27	441 pb
VAP-1 [147]	F: GGCGGCACCACTCAGA TTTC R: TGGGACTTTCTGGGGCAAG	59°C	35	539 pb
MIG [147]	F : GACATTCTCGGACTTCACTC R : GATTCAGGGTGCTTGTTGGT	55°C	30	467 pb
IP-10 [147]	F : GTGCTGCCGTCATTTTCTGC R : CCGGATTCAGACATCTCTGC	55°C	30	221 pb
T-bet [148]	F :GCCAGGGAACCGCTTATATG R :GACGATCATCTGGGTCACATTGT	55°C	35	136 pb
Gata-3 [149]	F :TCTCACTCTCGAGGCAGCATGA R :GGTACCATCTCGCCGCCACAG	55°C	35	245 pb
β-actine [147]	F : GTTTGAGACCTTCAACACC R : CTTTTTGATGTCACGCACG	55-59°C	27-35	273 pb

2.7 Analyse statistique

L'analyse statistique des données a été effectuée grâce au logiciel GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Le test de t pairé a été utilisé afin de comparer les valeurs avant et pendant la gestation, tandis que le test de t non-pairés a été utilisé pour comparer les données entre un groupe de souris gestantes et un groupe de souris non-gestantes. Seules des analyses « tow-tailed » ont été effectuées. Un test de chi-carré a été utilisé afin de comparer les paramètres associés à la grossesse entre les souris saines et les souris HAI. Une valeur de « p » inférieure à 0.05 pour ces tests a été considérée comme une différence significative.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Effet de la gestation sur l'hépatite auto-immune

3.1.1 Comparaison de l'inflammation hépatique des souris HAI gestantes par rapport aux souris non-gestantes

Les souris ont été sacrifiées 14 jours post-conception, équivalant à 6.5 mois post-immunisation pour les souris non-gestantes. L'histologie de leur foie, par coloration hématoxyline/éosine/safran (HES) de coupes fixées, a permis de comparer le degré d'inflammation entre les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes. Le noyau des lymphocytes occupant une grande proportion de la cellule, celle-ci apparaît majoritairement violet (coloré par l'hématoxyline) contrairement aux hépatocytes dont le cytoplasme occupe une plus grande part de la cellule ce qui leur donne une couleur rosée dominante (coloré par l'éosine). Les infiltrations lymphocytaires ont pu être observées sur les coupes de foie, correspondant aux zones où se trouvent des cellules majoritairement colorées en violet. Les souris non-gestantes présentaient d'importantes infiltrations lymphocytaires au niveau portal et intralobulaire, contrairement aux souris gestantes qui ne présentaient que de minimes infiltrations intralobulaires (figure 4).

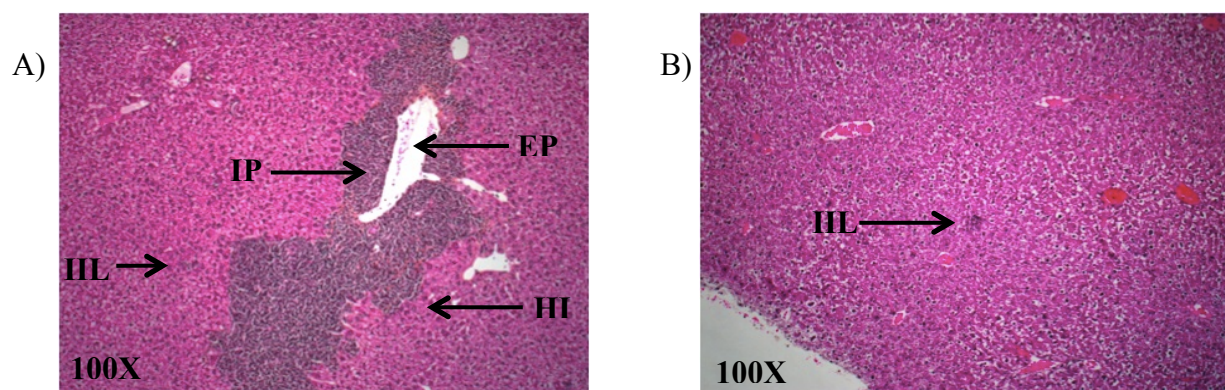


Figure 4: Infiltrations lymphocytaires au niveau du foie des souris HAI. A) Souris HAI non-gestante présentant d'importantes infiltrations portales (IP) et intralobulaires (IIL), ainsi qu'une hépatite d'interface (HI) EP : espace porte. B) Souris HAI gestante présentant de rares infiltrations intralobulaires (IIL). Grossissement 100X

Selon l'échelle de score histologique Ishak, les souris HAI non-gestantes se sont vues attribuées en moyenne un score d'inflammation de 3 tandis que les souris gestantes présentaient un score moyen inférieur à 1. Les souris HAI gestantes présentaient donc significativement moins d'inflammation au foie que les souris HAI non-gestantes ($p=0.0022$) (figure 5).

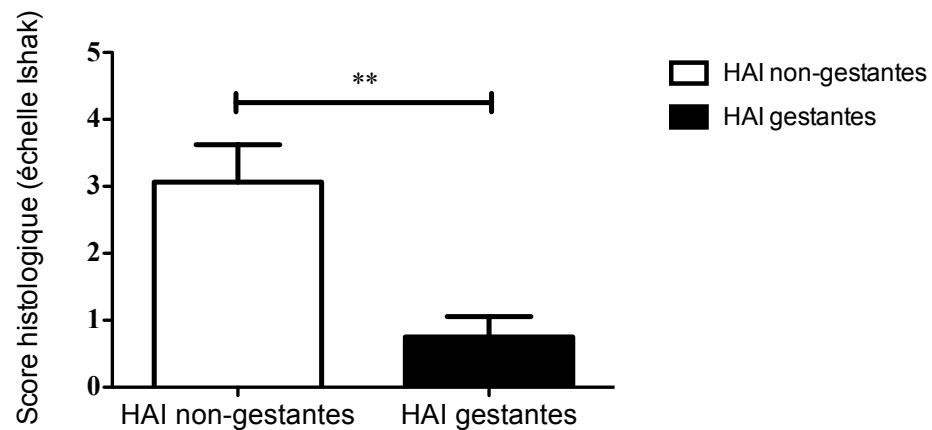


Figure 5: Scores histologiques attribués aux souris HAI par la méthode Ishak selon le degré d'inflammation. Score histologique des souris HAI non-gestantes (blanc, n=15) et des souris HAI gestantes à 14 jours post-conception (noir, n=12). Les résultats présentent la moyenne des scores pour chaque groupe avec leur erreur standard sur la moyenne. L'analyse statistique par test de t non-pairé indique une variation statistiquement significative ($p=0.0022$).

3.1.2 Détermination des niveaux de transaminases (ALT)

Les niveaux d'ALT ont été mesurés des sérums de souris recueillis mensuellement afin de suivre la progression du dommage hépatique. Les souris HAI non-gestantes ont montré une tendance à maintenir des niveaux d'ALT élevés comparativement à la normale pour une souris saine (environ 25 IU/L) de 5 à 6.5 mois post-immunisation. Les souris HAI gestantes pour leur part ont montré des niveaux d'ALT significativement diminués pendant la gestation comparativement aux niveaux mesurés avant la gestation pour ces mêmes souris (figure 6).

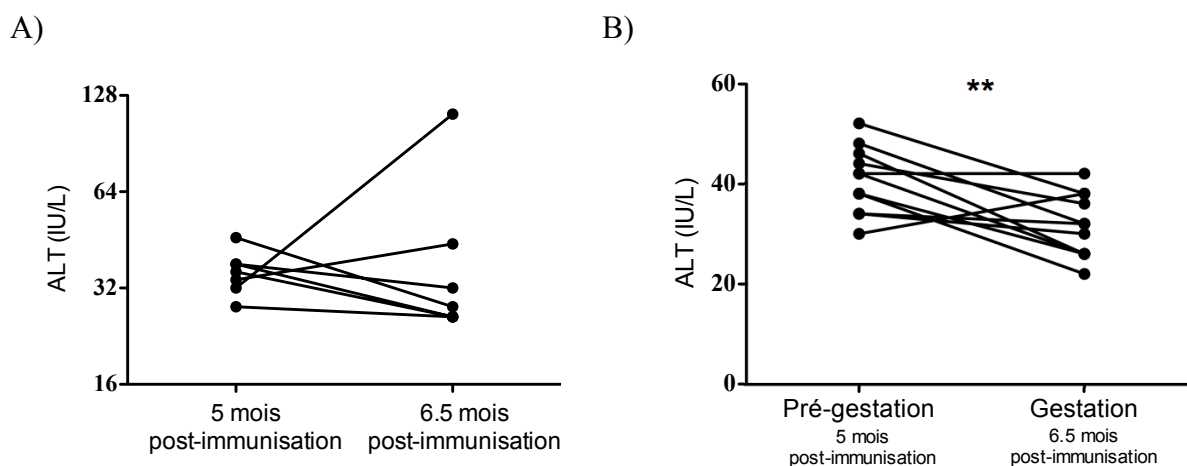


Figure 6: Niveaux d'ALT mesurés chez les souris HAI. A) Niveaux d'ALT mesurés dans les sérums des souris appartenant au groupe non-gestant (n=7) à 5 et 6.5 mois post-immunisation. B) Niveaux d'ALT mesurés avant et pendant la gestation des souris (n=11). Un test de t pairé a démontré une variation significative pour le groupe de souris gestantes ($p=0.0058$).

3.2 Détermination des niveaux d'anticorps

3.2.1 Détermination des niveaux d'auto-anticorps (anti-FTCD murine) en circulation

Les auto-anticorps ont été titrés à partir des sérums de souris recueillis mensuellement par ELISA afin de suivre le développement de la réponse humorale spécifique à l'auto-antigène. Les résultats sont exprimés en log en base 10 du titre (1/dilution), ce qui donne une valeur proportionnelle à la concentration des auto-anticorps. Les niveaux d'auto-anticorps du groupe

de souris non-gestantes étaient pratiquement les mêmes à 5 et 6.5 mois post-immunisation, soit 3.31 et 3.21 log du titre (figure 7). Les souris du groupe gestation pour leur part ont montré une diminution significative des auto-anticorps en circulation pendant la gestation comparativement aux niveaux mesurés avant la gestation, passant de 3.36 à 2.70 log du titre ($p=0.0004$) (figure 7).

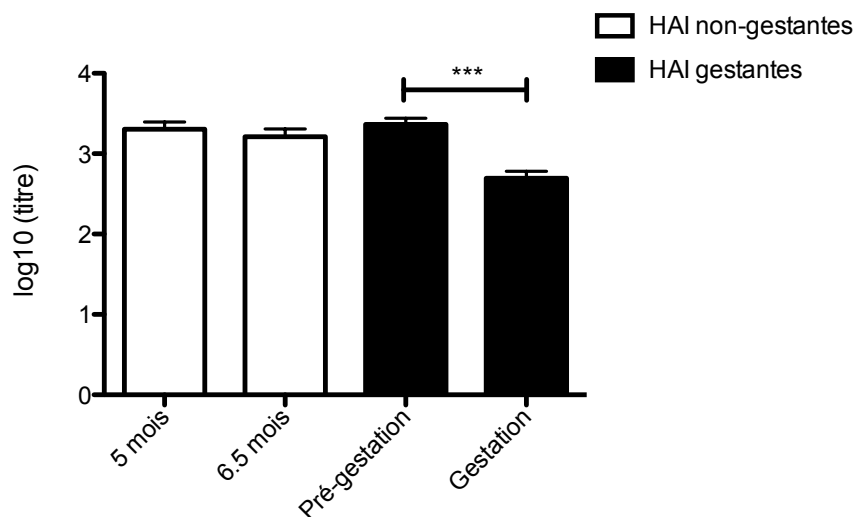


Figure 7: Titres d'auto-anticorps dans le sérum des souris HAI. Les titres moyens d'anticorps des souris non-gestantes (n=26) à 5 et 6.5 mois post-immunisation sont représentés par les colonnes blanches, tandis que les titres moyens des souris avant et pendant la gestation (n=23) sont représentés par les colonnes noires. Les résultats représentent le log en base 10 du titre (1/dilution) d'auto-anticorps, avec erreur standard sur la moyenne. L'analyse statistique des résultats par test de t païré pour chaque groupe révèle une variation significative du taux d'auto-anticorps pour le groupe gestation ($p=0.0004$).

3.2.2 Détermination de la concentration en IgG totaux circulants

Afin de déterminer si la baisse d'auto-anticorps en circulation pendant la gestation est spécifique aux auto-anticorps ou si le même phénomène se produit pour tous les IgG, un dosage des IgG totaux a été effectué par ELISA. Le même phénomène a pu être observé pour les IgG totaux. À 5 mois post-immunisation la concentration en IgG dans les sérums était en moyenne 16.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour le groupe non-gestant et 15.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ avant la gestation. Cette concentration était maintenue à une concentration semblable à 6.5 mois post-immunisation

pour le groupe non-gestant, tandis qu'une diminution à 8.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a pu être observée pour les souris gestantes (figure 8). La concentration en IgG totaux est donc significativement plus faible pendant la gestation, si l'on compare la pré-gestation avec la gestation ($p < 0.0001$) et par comparaison entre les souris gestantes et les souris non-gestantes du même âge ($p = 0.0001$).

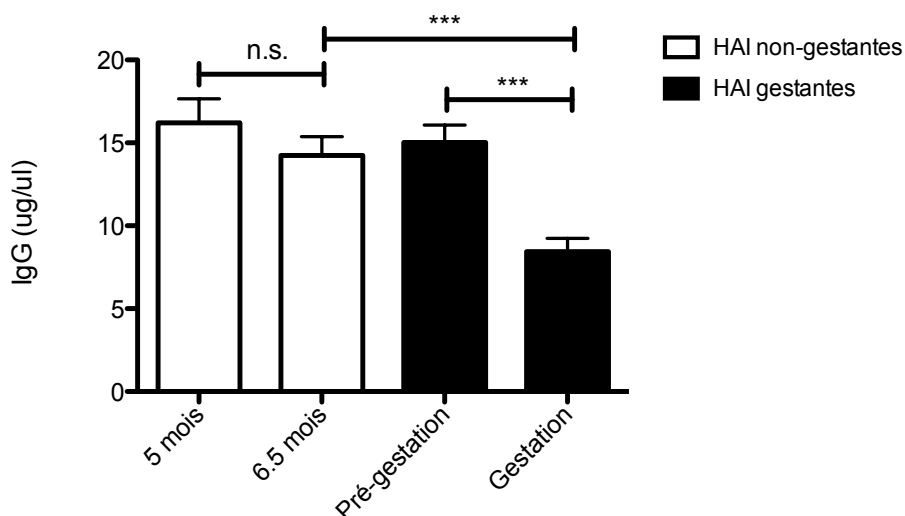


Figure 8: Concentration d'IgG totaux dans le sérum des souris. Les concentrations moyennes en IgG totaux (avec erreur standard sur la moyenne) pour le groupe non-gestant ($n=14$) sont représentés par les colonnes blanches, tandis que le groupe de souris en gestation ($n=19$) est représenté par les colonnes noires. Un test de t païré a révélé une variation statistiquement significative pour la gestation ($p < 0.0001$) et un test de t non païré a montré une variation statistiquement significative entre les deux groupes ($p = 0.0001$).

3.2.3 Détermination des ratios IgG1/IgG2c pour les IgG totaux

Afin de déterminer s'il y a présence d'un changement systémique de la réponse immunitaire de type T_{H1} à T_{H2} , les ratios en IgG1/IgG2c ont été mesurés grâce à un dosage de chacun des isotypes par ELISA. Les IgG1 sont généralement prédominants dans la réponse T_{H2} , tandis que les IgG2c (analogue des IgG2a chez la souris C57BL/6) prédomine dans la réponse T_{H1} [150, 151]. Les souris en pré-gestation et à 5 mois post-immunisation pour le groupe non-gestant ont en moyenne un ratio d'IgG1/IgG2c de 2.0. Pendant la gestation, une augmentation significative du ratio à 2.5 a pu être observée ce qui n'était pas le cas pour les souris non-gestantes du même âge dont le ratio était de 2.1 ($p = 0.0013$ et $p = 0.0218$) (figure 9).

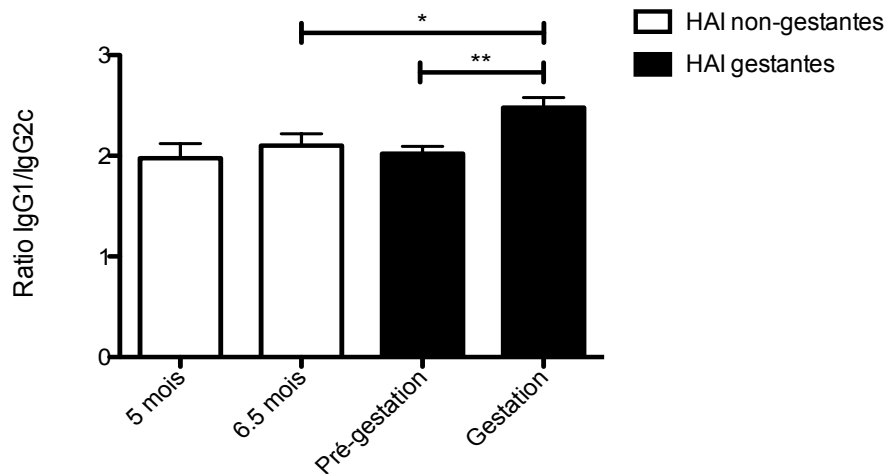


Figure 9: Ratio en IgG1/IgG2c des IgG totaux dans le sérum des souris. Les ratios moyens (avec erreur standard sur la moyenne) pour le groupe non-gestant (n=14) sont représentés par les colonnes blanches, tandis que le groupe de souris en gestation (n=19) est représenté par les colonnes noires. Les ratios correspondent aux ratios des D.O. obtenues lors de la révélation de l'ELISA pour chaque isotype. Un test de t païré a révélé une variation statistiquement significative pendant la gestation ($p=0.0013$) et un test de t non-païré a montré une variation statistiquement significative entre les deux groupes ($p=0.0218$).

3.3 Polarisation de la réponse immunitaire T_H1 à T_H2

3.3.1 Production de cytokines T_H1 et T_H2

La production de cytokines typiquement produites par des lymphocytes T auxiliaires T_H1 (IFN- γ et IL-2) et T_H2 (IL-4 et IL-10) a été mesurée par cytométrie en flux, puis comparée entre les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes, parmi les lymphocytes extraits de la rate et du foie. Seulement la production d'IL-2 par les lymphocytes T $CD4^+$ infiltrant le foie s'est avérée augmentée pendant la gestation ($p=0.0269$), tandis qu'aucune différence au niveau des pourcentages de production des autres cytokines n'a pu être observé entre les deux groupes de souris (figure 10).

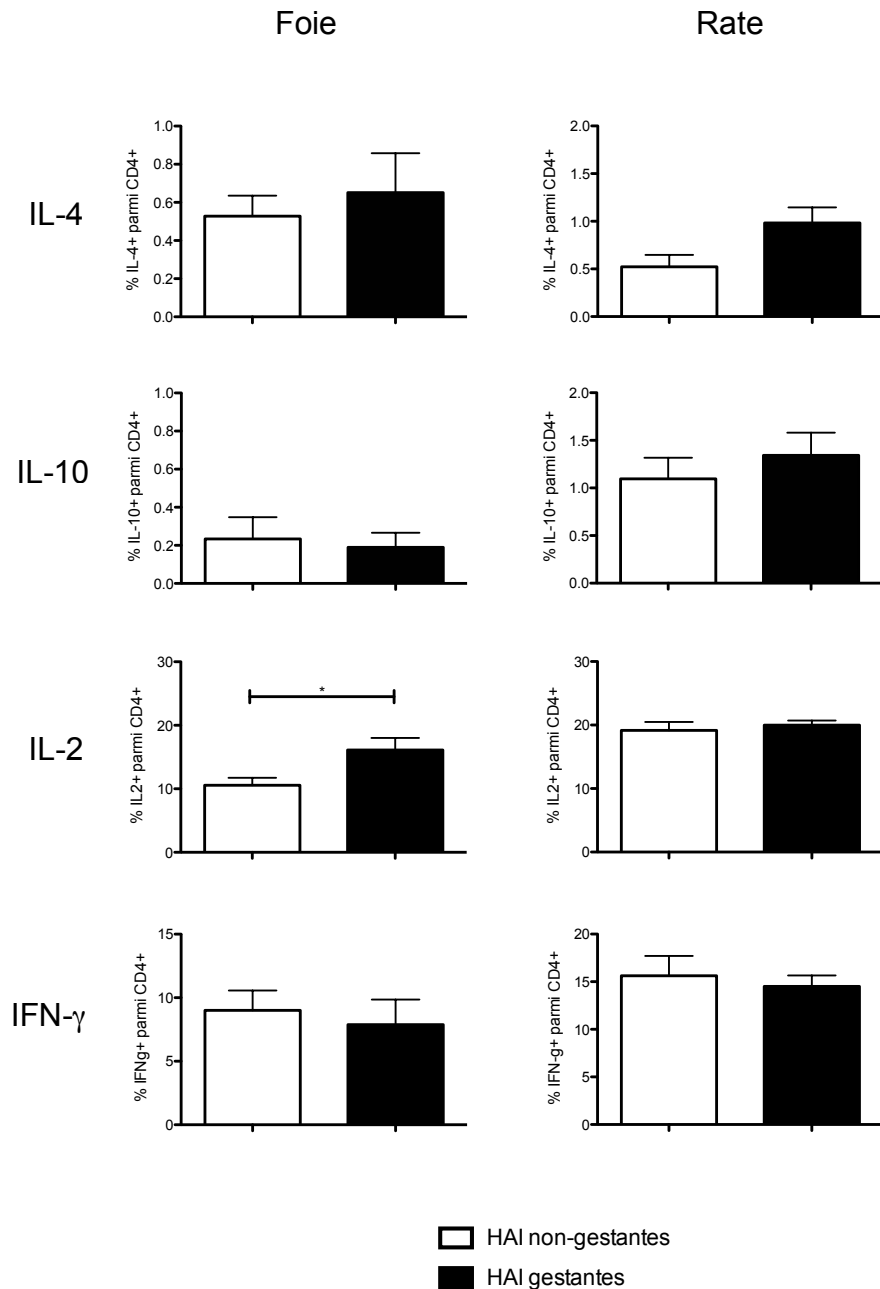


Figure 10: Pourcentage de cellules CD4 positives produisant de l'IL-4, de l'IL-10, de l'IL-2 et de l'IFN- γ parmi les lymphocytes isolés de la rate et du foie des souris HAI non-gestantes et HAI gestantes. Les pourcentages moyens de cellules CD4⁺ produisant chacune des cytokines (avec erreur standard sur la moyenne) des souris non-gestantes sont représentées par les colonnes blanches (n=10) tandis que les souris gestantes sont représentées par les colonnes noires (n=10). Un test de t non-pairé indique une différence significative entre les pourcentages de cellules CD4⁺ productrices d'IL-2 au foie des souris gestantes et des souris non-gestantes ($p=0.0269$).

3.3.2 Expression des facteurs de transcription T-bet et Gata-3

Les niveaux d'expression des facteurs de transcription T-bet (exprimé par les cellules T_{H1}) et Gata-3 (exprimé par les cellules T_{H2}) ont été mesurés par RT-PCR semi-quantitatif à partir de l'ARN extrait des lymphocytes de la rate des souris, puis comparés entre les souris HAI gestantes et non-gestantes. Aucune différence d'expression de T-bet et Gata-3 n'a pu être observée entre les deux groupes (figure 11).

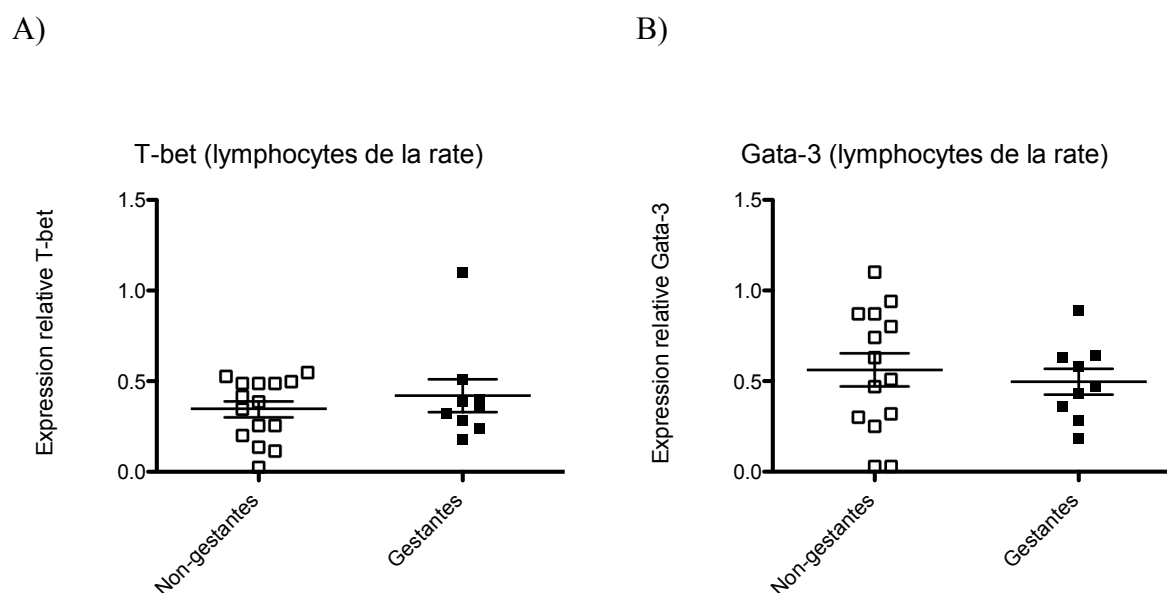


Figure 11: Expression relative de T-bet et Gata-3 dans les lymphocytes isolés de la rate des souris HAI. L'expression relative correspond à la quantification de l'ARN amplifiée de T-bet (A) ou Gata-3 (B) par rapport à l'amplification de l'actine. Les carrés noirs représentent l'expression relative dans les lymphocytes de rate des souris HAI gestantes (n=9) tandis que les carrés blancs correspondent à l'expression relative pour les lymphocytes de rate des souris HAI non-gestantes (n=14-15).

3.4 Lymphocytes T régulateurs (Tregs)

3.4.1 Détermination des pourcentages de lymphocytes T régulateurs

Les pourcentages de Tregs obtenus par cytométrie en flux ont été comparés entre les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes du même âge, puisque ceux-ci ont la capacité d'atténuer la réponse immunitaire et s'avèrent importants pour le contrôle de l'inflammation hépatique et la tolérance envers le fœtus [103]. Cette analyse a révélé des pourcentages plus élevés de Tregs hépatiques pendant la gestation, soit en moyenne 3.76% des lymphocytes T CD4 positifs étaient des Tregs pour les souris gestantes comparativement à 2.87% pour les non-gestantes ($p=0.0205$) (figure 12A). Les pourcentages de Tregs étaient toutefois comparables au niveau de la rate pour les 2 groupes de souris (figure 12B).

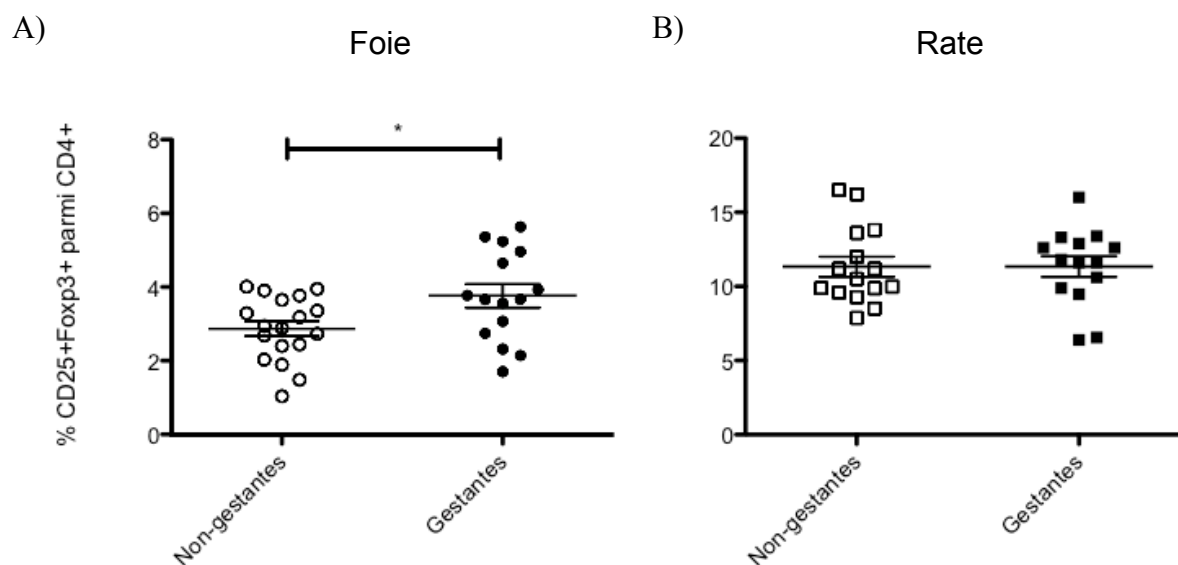


Figure 12 Pourcentages de lymphocytes T régulateurs (CD25⁺ Foxp3⁺ parmi CD4⁺). A) Pourcentages moyens (avec erreur standard sur la moyenne) de Tregs hépatiques des souris HAI non-gestantes (ronds blancs, n=18) et des souris HAI gestantes (ronds noirs, n=15). Un test de t non-pairé a montré une différence significative ($p=0.0205$). B) Pourcentages de Tregs à la rate des souris HAI non-gestantes (carrés blancs, n=15) et des souris HAI gestantes (carrés noirs, n=14).

3.4.2 Caractérisation des lymphocytes T régulateurs

3.4.2.1 Pourcentage de lymphocytes T régulateurs d'origine thymique (expression de facteur de transcription helios)

L'expression du facteur de transcription helios a été étudiée dans les Tregs afin de déterminer la proportion de ces cellules étant originaire du thymus. Les Tregs hépatiques des souris gestantes comportaient en moyenne 78.2% de Tregs thymiques (helios⁺), tandis que seulement 70.7% des Tregs hépatiques des souris non-gestantes étaient d'origine thymique. Les souris HAI gestantes présentaient ainsi une proportion significativement plus élevée de Tregs hépatiques d'origine thymique que les souris HAI non-gestantes ($p=0.0392$) (figure 13).

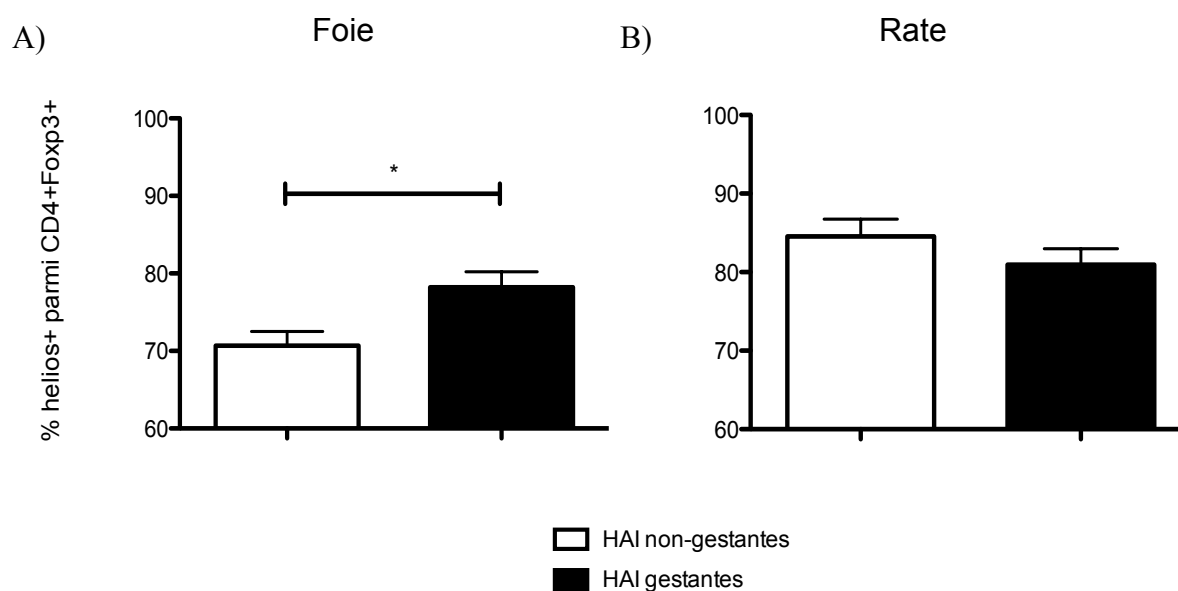


Figure 13: Pourcentages de Tregs thymiques (helios⁺). Pourcentages moyens (avec erreur standard sur la moyenne) de Tregs helios positifs chez les souris HAI gestantes (colonnes noires, n=3) et chez les souris HAI non-gestantes (colonnes blanches, n=5), parmi les lymphocytes extraits du foie (A) et de la rate (B). Un test de t non-pairé révèle une différence significative entre les pourcentages de Tregs hépatiques helios positifs deux groupes ($p=0.0392$).

3.4.2.2 Pourcentage de lymphocytes T régulateurs exprimant le récepteur de chimiokine CXCR3

Puisque les ligands de CXCR3 sont exprimés dans le foie et que les Tregs exprimant ce récepteur sont connus pour être attirés au foie afin de réguler la réponse immunitaire, les pourcentages de Tregs exprimant CXCR3 ont été comparés entre les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes [145]. Un pourcentage significativement plus faible de Tregs hépatiques CXCR3 positifs a pu être dénoté chez les souris gestantes (26.5%) comparativement aux souris non-gestantes (41.0%) ($p=0.0408$) (figure 14). Les Tregs CXCR3 positifs étant présents en plus faible proportion dans la rate, aucune différence n'a été observée entre les deux groupes dans cet organe.

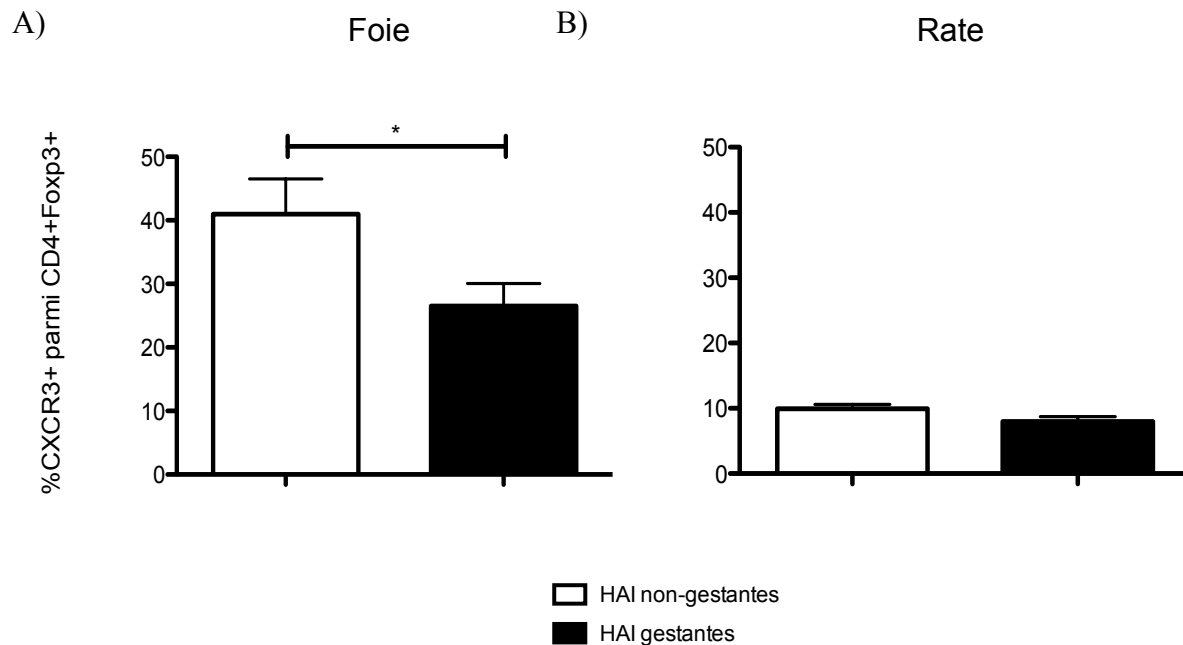


Figure 14: Pourcentage de Tregs exprimant CXCR3. Pourcentages moyens (avec erreur standard sur la moyenne) de Tregs CXCR3 positifs chez les souris HAI gestantes (colonnes noires, n=10) et les souris HAI non-gestantes (colonnes blanches, n=10), parmi les lymphocytes extraits du foie (A) et de la rate (B). Un test de t non-pairé montre une différence significative entre les deux groupes au niveau des Tregs hépatiques ($p=0.0408$).

3.4.2.3 Pourcentage de lymphocytes T régulateurs en division (KI67⁺)

Afin de déterminer si l'augmentation de Tregs hépatiques pendant la gestation est associée à une plus grande division de ces cellules, les pourcentages de Tregs exprimant la protéine nucléaire KI67, exprimée dans les cellules en division mais absent dans les cellules en phase latente, ont été mesurés pour en faire la comparaison entre les souris HAI en gestation et les souris HAI non-gestantes [146]. Aucune différence n'a pu être révélée entre les deux groupes par cette analyse. Il est toutefois à noter que les Tregs sont majoritairement en phase de division dans le foie tandis qu'ils semblent majoritairement latents dans la rate (figure 15A).

3.4.2.4 Pourcentage de lymphocytes T régulateurs producteurs de TGF- β

Dans le but de déterminer si les Tregs hépatiques, pendant la gestation, produisaient plus de cytokines régulatrices, les pourcentages de Tregs exprimant le TGF- β ont été comparés entre les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes. Aucune différence au niveau de la production de cette cytokine n'a pu être observée entre les deux groupes. Les Tregs hépatiques produisent toutefois plus de TGF- β que Tregs retrouvés dans la rate (figure 15B).

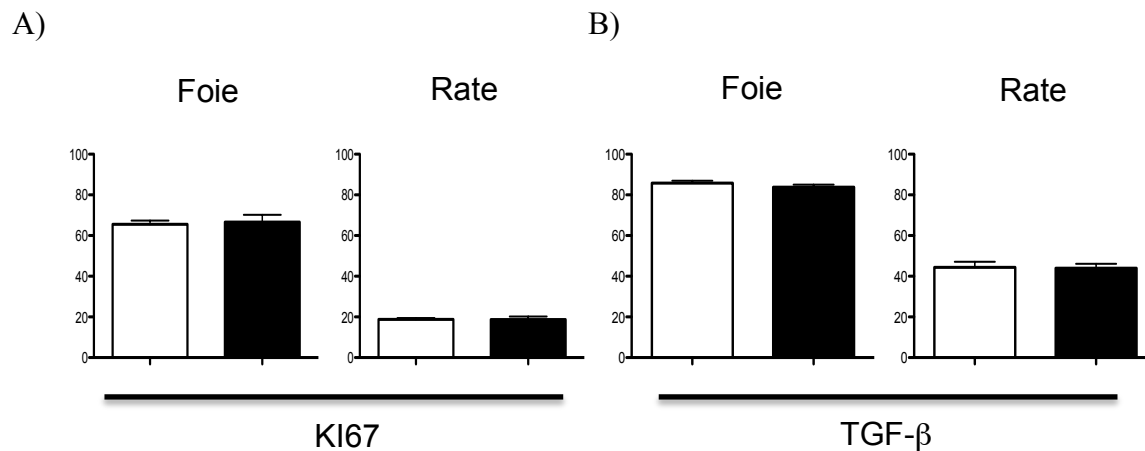


Figure 15: Pourcentage de Tregs en division (KI67⁺) et pourcentage de Tregs produisant du TGF- β . A) Pourcentages moyens (avec erreur standard sur la moyenne) de Tregs (CD4⁺Foxp3⁺) KI67 positifs chez les souris HAI gestantes (colonnes noires, n=3) et les souris HAI non-gestantes (colonnes blanches, n=5), parmi les lymphocytes extraits du foie et de la rate. B) Pourcentages de Tregs TGF- β positifs chez les souris HAI gestantes (n=10) et les souris HAI non-gestantes (n=10).

3.5 Lymphoprolifération

Un test de lymphoprolifération par dilution du CFSE en présence de l'auto-antigène (la protéine mFTCD) a été effectué avec les lymphocytes extraits de la rate des souris HAI. L'analyse de la prolifération des cellules CD4⁺, CD8⁺ et CD19⁺ après 48 heures et 72 heures d'incubation avec l'auto-antigène (mFTCD) n'a révélé aucune différence de prolifération des différents sous-types cellulaires entre les souris HAI gestantes et non-gestantes (figure 16)

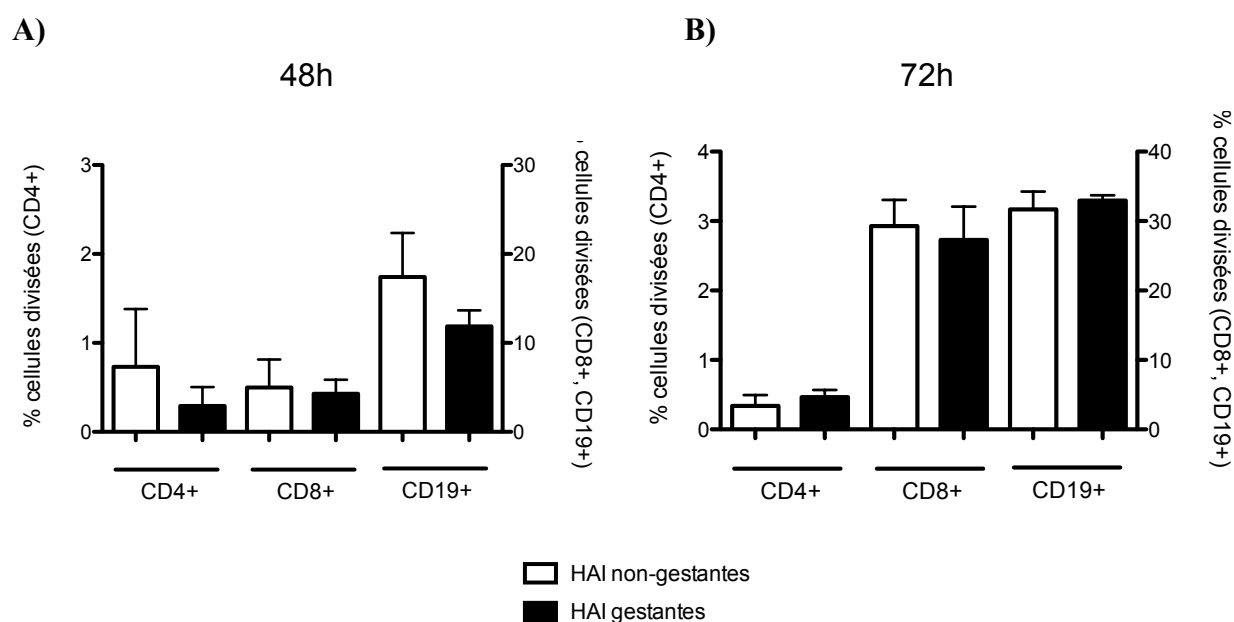


Figure 16: Lymphoprolifération des cellules CD4⁺, CD8⁺ et CD19⁺ de rate en présence de l'auto-antigène. Pourcentage de cellules de rate s'étant divisé, c'est-à-dire présentant une diminution de l'intensité du CFSE après 48 heures (A) et 72h (B) d'incubation avec la protéine mFTCD. Les souris HAI non-gestantes sont représentées par colonnes blanches (n=3-5) tandis que les souris HAI gestantes sont représentées par les colonnes noires (n=2-3).

3.6 Production d'IL-10 par les cellules incubées avec la protéine CYP2D6-FTCD

Les lymphocytes isolés de la rate et du foie des souris HAI ont été incubés en présence de la protéine chimérique CYP2D6-FTCD, puis leur sécrétion d'IL-10 a été mesurée par ELISA. Les lymphocytes isolés de la rate des souris HAI gestantes ont montré une plus forte production d'IL-10 en présence de la protéine CYP2D6-FTCD (en moyenne 402 ng/ml de surnageant de culture) que les lymphocytes de rate des souris HAI non-gestantes (en moyenne 247 ng/ml) ($p=0.0460$). Les lymphocytes isolés du foie des souris HAI gestantes et non-gestantes ont montré une production similaire d'IL-10, soit en moyenne 391 ng/ml et 439 ng/ml respectivement (figure 17).

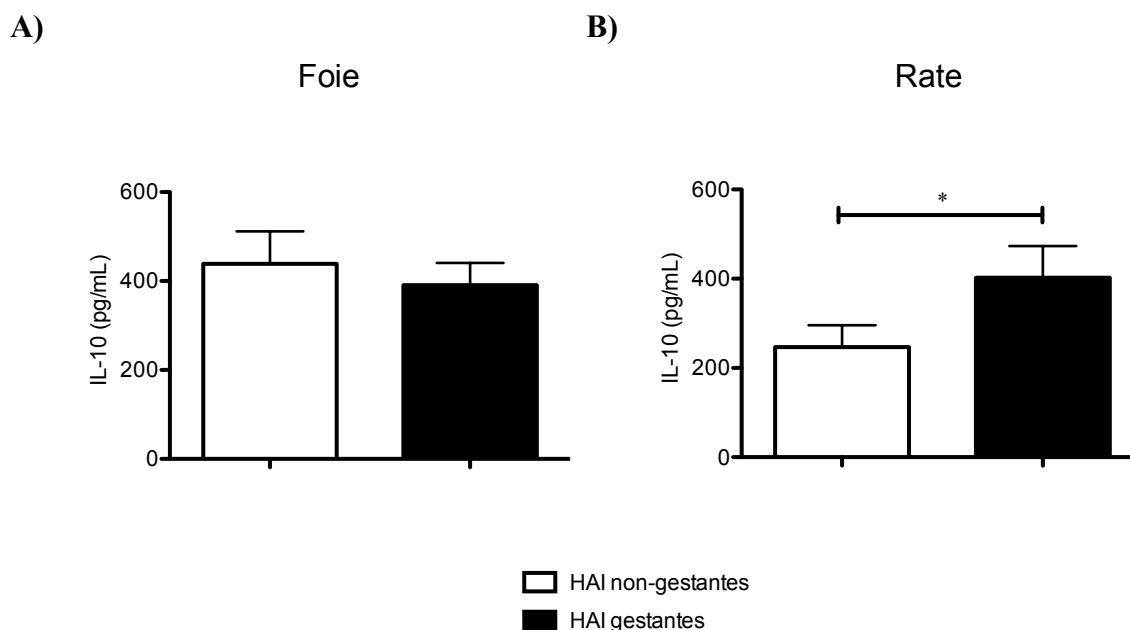


Figure 17: Production d'IL-10 par les lymphocytes cultivés en présence de la protéine chimérique CYP2D6-FTCD. Moyenne des concentrations (avec erreur sur la moyenne) en IL-10 mesurées dans le surnageant de culture par ELISA pour les lymphocytes isolés du foie (A) et de la rate (B) des souris HAI non-gestantes (colonne blanches, n=16) et gestantes (colonnes noires, n=13). Un test de t non-pairé révèle une augmentation significative de la production d'IL-10 par les lymphocytes de la rate des souris gestantes ($p=0.0460$).

3.7 Pourcentages de cellules B productrices d'interleukine-10

(B10)

Les cellules isolées du foie et de la rate des souris ont été marquées pour la cytométrie en flux afin de mettre en évidence les lymphocytes B ($CD45^+CD19^+$) produisant de l'IL-10. Aucune différence n'a pu être observée entre les pourcentages de cellules B10 entre les souris HAI gestantes et non-gestantes, autant dans la rate que dans le foie. Une légère augmentation des B10 semble toutefois se produire, surtout dans la rate, mais aucun test statistique ne révèle une différence significative (figure 18).

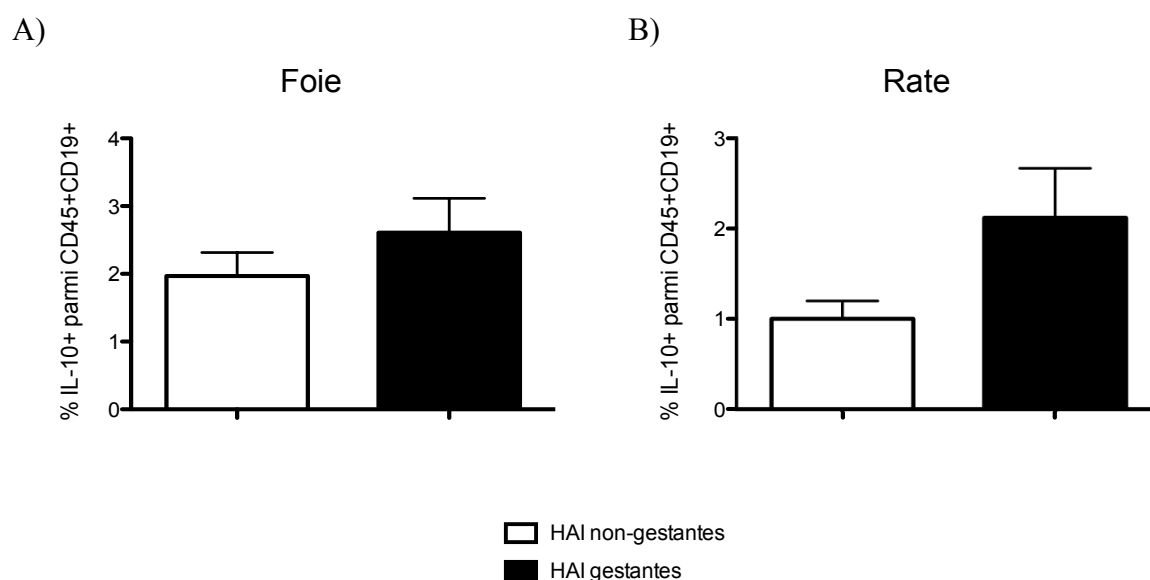


Figure 18: Pourcentages de cellules B10. Moyenne des concentrations (avec erreur sur la moyenne) de cellules $IL-10^+$ parmi une population $CD45^+CD19^+$, isolées du foie (A) et de la rate (B) des souris HAI non-gestantes (colonne blanches, $n=3-5$) et gestantes (colonnes noires, $n=3-5$). Aucune différence significative n'a pu être observée (test de t non-pairé, foie : $p=0.3582$, rate : $p=0.0919$).

3.8 Niveaux d'expression de molécules d'adhésion et chimiokines par les cellules du foie

3.8.1 Expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et VAP-1

Les molécules d'adhésion sont responsables de la séquestration des lymphocytes dans le foie résultants en importantes infiltrations lymphocytaires dans le cas de l'HAI [147]. Ainsi, les niveaux d'expression des molécules ICAM-1, VCAM-1 et VAP-1 ont été mesurés par RT-PCR semi-quantitatif à partir de l'ARN de biopsies de foie des souris HAI afin d'en faire la comparaison entre les souris HAI non-gestantes et les souris HAI gestantes. Aucune différence d'expression de VCAM-1, ICAM-1 et VAP-1 n'a pu être observée entre les deux groupes. (figure 19).

3.8.2 Expression des chimiokines CXCL9 (MIG) et CXCL10 (IP-10)

Les chimiokines CXCL9 (MIG) et CXCL10 (IP-10) sont exprimés dans le foie lorsqu'il y a de l'inflammation et attirent les lymphocytes CXCR3 positifs puisqu'il s'agit de deux ligands de ce récepteur de chimiokine [147]. Comme il a été fait pour les molécules d'adhésion, les niveaux d'expression de ces chimiokines ont été mesurés par RT-PCR puis comparés entre les deux groupes de souris HAI. Aucune différence d'expression de MIG et IP-10 n'a pu être observée entre les souris gestantes et non-gestantes (figure 19).

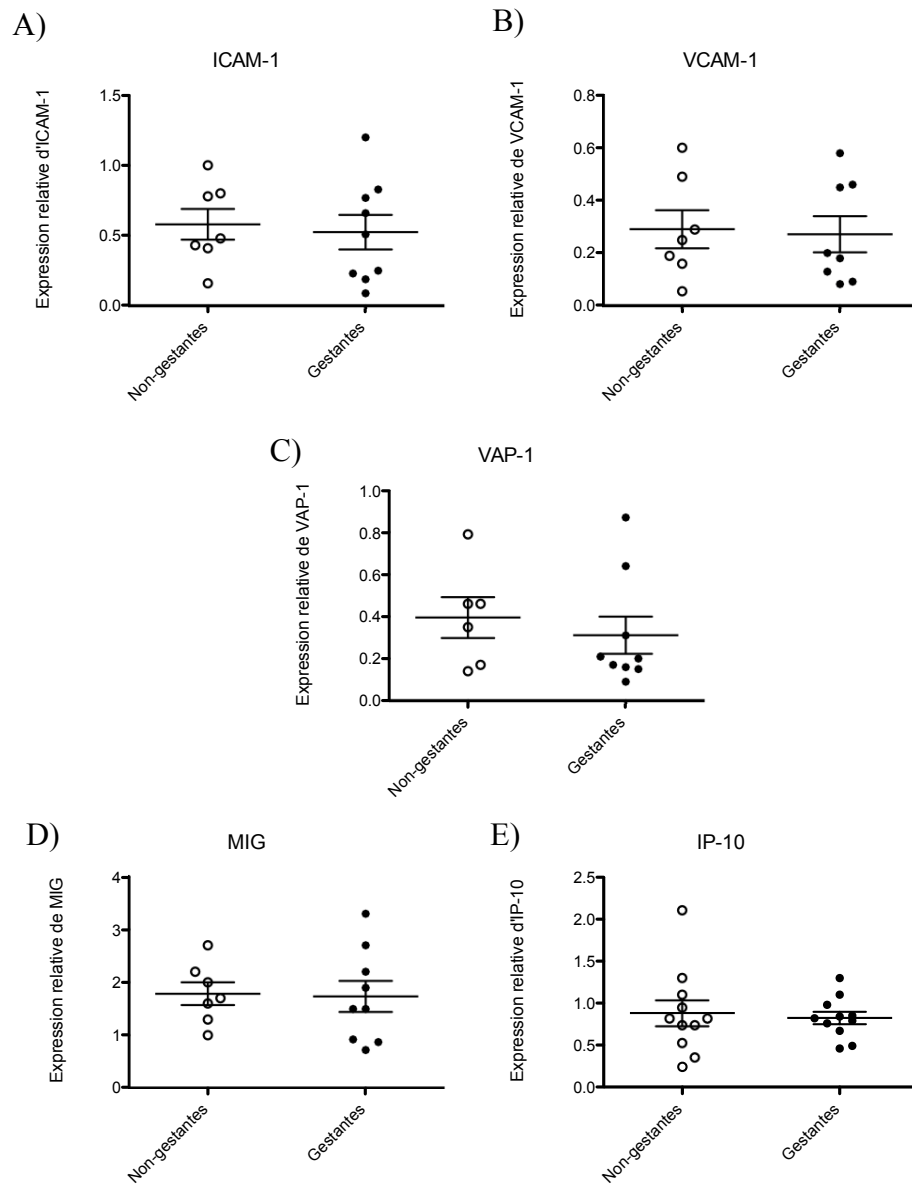


Figure 19: Niveaux d'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et VAP-1 et de chimiokines MIG et IP-10. Niveaux d'expression relatifs à la quantité d'actine mesurés par RT-PCR semi-quantitatif effectués à partir d'ARN extrait de biopsies de foie de souris HAI non-gestantes (ronds blancs, n=6-11) et de souris HAI gestantes (ronds noirs, n=8-11).

3.9 Évolution de l'HAI après l'accouchement (*post-partum*)

Certaines souris HAI ont été sacrifiées 2 ou 3 semaines suivant leur accouchement afin de voir si une rechute de la maladie se produit à ce moment. Parmi ces souris, quelques-unes ont conservé leurs bébés suite à l'accouchement tandis que pour certaines les bébés ont été retirés à la naissance, afin de voir l'effet de l'allaitement. Les résultats présentés comprennent toutes les conditions compilées, puisqu'aucune différence entre les conditions n'a été observée. Le score histologique des souris HAI a été comparé avec celui des souris HAI n'ayant pas été accouplées. Bien que le score histologique moyen des souris *post-partum* semble plus faible que les souris n'ayant pas été accouplées, aucune différence statistiquement significative n'a pu être observée ($p=0.0558$) (figure 20A). Les niveaux de transaminases (ALT) sériques ont également été mesurés et s'avèrent diminués suite à l'accouchement ($p=0.0108$) (figure 20B). Les auto-anticorps circulants ont présentés des titres semblables chez les souris HAI *post-partum* et les souris n'ayant pas été accouplées (figure 20C).

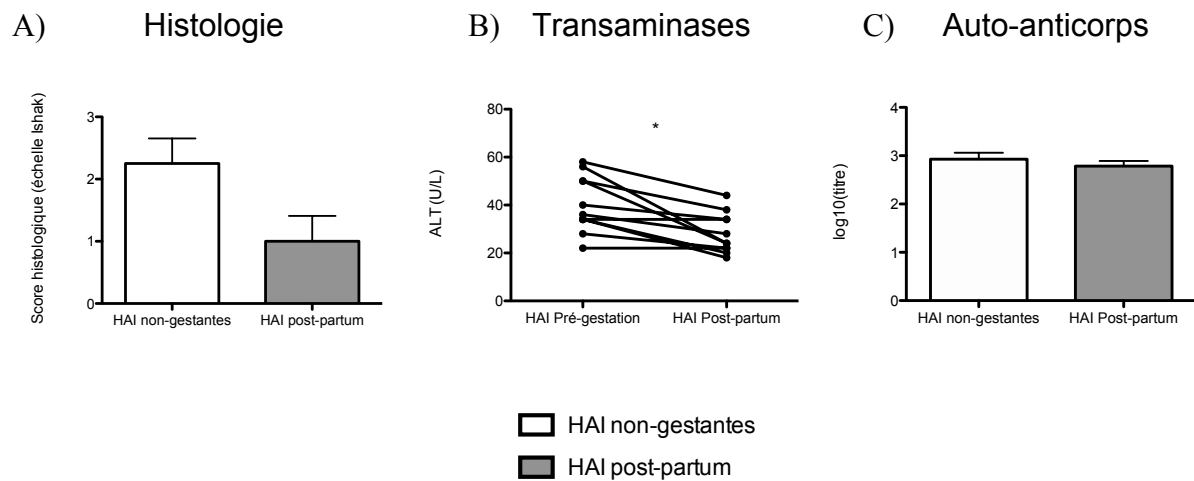


Figure 20: Évolution de l'HAI chez les souris HAI en période *post-partum*. A) Score histologique moyen (avec erreur sur la moyenne) des souris HAI n'ayant pas été accouplées (blanc, n=16) et des souris HAI 2 à 3 semaines *post-partum* (gris, n=9). Un test de t non-pairé révèle une valeur de $p=0.0558$. B) Niveaux d'ALT mesurés avant la gestation et après l'accouchement des souris HAI (n=11). Un test de t pairé révèle une diminution significative des ALT après l'accouchement ($p=0.0108$). C) Titre moyens (avec erreur sur la moyenne) des auto-anticorps des souris HAI n'ayant pas été accouplées (blanc, n=14) et des souris HAI *post-partum* (n=9). Aucune différence significative entre les titres d'auto-anticorps n'est observée entre les deux groupes.

3.10 Comparaison de paramètres associés à la grossesse entre souris saines et souris HAI

Puisque des problèmes de fertilité et des complications lors de la grossesse ont été observés dans le passé chez les patientes atteintes d'HAI, différents paramètres de la grossesse ont été comparés entre des souris C57BL/6 saines de 7.5 mois d'âge (correspondant à l'âge des souris HAI en tenant compte des 6 semaines d'injection et du 6 mois de développement de la maladie) et des souris C57BL/6 HAI accouplées. 80.0% des souris saines mises en accouplement étaient réellement gestantes lorsqu'elles ont été sacrifiées 14 jours post-conception, tandis que seulement 47.5% des souris HAI accouplées étaient en gestation. Des pourcentages de résorption similaires ont pu être noté chez les souris saines et les souris HAI. Les souris saines ont présenté un pourcentage de fœtus résorbés de 33.9%, tandis que ce pourcentage est de 32.9% chez les souris HAI. La taille des portées était en moyenne de 2.8 bébés/portée chez les souris saines et de 3.9 bébés/portée chez les souris HAI. Dans les deux cas le poids moyen d'un bébé à la naissance était de 1.3g. 44.4% des souris HAI gestantes ont éprouvé des complications à l'accouchement telles que dystocie ou fausse couche, alors que seulement 20% de cas de complications ont été répertoriés chez les souris saines (table VI).

Table VI: Paramètres associés à la grossesse notés chez des souris C57BL/6 saines et chez les souris C57BL/6 HAI.

	C57BL/6 saines	C57BL/6 HAI	<i>p</i>	significatif
% Accouplements réussis	80.0% (n=15)	47.5% (n=54)	0.0383 [§]	oui
% Résorption fœtale	33.9% (n=6)	32.9% (n=26)	0.9375 [♦]	non
Nombre moyen de bébés par portée	2.8 (n=5)	3.9 (n=11)	0.2069 [♦]	non
Poids moyen des bébés (g)	1.3g (n=5)	1.3g (n=11)	0.7067 [♦]	non
% Complications à l'accouchement	20% (n=6)	44.4% (n=13)	0.5164 [§]	non

♦test de t, §test de chi-carré

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Chez les femmes enceintes atteintes d'HAI, une rémission de la maladie est fréquemment observée pendant le dernier trimestre de la grossesse [138]. Cette rémission se produit également chez les femmes enceintes atteintes de sclérose en plaques et d'arthrite rhumatoïde [152]. Notre hypothèse est que l'environnement hormonal ainsi que la présence du fœtus pendant la grossesse induisent une immunomodulation ayant un impact sur la réponse auto-immune. Cette immunomodulation serait favorable pour les patientes atteintes d'HAI. À ce jour, les mécanismes impliqués dans la rémission de l'HAI pendant la grossesse, ainsi que les causes de la rechute *post-partum*, ne sont pas connus. Le manque de connaissance à ce sujet justifie l'importance de la présente étude.

Bien que les travaux rapportant des observations effectuées auprès de femmes enceintes atteintes d'HAI aient permis de mettre en évidence le phénomène, ceux-ci ne permettent pas l'investigation des mécanismes responsables. Pour ce faire, un modèle animal est essentiel. Le modèle murin d'HAI induit par xéno-immunisation que nous avons développé dans notre laboratoire s'est avéré être le parfait outil pour étudier l'impact de la grossesse sur l'HAI. À l'aide de ce modèle, nous avons comparé différents marqueurs typiques de l'HAI, entre des souris HAI gestantes ou en période *post-partum* et des souris HAI n'étant pas en gestation. Le but premier était de voir si celles-ci présentent une rémission de la maladie pendant la gestation, suivie d'une rechute *post-partum*, comme il a été observé chez l'Homme. Dans la mesure où ces phénomènes étaient reproduits dans nos souris, le but second de ce projet était de déterminer les mécanismes impliqués.

Aucune étude auparavant n'a investigué les causes de la rémission temporaire de l'HAI pendant la grossesse, chez l'homme ou dans un modèle animal. Ce travail représente donc la première étude approfondie de l'impact de la grossesse sur l'HAI.

4.1 La grossesse induit une rémission de l'HAI dans le modèle murin d'HAI

Comme il a été observé chez les femmes atteintes d'HAI lors du troisième trimestre de leur grossesse, les souris HAI gestantes présentent une rémission de la maladie au début de leur troisième semaine de gestation. Cette conclusion est appuyée d'une part par une diminution de l'inflammation hépatique chez les souris HAI gestantes comparativement aux souris HAI non-gestantes. Les souris non-gestantes présentent de multiples infiltrations lymphocytaires au niveau des espaces portes et dans les zones intra-lobulaires, atteignant à plusieurs reprises un score histologique de 8. Une légère fibrose hépatique a même été observée à l'occasion. À l'inverse les souris gestantes ne présentent que de minuscules infiltrations intra-lobulaires et une seule souris a atteint le score maximal de 4. D'autre part, les souris gestantes présentent une diminution des niveaux de transaminases sériques pendant leur gestation. Les transaminases sont libérées en circulation lorsqu'il y a présence de dommage hépatique. Une diminution de ces enzymes pendant la gestation des souris suggère donc qu'il y a une moins grande destruction des hépatocytes à ce moment. Finalement, les titres d'auto-anticorps circulants sont également diminués pendant la gestation. Ceux-ci corrélaient en général avec l'état de la maladie [153]. Une amélioration de ces trois caractéristiques typiques de l'HAI signifie qu'il y a une atténuation de la réponse auto-immune impliquée dans l'HAI induite par la gestation, minimisant les dommages hépatiques.

4.2 La rechute *post-partum* n'est pas reproduite dans les souris xéno-immunisées

Les souris sacrifiées en période *post-partum* ne présentent pas de rechute comme il avait été anticipé. À l'inverse, les souris HAI sacrifiées deux semaines suivant leur accouchement semblent demeurer en état de rémission. Celles-ci présentent une inflammation hépatique plus faible que les souris n'ayant pas été accouplées, une diminution des transaminases sériques et des titres d'auto-anticorps similaires aux souris témoins. Suite à ces observations, l'intervalle de temps entre l'accouchement et le sacrifice a été prolongé à trois semaines *post-partum*. Au départ, les souriceaux étaient rapidement retirés de la mère. Afin de voir si la lactation était nécessaire pour qu'il y ait une rechute, certaines mères ont conservé les bébés dans leur cage.

Dans les deux situations, aucune rechute n'a été observée. La prolactine sécrétée lors de l'allaitement ne semble donc pas induire de rechute dans notre modèle d'HAI. Face à cette absence de rechute *post-partum*, notre première hypothèse est que la période entre l'accouchement et le moment de rechute est peut-être encore plus longue que les temps que nous avons utilisés de 2 à 3 semaines *post-partum*. À ce moment le rôle de la prolactine serait à reconsidérer. Une hypothèse alternative est que la rémission induite pendant la gestation chez les souris est peut-être suffisante pour rétablir l'intégrité de l'organe affecté et prévenir la réapparition des signes de l'HAI observés dans nos souris. Aucun mécanisme expliquant la rechute n'a donc pu être identifié, nous nous sommes plutôt concentrés sur les mécanismes impliqués dans la rémission de l'HAI.

4.3 Les auto-anticorps circulants sont diminués pendant la grossesse

Notre hypothèse quant au niveau des auto-anticorps circulants pendant la gestation était ambivalente au départ : d'une part, il était possible que ceux-ci soient diminués, supposant qu'une rémission est observée, puisqu'une corrélation entre la sévérité de la maladie et les auto-anticorps a été établie chez l'humain et dans notre modèle murin [95]. D'autre part, il était possible que les auto-anticorps circulants soient augmentés en réponse à la polarisation T_H2 se produisant pendant la grossesse, qui favorise une réponse humorale [154]. Les auto-anticorps se sont finalement avérés diminués pendant la grossesse. Les recherches effectuées dans la littérature suite à cette observation ont mené à une hypothèse qui n'avait pas été considérée au départ. Les auto-anticorps circulant chez les patients avec une HAI et dans notre modèle de souris sont des IgG. Or, les IgG ont la capacité de traverser le placenta et il est ainsi connu qu'au moment de la grossesse, les IgG totaux sont diminués en circulation chez la mère, puisqu'une portion de ceux-ci traverse le placenta et se retrouve en circulation chez le fœtus [155-158]. Nous avons donc procédé au dosage des IgG sériques totaux à partir du sang des souris HAI, afin de voir si la diminution s'appliquait pour tous les IgG. Ce test nous a permis de voir qu'en effet tous les IgG étaient diminués pendant la gestation. De plus les niveaux d'auto-anticorps circulants remontent suite à l'accouchement pour atteindre des titres équivalents aux titres des souris n'ayant pas été accouplées, malgré une absence de rechute de

l'inflammation hépatique. Ces observations suggèrent donc qu'une fraction des auto-anticorps, tout comme les IgG totaux, serait peut-être transférée de la mère au fœtus.

Afin d'appuyer l'hypothèse du transfert des auto-anticorps et des IgG totaux au fœtus, il serait essentiel de procéder au dosage de ces anticorps dans la circulation des fœtus. Il est possible que l'atténuation de la réponse auto-immune qui se produit en rémission mène à une diminution de la production d'anticorps. Cette expérience n'a pas été effectuée en raison de contraintes techniques. Le prélèvement sanguin par la veine caudale ou par ponction cardiaque s'avère difficile en raison de la grosseur des fœtus (1 à 2 cm de long) et le volume de sang recueilli est minime. De plus, le fœtus doit demeurer en vie afin qu'il y ait un flux sanguin permettant le prélèvement. Or, ceux-ci meurent rapidement suivant leur retrait des cornes utérines de la mère.

Les auto-anticorps circulants chez les patients avec une HAI n'ont aucun rôle pathologique connu à ce jour [60]. La séquestration de ceux-ci par les fœtus ne représenterait donc pas un danger pour eux. De plus, l'HAI n'est pas transmise de la mère à l'enfant, ces anticorps seraient donc probablement éliminés de la circulation du nouveau-né. La diminution des IgG circulants chez la mère pourraient peut-être réduire l'impact de la destruction cellulaire impliquant l'ADCC (« *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* »), telle que l'attaque des hépatocytes sur lesquels se trouvent des auto-anticorps par les cellules NK via leurs récepteurs Fc [37, 159]. Toutefois, compte tenu que les protéines reconnues par les auto-anticorps ne sont pas exprimées à la surface des cellules mais plutôt de façon intracellulaire, il est peu probable que les auto-anticorps soient impliqués dans une destruction cellulaire par ADCC [60].

La polarisation T_H2 induit la commutation de classe des immunoglobulines qui résulte en un changement de proportion des différents isotypes d'IgG [160]. L'analyse des isotypes d'IgG totaux circulants a ainsi été effectuée afin de voir si la quantité d'IgG1 (associé à une réponse T_H2) était modifiée par rapport à la quantité d'IgG2c (associé à une réponse T_H1) pendant la grossesse. Cette expérience nous a permis de mettre en évidence une augmentation du ratio en IgG1/IgG2c chez les souris HAI gestantes par rapport aux souris non-gestantes, ce qui suggère un changement de la réponse T_H1 vers une réponse plutôt T_H2 . Cette polarisation T_H2 pendant

la grossesse a été largement décrite [99, 130, 131, 133]. Bien que l'augmentation du ratio en IgG1/IgG2c corrèle avec la théorie de la polarisation T_H2 associée à la grossesse, celle-ci doit être considérée avec précaution. L'utilisation de ce ratio peut s'avérer biaisé dans la mesure où certains isotypes d'IgG seraient préférentiellement transférés au fœtus. Chez la souris, un tel phénomène n'a pas été clairement décrit à ce jour. Toutefois, chez l'humain, il est connu que les IgG1 et IgG4 sont fortement transférés au fœtus, tandis que les IgG3 le sont moins et les IgG2 ne sont que très peu transférés [156, 161-163]. Dans la mesure où certains isotypes seraient favorisés dans le transfert placentaire, l'utilisation de ce ratio à titre d'indicateur d'un changement de réponse T_H1/T_H2 ne s'avèrerait pas une méthode envisageable. Il serait donc préalablement nécessaire de doser séparément les isotypes d'IgG (IgG1 et IgG2c) chez la mère et chez les fœtus afin de déterminer si un transfert préférentiel se produit dans les souris HAI, pour ensuite pouvoir émettre avec conviction une conclusion quant à la polarisation T_H2 .

4.4 La polarisation T_H2

Mis à part les isotypes d'IgG, les données recueillies à ce jour ne suggèrent aucune implication de la réponse T_H2 dans la rémission des souris HAI gestantes.

L'analyse des cytokines typiquement T_H1 et T_H2 produites par les lymphocytes de la rate et du foie des souris suggère un profil majoritairement T_H1 , autant chez les souris HAI gestantes que les souris HAI non-gestantes. Les lymphocytes T auto-réactifs chez les patients atteints d'une HAI produisent de l'IFN- γ [85, 164]. Notre modèle murin présente également une certaine proportion de cellules $CD4^+$ produisant de l'IFN- γ , qui est la même pour les souris gestantes et les souris non-gestantes. L'immunisation des souris comporte un plasmide codant pour l'IL-12, ce qui favorise le développement d'une réponse T_H1 et explique les faibles pourcentages de cellules $CD4^+$ produisant de l'IL-4 et de l'IL-10 détectés. Les pourcentages de cellules produisant ces deux cytokines T_H2 sont les mêmes pour les souris gestantes et les souris non-gestantes. Comme nous l'avons observé dans notre modèle d'HAI, une équipe a également montré qu'il n'y avait aucune modification des niveaux des cytokines T_H1 et T_H2 pendant la gestation de souris EAE, malgré les signes de rémission observés [117]. Le profil T_H1 de ce modèle murin de sclérose en plaques semble également maintenu pendant la gestation selon leur résultats.

Les cellules CD4⁺ T_H1 et T_H2 se distinguent par leur production de cytokines différentes, mais également par l'expression de facteurs de transcription typiquement T_H1 (T-bet) et T_H2 (Gata-3). Puisque les pourcentages de cellules productrices de cytokines T_H2 obtenus par les analyses de cytométrie en flux sont faibles, il est parfois difficile d'en faire la comparaison entre les souris gestantes et les souris non-gestantes. Nous avons donc comparé l'expression de ces facteurs de transcription. Une première technique a été tentée, par cytométrie en flux. Pour ce faire, un marquage intracellulaire de T-bet et Gata-3 a été effectué, selon le protocole de marquage des Tregs. Les données obtenues se sont avérées difficiles à analyser puisque les anticorps couplés au fluorochrome existants pour ce marquage ne permettent pas une bonne distinction entre les populations négatives et positives pour ces facteurs de transcription. Aucune conclusion n'a été tirée de ces résultats.

Ensuite, l'expression de T-bet et Gata-3 a été quantifiée de façon semi-quantitative par RT-PCR à partir d'ARN isolé des lymphocytes de la rate et du foie des souris. Les résultats produits par cette méthode ont mené à la conclusion qu'il n'y a aucune différence entre les niveaux d'expression de T-bet et Gata-3 par les lymphocytes des souris HAI gestantes et non-gestantes. Ces observations corrént avec les données obtenues pour les cytokines T_H1 et T_H2 par cytométrie, suggérant qu'il n'y aucun changement de la réponse T_H1 vers une réponse T_H2. Toutefois, la méthode utilisée pourrait être raffinée afin de s'assurer que même une légère modification de la réponse immunitaire puisse être détectée.

Afin d'augmenter la spécificité des résultats, une isolation des cellules CD4⁺ aurait été nécessaire avant d'en purifier l'ARN. Bien que T-bet soit majoritairement exprimé par les lymphocytes T, il arrive parfois qu'il soit exprimé dans les cellules B afin d'induire la commutation de classe associée aux immunoglobulines de type T_H1, ou encore dans de rare cas il peut être exprimé dans les DC [165, 166]. Dans tous les cas, l'expression de T-bet que ce soit dans des cellules T ou B ou DC est associée à une réponse T_H1. Il est donc peu probable que l'expression de T-bet dans d'autres cellules influence nos résultats, toutefois l'isolation des lymphocytes T CD4⁺ ajouterait de la rigueur à notre méthode. Nous n'avons pas procédé à l'isolation des cellules CD4⁺ par crainte de manquer de matériel nucléaire pour la

réaction PCR, puisque le nombre de cellules recueillies à partir du foie est faible. L'étape d'isolation peut amener des pertes allant jusqu'à 50%. L'utilisation de microméthodes ou la compilation des cellules de plusieurs souris deviendraient à ce moment nécessaires afin de permettre la quantification de l'ARN des cellules CD4⁺ isolées.

La sensibilité de la méthode de quantification utilisée pourrait également être un élément limitant la détection de différences d'expression. En fait, les dosages effectués par comparaison de l'amplification de T-bet et Gata-3 avec l'amplification de l'actine ne nous donnent pas de valeurs précises du nombre de copies d'ARN présentes. Un dosage par PCR quantitatif en temps réel (qPCR) aurait certainement permis une détection plus précise des niveaux d'expression de T-bet et Gata-3 et pourrait potentiellement révéler une différence qui n'a pas été détectée par la méthode utilisée.

Somme toute, il ne semble pas y avoir de polarisation T_H2 dans les souris HAI pendant leur gestation. Bien qu'ils s'agissent d'un phénomène connu pendant la grossesse, il se peut que le fait de « forcer » une réponse T_H1 en quelque sorte démesurée, ne permette pas le développement de cellules T_H2. Toutefois, un qPCR effectué spécifiquement sur l'ARN des cellules CD4⁺ serait nécessaire afin de confirmer hors de tout doute cette affirmation.

4.5 L'augmentation des Tregs : Un mécanisme possiblement impliqué dans la rémission de l'HAI pendant la grossesse

Les souris HAI gestantes présentent une augmentation du pourcentage de Tregs hépatiques par rapport aux souris HAI non-gestantes. Aucune différence significative n'est observée pour les Tregs de la rate. Cette augmentation des Tregs hépatiques pendant la grossesse est particulièrement intéressante car ces cellules ont un rôle majeur dans le maintien de la tolérance immunitaire envers les antigènes du foie.

L'augmentation des Tregs hépatiques, observée pendant la grossesse dans nos souris HAI, pourrait être le mécanisme responsable de la rémission qui se produit à ce moment. Notre équipe a montré récemment qu'un transfert de Tregs aux souris xéno-immunisées diminue significativement l'inflammation hépatique de ces souris et mène à une rémission [167]. Ces travaux ont également montré que la spécificité des Tregs pour les antigènes du foie n'est pas

requis pour induire la rémission. Un défaut en nombre ou en fonction de ces cellules semble présent chez les patients avec une HAI [67, 68]. Ainsi, face à cette augmentation des Tregs hépatiques pendant la grossesse et voyant leur rôle majeur dans l'HAI, il est à considérer qu'il pourrait s'agir d'un facteur impliqué dans la rémission.

L'augmentation des Tregs hépatiques pourrait expliquer le pourcentage de cellules CD4⁺ productrices d'IL-2 plus élevé chez les souris gestantes que chez les souris non-gestantes. Comme pour les Tregs cette augmentation de l'IL-2 se produit spécifiquement dans le foie. L'augmentation de cette cytokine sans augmentation de l'IFN- γ ne peut être associée à une réponse T_H1 accentuée. Elle pourrait donc être une répercussion de l'augmentation des Tregs hépatiques, qui par consommation de l'IL-2 via leurs nombreux récepteurs CD25, induisent une compensation de la production de cette cytokine par les cellules CD4⁺ [17, 168].

Les Tregs hépatiques des souris HAI gestantes expriment moins le récepteur de chimiokine CXCR3, mais ils s'avèrent tout de même plus nombreux dans le foie. À l'inverse, chez les patients atteints d'HAI en rechute, la proportion de Tregs CXCR3⁺ est accentuée dans le foie puisque les chimiokines inflammatoires CXCL9 et CXCL10 fortement exprimées à ce moment attirent ces Tregs CXCR3⁺ au site inflammé dans le but de contrôler les lymphocytes auto-réactifs [145, 169]. L'augmentation des Tregs hépatiques que nous avons observée est possiblement une répercussion de l'augmentation systémique des Tregs pendant la grossesse, qui se retrouvent dans le foie via la circulation sanguine, sans avoir été attirés en réponse à l'inflammation présente dans cet organe. D'ailleurs une augmentation (non-significative) des Tregs hépatiques a également été observée chez des souris saines en gestation, suggérant que l'inflammation n'est pas nécessaire pour amener les Tregs induits par la grossesse à cet endroit (données non-montrées). Il est possible que les Tregs se trouvant dans le foie expriment d'autres récepteurs de chimiokines ayant permis leur recrutement. Les Tregs se trouvant au *decidua* expriment entre autre les récepteurs CCR4 et CCR5 [110, 111]. Le récepteur CCR5 est également impliqué dans le recrutement de lymphocytes vers le foie inflammé [170]. Ce récepteur pourrait ainsi être impliqué dans la migration des Tregs vers le foie pendant la grossesse.

Une plus grande proportion des Tregs hépatiques chez les souris HAI gestantes exprime le facteur de transcription helios, comparativement aux souris HAI non-gestantes. Cette observation suggère que les Tregs se trouvant dans le foie pendant la grossesse, sont en plus grande partie d'origine thymique. Les Tregs thymiques helios⁺, sont connus pour leur potentiel de suppression élevé [8]. La spécificité des Tregs est également une caractéristique permettant d'augmenter le potentiel suppresseur de ceux-ci. Cette particularité n'a pas été déterminée pour les Tregs hépatiques de nos souris HAI gestantes. Les auto-antigènes impliqués dans la réponse auto-immune de nos souris xéno-immunisées sont exprimés dans le thymus, ce qui rend possible la génération de Tregs thymiques spécifiques contre ces antigènes [95]. Les Tregs thymiques sont d'ailleurs généralement dirigés contre des antigènes du soi [7]. À l'inverse, les Tregs spécifiques aux antigènes fœtaux sont majoritairement induits en périphérie. Puisque les Tregs hépatiques pendant la gestation sont majoritairement d'origine thymique, il est plus probable que les Tregs amenés au foie pendant la gestation soient dirigés contre des antigènes du soi (hépatiques) que contre les antigènes fœtaux. Cette spécificité demeure à déterminer.

Au niveau fonctionnel, aucune différence quant à la production de TGF- β par les Tregs des souris gestantes en comparaison avec les Tregs des souris non-gestantes n'est observée. Leur production d'IL-10 n'a pas pu être comparée puisqu'elle n'était pas quantifiable par cytométrie en flux, en raison du faible nombre de cellules Tregs. Puisqu'il a été montré que la production d'IL-10 est augmentée pendant la grossesse, il aurait été intéressant de pouvoir déterminer si les Tregs de nos souris gestantes produisent plus d'IL-10 [171]. Afin de quantifier la production de cette cytokine, les Tregs pourraient être isolés des autres lymphocytes par une purification sur colonne ciblant le CD25 [167]. Un PCR quantitatif effectué avec l'ARN extrait de ces cellules permettrait certainement une sensibilité suffisante pour détecter des niveaux d'IL-10 précis et en faire la comparaison entre nos deux groupes de souris. L'importance des Tregs infiltrant le foie des souris HAI est soutenue par l'observation que ceux-ci sont majoritairement en division (KI67⁺) contrairement aux Tregs de la rate. Aucune différence quant à la division cellulaire des Tregs n'a été observée entre les souris gestantes et les souris non-gestantes.

Afin de voir si à eux seuls les Tregs peuvent induire la rémission, il serait intéressant de reproduire les résultats obtenus dans une souris déplétée en Tregs, telle que la souris transgénique DERE_G [172]. Un traitement à l'aide d'anticorps ciblant le CD25 pourrait également être envisageable. La souris transgénique DERE_G est générée sur un fond génétique C57BL/6 et elle comporte un récepteur de la toxine diphtérique couplé au facteur de transcription Foxp3, ce qui permet une déplétion spécifique des Tregs suite à l'injection de la toxine [172]. Ces souris pourraient ainsi être xéno-immunisées afin d'induire une HAI, comme nous l'avons fait pour notre modèle, pour ensuite déléter partiellement les Tregs au moment de leur gestation afin de voir les répercussions sur l'inflammation hépatique. Une diminution des Tregs accompagnée de scores histologiques d'inflammation semblables aux souris non-gestantes signifierait que les Tregs pourraient être les principaux responsables de la rémission. À l'inverse, un score inférieur aux souris non-gestantes chez ces souris, malgré la diminution des Tregs, signifierait qu'un mécanisme autre que l'augmentation de cette population de cellules est nécessaire pour induire la rémission. Toutefois, il serait nécessaire de caractériser l'HAI induite dans cette souris transgénique avant de pouvoir l'utiliser comme outil pour l'étude de l'impact de la grossesse.

Il serait également nécessaire de déterminer par quels mécanismes les Tregs hépatiques exercent leur pouvoir suppresseur et voir si ceux-ci sont modifiés pendant la grossesse. Leur production de cytokines régulatrices ne semble pas affectée selon les résultats obtenus. Par contre, puisque leur pourcentage est augmenté dans le foie pendant la grossesse, ceux-ci pourraient agir par consommation de l'IL-2. La lyse cellulaire par les granzymes et l'inhibition de la division cellulaire par les molécules de surface inhibitrices sont d'autres mécanismes d'action des Tregs qui mériteraient d'être investigués. De plus, le potentiel suppresseur des Tregs induits par la grossesses pourraient être étudié dans notre modèle murin en procédant à un transfert adoptif de Tregs provenant de souris gestantes à des souris non-gestantes.

4.6 Autres populations de cellules régulatrices

Les cellules B10 ont été étudiées puisqu'il s'agit d'une population autre que les Tregs ayant des propriétés tolérogènes [21, 22]. Une légère augmentation des B10 dans la rate semble se produire pendant la gestation de nos souris HAI. Toutefois, aucun test statistique n'a révélé de

différence significative, probablement en raison du faible nombre de souris utilisées pour chaque groupe. Le rôle des B10 dans l'auto-immunité fait sujet de discussion depuis plusieurs années [23]. Sachant que l'IL-10 est impliqué dans le maintien de la tolérance pendant la grossesse, le rôle des B10 pendant cette période s'avère une piste de réflexion intéressante. Tout récemment, une équipe a montré l'importance de ces cellules pendant la grossesse [173]. Dans cette étude, une augmentation des B10 spléniques a été observée pendant la gestation des souris. Ce phénomène n'a pas été observé chez les souris sujettes aux avortements spontanés (modèle CBA/J x DBA/2J). Un transfert adoptif de cellules B10 à ces souris a permis de rétablir le pourcentage de rejet des fœtus à une valeur atteignant la normale. La tendance vers une augmentation des B10 que nous avons observé suivrait donc cet ordre d'idée. Toutefois, un échantillon de souris plus grand sera nécessaire afin de vérifier si cette tendance est le reflet d'une augmentation réelle des B10 spléniques.

En plus des Tregs et des cellules B10, les tol-DC sont une population cellulaire ayant un rôle majeur dans le maintien de la tolérance [18]. Ces cellules présentent un phénotype particulier, caractérisé par une atténuation de l'expression des molécules nécessaires à la présentation antigénique et à la co-stimulation. Le rôle de ces cellules dans la grossesse a été largement étudié et celles-ci s'avèrent nécessaires pour la tolérance de la mère envers le fœtus [120]. Nous avons ainsi brièvement tenté d'analyser les DC du foie, afin de voir si celles-ci présentaient un phénotype particulièrement tolérogène chez les souris gestantes qui pourrait limiter l'amplification des cellules auto-réactives au foie et expliquer la diminution en taille et en nombre des infiltrats lymphocytaires observés (données non-montrées). Le nombre de cellules CD11c⁺ recueillies s'est avéré un facteur limitant les expériences possibles sans avoir recours à la compilation des cellules de plusieurs souris. De plus, les DC hépatiques ont un phénotype tolérogène à la base, afin de ne pas réagir contre tous les antigènes alimentaires rencontrés [174]. Puisque l'expression basale des molécules nécessaires à la présentation antigénique et à la co-stimulation (CMH II, CD40, CD80, CD86) s'est avérée très faible, il est difficile de savoir si elles sont encore moins exprimées pendant la grossesse. Tel que démontré par Papenfuss *et al.*, une brève stimulation antigène-spécifique *in vitro* aurait été de mise afin de voir si les DC préservent leur caractéristiques tolérogènes en présence de l'antigène [19]. Une fois stimulées, on pourrait s'attendre à ce que les DC expriment des niveaux plus élevés

de CMH II, CD40, CD80 et CD86, permettant une comparaison entre les souris gestantes et les souris non-gestantes. L'ignorance du peptide reconnu par les cellules auto-réactives dans notre modèle nous a empêché de procéder à cette stimulation.

4.7 Le potentiel de prolifération des lymphocytes face à l'auto-antigène n'est pas affecté pendant la grossesse

Les cellules auto-réactives (lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et lymphocytes B) des souris xéno-immunisées ont un potentiel de prolifération qui n'est pas affecté pendant la gestation. Bien que l'on aurait pensé que la prolifération des lymphocytes auto-réactifs puisse être atténuée par la présence accrue des Tregs pendant la grossesse, tel n'est pas le cas. Cette observation corrèle avec les observations rapportées par une équipe ayant étudié les mécanismes impliqués dans la rémission de la sclérose en plaques ou cours du dernier trimestre de la grossesse dans des souris EAE, qui n'observe également aucune baisse de la prolifération des cellules auto-réactives à ce moment [117].

Alors que cette expérience est normalement effectuée avec des peptides, il est à noter que nous n'avons eu d'autre choix que d'utiliser la protéine mFTCD entière, puisque les peptides reconnus par les cellules auto-réactive ne sont pas connus dans notre modèle. La prolifération en présence des peptides plutôt que la protéine entière ne nécessitant pas d'apprêtement par des CPA serait certainement plus grande et permettrait une meilleure comparaison entre les souris gestantes et les souris non-gestantes. De plus, puisque le nombre de lymphocytes pouvant être extraits du foie des souris est limité, aucune donnée n'a pu être produite quant à la prolifération des lymphocytes infiltrant le foie, seulement les lymphocytes de la rate ont été utilisés. Bien que l'apport sanguin du foie provienne en grande partie de la rate, il serait préférable d'étudier le potentiel de prolifération des cellules au site de l'inflammation. Un test d'incorporation *in vivo* du bromodésoxyuridine (BrdU) aurait peut-être facilité l'étude de la prolifération des cellules dans le foie puisque l'isolation des cellules n'est pas préalable au marquage de prolifération, celui-ci se fait à même le site d'inflammation. Face à l'augmentation des Tregs spécifiquement observée dans le foie, il serait d'autant plus pertinent de voir si ceux-ci limitent la prolifération des cellules auto-réactives à cet endroit.

Il est possible que les Tregs prolifèrent en présence de l'auto-antigène. Dans le cas échéant cela signifierait que ceux-ci sont spécifiques aux auto-antigènes, et pourrait expliquer la plus grande quantité d'IL-10 sécrétée dans le surnageant du test de lymphoprolifération par les cellules de souris gestantes.

4.8 L'expression des molécules permettant le recrutement des lymphocytes au foie n'est pas modifiée pendant la grossesse

Nous avons étudié le niveau d'expression de quelques molécules d'attraction et d'adhésion dans le foie des souris HAI afin de voir si ces molécules étaient moins exprimées pendant la gestation, pouvant ainsi potentiellement limiter l'infiltration des lymphocytes au foie. Les niveaux d'expression des principales molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, VAP-1) et des chimiokines liant le CXCR3 (MIG et IP-10), exprimés par les cellules du foie de nos souris HAI se sont finalement avérés les mêmes chez les souris gestantes que chez les souris non-gestantes. L'expression des chimiokines MIG et IP-10 est induite par l'IFN- γ [167]. Puisque le pourcentage de lymphocytes T produisant de l'IFN- γ dans le foie est maintenu pendant la gestation, il n'est pas surprenant que le niveau d'expression de ces chimiokines soit également le même chez les souris gestantes et les souris non-gestantes. La capacité de recrutement des lymphocytes auto-réactifs au foie ainsi que l'environnement inflammatoire demeurent donc les mêmes pendant la gestation chez nos souris xéno-immunisées. La diminution de l'inflammation observée en histologie est donc probablement plutôt associée à une moins grande production de cellules auto-réactives ou à une meilleure élimination de ces cellules.

4.9 L'HAI affecte la reproduction des souris

Plusieurs femmes atteintes d'HAI ont une diminution de la fertilité. De plus amples investigations seront nécessaires, mais à première vue les souris HAI semblent moins fertiles que les souris saines du même âge. Cette constatation est émise suite à l'observation d'un pourcentage d'accouplements réussis plus faible chez les souris xéno-immunisées que chez les souris C57BL/6 saines du même âge. Toutefois, afin de s'assurer qu'il s'agit d'un problème de fertilité il serait nécessaire de comparer la fréquence à laquelle les souris xéno-immunisées

entament leur cycle estrien. L'estrus est la phase du cycle reproducteur précédant l'ovulation où il y a une possibilité de fécondation. Cette phase peut être déterminée par des frottis vaginaux, qui présentent une morphologie cellulaire et une composition cellulaire typique pour chacune des phases du cycle reproducteur [175]. Une diminution de la fréquence d'apparition de cette phase pourrait être un signe de fertilité réduite.

À l'inverse, il se peut que des facteurs autres que la fertilité soient impliqués dans cette réduction du nombre de grossesses. D'une part, il est possible que les souris HAI soient tout autant fertiles que les souris saines, mais puisqu'elles sont malades, elles sont moins enclines aux accouplements. L'utilisation des bouchons vaginaux comme outil afin de déterminer si l'accouplement a bel et bien eu lieu s'est avérée une méthode peu fiable et il n'est donc pas possible avec cette méthode de comparer si les souris HAI, en présence d'un mâle, vont autant s'accoupler que des souris saines. D'autre part, cette diminution de la reproduction pourrait également être due à une mort précoce des fœtus. Chez la femme enceinte atteinte d'HAI, la mort fœtale est un des risques associés à la grossesse. Le taux de mortalité fœtale reporté chez ces femmes se situe entre 19% et 24% et se produit dans la majorité des cas avant la 20^e semaine de grossesse [176, 177]. Nous n'avons pas observé plus de résorptions fœtales chez les souris HAI que chez les souris saines. Il est donc peu probable que la mort fœtale soit en cause, à moins que celle-ci se produise à un moment si précoce que la résorption n'est pas observable à l'œil nu.

Le faible pourcentage d'accouplements réussis que nous avons pu observé dans nos souris HAI comparé à des C57BL/6 saines du même âge peut donc être causé par une combinaison d'effets. Il se peut que celles-ci présentent une fertilité réduite et que les souris malades ne soient tout simplement pas dans des conditions favorisant l'accouplement.

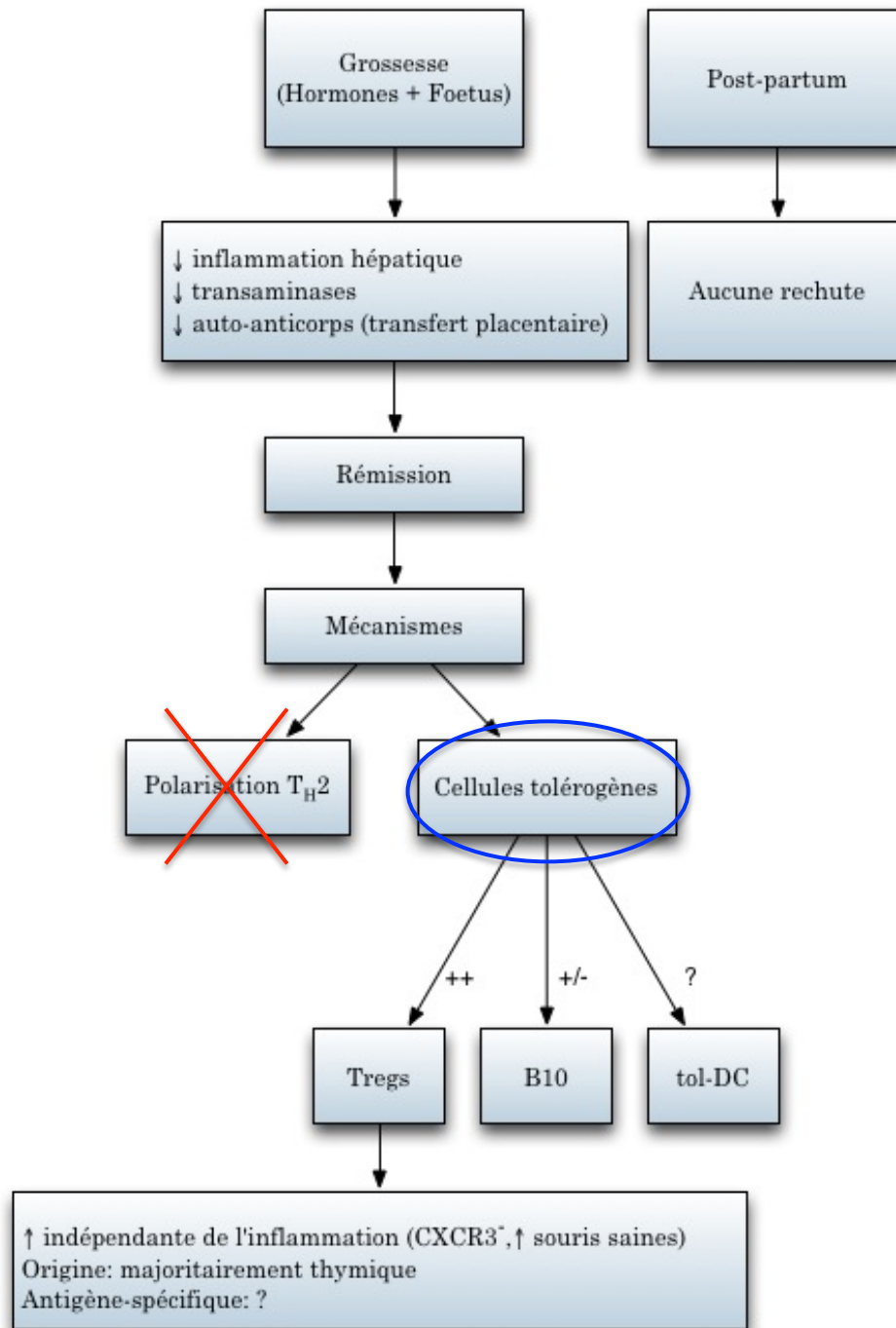


Figure 21 : Schéma résumant les effets de la grossesse sur l'hépatite auto-immune, dans notre modèle murin d'HAI par xéno-immunisation.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Comme il a été observé chez les femmes enceintes atteintes d'HAI, une rémission de la maladie survient pendant la gestation de nos souris xéno-immunisées. Nous en sommes venus à cette conclusion en observant chez les souris gestantes une diminution de l'inflammation hépatique, une baisse des dommages hépatiques qui se traduit par une baisse des transaminases sériques, ainsi qu'une diminution des auto-anticorps circulants. Toutefois, les souris ne présente pas de rechute *post-partum* immédiate comme il se produit dans la majorité des cas chez les femmes, à l'inverse elles semblent demeurer en rémission. Nous supposons donc qu'il est possible que la rechute ne se produise que très tardivement après l'accouchement ou encore que la rémission pendant la grossesse soit suffisante pour rétablir l'homéostasie immunitaire, l'intégrité du foie des souris et prévenir la rechute.

La polarisation T_H2 ne semble pas être impliquée dans la rémission observée puisque les cellules T_H1 et T_H2 sont présentes en proportions similaires chez les souris HAI gestantes et les souris HAI non-gestantes. De plus, la capacité des lymphocytes auto-réactifs à proliférer n'est pas modifiée pendant la gestation, de même que l'environnement inflammatoire et la capacité de recrutement des cellules auto-réactives par le foie.

Le mécanisme responsable de la rémission qui se produit pendant la gestation des souris semble être en lien avec les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ces cellules sont retrouvées en plus grande proportion dans le foie pendant la gestation et présentent des caractéristiques différentes des Tregs hépatiques des souris non-gestantes (expression réduite du récepteur de chimiokines $CXCR3^+$ et une plus grande proportion de Tregs d'origine thymique). Une analyse plus approfondie de cette population sera nécessaire afin de déterminer si le fait d'abaisser le niveau de Tregs des souris gestantes empêche la rémission de se produire.

L'immunomodulation se produisant pendant la grossesse est généralement bénéfique pour les patientes atteintes d'HAI. Une meilleure compréhension de la rémission pendant la grossesse est donc d'un grand intérêt pour le développement éventuel de nouveaux traitements, plus spécifiques que les traitements actuels. Voyant un rôle potentiel des Tregs dans cette rémission, une thérapie favorisant cette population cellulaire pourrait être une piste intéressante dans le

futur. Autant les hormones présentes en grandes concentrations, que les antigènes fœtaux peuvent induire la tolérance immunitaire pendant la grossesse, entre autre par les Tregs. Il serait ainsi pertinent d'étudier le rôle des hormones associées à la grossesse indépendamment du rôle du fœtus allogénique afin de déterminer si une thérapie hormonale est envisageable.

RÉFÉRENCES

1. Szabo, S.J., et al., *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell, 2000. **100**(6): p. 655-69.
2. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
3. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
4. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
5. Josefowicz, S.Z., et al., *Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 395-9.
6. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
7. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.
8. Zabransky, D.J., et al., *Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34547.
9. Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson, *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 772-82.
10. Taniguchi, R.T. and M.S. Anderson, *The role of Aire in clonal selection*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(1): p. 40-4.
11. Peterson, P., et al., *Autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED): a model disease to study molecular aspects of endocrine autoimmunity*. Clin Exp Immunol, 2004. **135**(3): p. 348-57.
12. Olive, D., et al., *[The role of co-inhibitory signals driven by CTLA-4 in immune system]*. Med Sci (Paris), 2011. **27**(10): p. 842-9.
13. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 219-42.
14. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. Cell, 1997. **88**(3): p. 355-65.
15. Buckner, J.H., *Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 849-59.
16. Wildin, R.S., S. Smyk-Pearson, and A.H. Filipovich, *Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome*. J Med Genet, 2002. **39**(8): p. 537-45.
17. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
18. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
19. Papenfuss, T.L., et al., *Estriol generates tolerogenic dendritic cells in vivo that protect against autoimmunity*. J Immunol, 2011. **186**(6): p. 3346-55.

20. Ueno, A., et al., *Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes*. Diabetes, 2007. **56**(6): p. 1686-93.
21. DiLillo, D.J., T. Matsushita, and T.F. Tedder, *B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1183**: p. 38-57.
22. Lund, F.E. and T.D. Randall, *Effector and regulatory B cells: modulators of CD4+ T cell immunity*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(4): p. 236-47.
23. Kalampokis, I., A. Yoshizaki, and T.F. Tedder, *IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease*. Arthritis Res Ther, 2013. **15 Suppl 1**: p. S1.
24. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin, *Autoimmune disease: why and where it occurs*. Nat Med, 2001. **7**(8): p. 899-905.
25. Lapierre, P. and F. Alvarez, *[The liver: an organ of the immune system?]*. Med Sci (Paris), 2007. **23**(11): p. 985-90.
26. Lapierre, P., K. Beland, and F. Alvarez, *Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis*. Transl Res, 2007. **149**(3): p. 107-13.
27. Warren, A., et al., *T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells*. Hepatology, 2006. **44**(5): p. 1182-90.
28. Mackay, I.R., *Historical reflections on autoimmune hepatitis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(21): p. 3292-300.
29. Czaja, A.J., et al., *Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1996. **24**(5): p. 1068-73.
30. Czaja, A.J., et al., *Frequency and significance of antibodies to histones in autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 1995. **23**(1): p. 32-8.
31. Alvarez, F., *Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis*. Clin Liver Dis, 2006. **10**(1): p. 89-107, vi.
32. 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.
33. Manns, M.P., et al., *Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1*. J Clin Invest, 1989. **83**(3): p. 1066-72.
34. 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.
35. Wies, I., et al., *Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1510-5.
36. Costa, M., et al., *Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis*. Clin Exp Immunol, 2000. **121**(2): p. 364-74.
37. Mieli-Vergani, G. and D. Vergani, *Autoimmune hepatitis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011. **8**(6): p. 320-9.
38. 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.
39. Ishak, K., et al., *Histological grading and staging of chronic hepatitis*. J Hepatol, 1995. **22**(6): p. 696-9.

40. Rigopoulou, E.I., et al., *Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found*. *Autoimmun Rev*, 2012. **12**(2): p. 260-9.
41. Deniziaut, G., E. Ballot, and C. Johanet, *Antineutrophil cytoplasmic auto-antibodies (ANCA) in autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis*. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2013. **37**(1): p. 105-7.
42. Aotsuka, S., et al., *Antibodies against sulphatide in sera from patients with autoimmune rheumatic diseases*. *Clin Exp Immunol*, 1992. **87**(3): p. 438-43.
43. Whitacre, C.C., *Sex differences in autoimmune disease*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 777-80.
44. Michaels, R.M. and K.D. Rogers, *A sex difference in immunologic responsiveness*. *Pediatrics*, 1971. **47**(1): p. 120-3.
45. Amadori, A., et al., *Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans*. *Nat Med*, 1995. **1**(12): p. 1279-83.
46. Karpuzoglu-Sahin, E., et al., *Effects of long-term estrogen treatment on IFN-gamma, IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice*. *Cytokine*, 2001. **14**(4): p. 208-17.
47. Araneo, B.A., et al., *Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells*. *Blood*, 1991. **78**(3): p. 688-99.
48. Beland, K., P. Lapierre, and F. Alvarez, *Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(9): p. 1025-34.
49. Doherty, D.G., et al., *Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 1994. **19**(3): p. 609-15.
50. Ma, Y., et al., *Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2*. *Gastroenterology*, 2006. **130**(3): p. 868-82.
51. Agarwal, K., et al., *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 2000. **31**(1): p. 49-53.
52. Hiraide, A., et al., *Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis*. *Am J Gastroenterol*, 2005. **100**(6): p. 1322-9.
53. Tang, J., et al., *Association of polymorphisms in non-classic MHC genes with susceptibility to autoimmune hepatitis*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2012. **11**(2): p. 125-31.
54. Cookson, S., et al., *Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 1999. **30**(4): p. 851-6.
55. Czaja, A.J., et al., *Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis*. *Gastroenterology*, 1999. **117**(3): p. 645-52.
56. Vogel, A., C.P. Strassburg, and M.P. Manns, *Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 2002. **35**(1): p. 126-31.
57. Vogel, A., et al., *Autoimmune regulator AIRE: evidence for genetic differences between autoimmune hepatitis and hepatitis as part of the autoimmune polyglandular syndrome type 1*. *Hepatology*, 2001. **33**(5): p. 1047-52.
58. Lankisch, T.O., et al., *AIRE gene analysis in children with autoimmune hepatitis type I or II*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2009. **48**(4): p. 498-500.

59. Rigopoulou, E.I., et al., *Epstein-barr virus as a trigger of autoimmune liver diseases*. Adv Virol, 2012. **2012**: p. 987471.
60. Lapiere, 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.
61. 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.
62. Gueguen, M., et al., *Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody*. J Autoimmun, 1991. **4**(4): p. 607-15.
63. Beland, K., et al., *Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection*. J Autoimmun, 2004. **22**(2): p. 159-66.
64. Marceau, G., et al., *LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry?* Hepatology, 2005. **42**(3): p. 675-82.
65. Lapiere, P., et al., *A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1066-74.
66. 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.
67. Longhi, M.S., et al., *Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease*. J Hepatol, 2004. **41**(1): p. 31-7.
68. Longhi, M.S., et al., *Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis*. J Immunol, 2006. **176**(7): p. 4484-91.
69. Peiseler, M., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency*. J Hepatol, 2012. **57**(1): p. 125-32.
70. Liberal, R., et al., *The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway*. Hepatology, 2012. **56**(2): p. 677-86.
71. Longhi, M.S., et al., *Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25(-) cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 2012. **142**(7): p. 1526-35 e6.
72. Alvarez, F., et al., *Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children*. J Hepatol, 1999. **30**(2): p. 222-7.
73. Cuarterolo, M., et al., *Follow-up of children with autoimmune hepatitis treated with cyclosporine*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **43**(5): p. 635-9.
74. Jackson, L.D. and E. Song, *Cyclosporin in the treatment of corticosteroid resistant autoimmune chronic active hepatitis*. Gut, 1995. **36**(3): p. 459-61.
75. Halac, U. and F. Alvarez, *Hepatitis: new hope for difficult cases of autoimmune hepatitis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2009. **6**(11): p. 629-30.
76. Burak, K.W., et al., *Rituximab for the treatment of patients with autoimmune hepatitis who are refractory or intolerant to standard therapy*. Can J Gastroenterol, 2013. **27**(5): p. 273-80.
77. D'Agostino, D., A. Costaguta, and F. Alvarez, *Successful treatment of refractory autoimmune hepatitis with rituximab*. Pediatrics, 2013. **132**(2): p. e526-30.
78. Weiler-Normann, C., et al., *Infliximab as a rescue treatment in difficult-to-treat autoimmune hepatitis*. J Hepatol, 2013. **58**(3): p. 529-34.

79. Mori, Y., et al., *Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice*. Clin Exp Immunol, 1984. **57**(1): p. 85-92.
80. Lohse, A.W., et al., *Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity*. Hepatology, 1990. **11**(1): p. 24-30.
81. Mori, Y., et al., *Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins*. Clin Exp Immunol, 1985. **61**(3): p. 577-84.
82. Jaeckel, E., M. Hardtke-Wolenski, and K. Fischer, *The benefit of animal models for autoimmune hepatitis*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011. **25**(6): p. 643-51.
83. 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.
84. 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.
85. Lohr, H.F., et al., *Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis*. Hepatology, 1996. **24**(6): p. 1416-21.
86. 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.
87. 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.
88. Hardtke-Wolenski, M., R. Taubert, and E. Jaeckel, *Animal models for autoimmune liver disease--what is relevant for immune-mediated liver disease*. Dig Dis, 2012. **30 Suppl 1**: p. 2-10.
89. 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.
90. Corse, E., et al., *Cutting edge: chronic inflammatory liver disease in mice expressing a CD28-specific ligand*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 526-30.
91. Krummel, M.F., T.J. Sullivan, and J.P. Allison, *Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo*. Int Immunol, 1996. **8**(4): p. 519-23.
92. Djilali-Saiah, I., et al., *CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis*. Hum Immunol, 2001. **62**(12): p. 1356-62.
93. Song, K., Y. Chang, and G.J. Prud'homme, *Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer*. Gene Ther, 2000. **7**(6): p. 481-92.
94. Lapierre, 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.
95. 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.
96. 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.
97. Christen, U., E. Hintermann, and E. Jaeckel, *New animal models for autoimmune hepatitis*. Semin Liver Dis, 2009. **29**(3): p. 262-72.
98. 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.

99. Munoz-Suano, A., A.B. Hamilton, and A.G. Betz, *Gimme shelter: the immune system during pregnancy*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 20-38.
100. Erlebacher, A., *Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(1): p. 23-33.
101. Aluvihare, V.R., M. Kallikourdis, and A.G. Betz, *Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus*. Nat Immunol, 2004. **5**(3): p. 266-71.
102. Oreshkova, T., R. Dimitrov, and M. Mourdjeva, *A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2012. **68**(5): p. 366-73.
103. Leber, A., A. Teles, and A.C. Zenclussen, *Regulatory T cells and their role in pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 445-59.
104. Guetta, E., et al., *Hematopoietic progenitor cells as targets for non-invasive prenatal diagnosis: detection of fetal CD34+ cells and assessment of post-delivery persistence in the maternal circulation*. Blood Cells Mol Dis, 2003. **30**(1): p. 13-21.
105. Kahn, D.A. and D. Baltimore, *Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(20): p. 9299-304.
106. Della Bella, S., et al., *Incomplete activation of peripheral blood dendritic cells during healthy human pregnancy*. Clin Exp Immunol, 2011. **164**(2): p. 180-92.
107. Thuere, C., et al., *Kinetics of regulatory T cells during murine pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2007. **58**(6): p. 514-23.
108. Zenclussen, A.C., et al., *Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 811-22.
109. Heikkinen, J., et al., *Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua*. Clin Exp Immunol, 2004. **136**(2): p. 373-8.
110. Mjosberg, J., et al., *FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua*. Biol Reprod, 2010. **82**(4): p. 698-705.
111. Kallikourdis, M., et al., *Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 594-9.
112. Samstein, R.M., et al., *Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict*. Cell, 2012. **150**(1): p. 29-38.
113. Vigano, P., et al., *Expression of interleukin-10 and its receptor is up-regulated in early pregnant versus cycling human endometrium*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(12): p. 5730-6.
114. Guleria, I., et al., *A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 231-7.
115. Cordeau, M., et al., *Defects in CD54 and CD86 up-regulation by plasmacytoid dendritic cells during pregnancy*. Immunol Invest, 2012. **41**(5): p. 497-506.
116. Alfthan, H. and U.H. Stenman, *Pathophysiological importance of various molecular forms of human choriogonadotropin*. Mol Cell Endocrinol, 1996. **125**(1-2): p. 107-20.

117. Langer-Gould, A., et al., *Late pregnancy suppresses relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for a suppressive pregnancy-related serum factor*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 1084-91.
118. Wan, H., et al., *Chorionic gonadotropin induces dendritic cells to express a tolerogenic phenotype*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(4): p. 894-901.
119. Khan, N.A., et al., *Inhibition of diabetes in NOD mice by human pregnancy factor*. Hum Immunol, 2001. **62**(12): p. 1315-23.
120. Makrigiannakis, A., et al., *Fetomaternal immunotolerance*. Am J Reprod Immunol, 2008. **60**(6): p. 482-96.
121. Kayisli, U.A., et al., *Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system*. J Immunol, 2003. **171**(5): p. 2305-13.
122. Mao, G., et al., *Progesterone increases systemic and local uterine proportions of CD4+CD25+ Treg cells during midterm pregnancy in mice*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5477-88.
123. Yates, M.A., et al., *Progesterone treatment reduces disease severity and increases IL-10 in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2010. **220**(1-2): p. 136-9.
124. Piccinni, M.P., et al., *Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 128-33.
125. Lelu, K., et al., *Estrogen receptor alpha signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of Th1 and Th17 cell differentiation and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2386-93.
126. Gilliver, S.C., *Sex steroids as inflammatory regulators*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **120**(2-3): p. 105-15.
127. Sugiyama, N., et al., *ERbeta: recent understanding of estrogen signaling*. Trends Endocrinol Metab, 2010. **21**(9): p. 545-52.
128. Cutolo, M., et al., *The immunomodulatory effects of estrogens: clinical relevance in immune-mediated rheumatic diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1193**: p. 36-42.
129. Pernis, A.B., *Estrogen and CD4+ T cells*. Curr Opin Rheumatol, 2007. **19**(5): p. 414-20.
130. Karpuzoglu, E., et al., *IFN-gamma-inducing transcription factor, T-bet is upregulated by estrogen in murine splenocytes: role of IL-27 but not IL-12*. Mol Immunol, 2007. **44**(7): p. 1808-14.
131. Krishnan, L., et al., *Pregnancy impairs resistance of C57BL/6 mice to Leishmania major infection and causes decreased antigen-specific IFN-gamma response and increased production of T helper 2 cytokines*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 644-52.
132. Bebo, B.F., Jr., et al., *Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains*. J Immunol, 2001. **166**(3): p. 2080-9.
133. Ostensen, M. and P.M. Villiger, *Immunology of pregnancy-pregnancy as a remission inducing agent in rheumatoid arthritis*. Transpl Immunol, 2002. **9**(2-4): p. 155-60.
134. Lorenzi, A.R. and H.L. Ford, *Multiple sclerosis and pregnancy*. Postgrad Med J, 2002. **78**(922): p. 460-4.

135. Quintero, O.L., et al., *Autoimmune disease and gender: plausible mechanisms for the female predominance of autoimmunity*. J Autoimmun, 2012. **38**(2-3): p. J109-19.
136. Forger, F., et al., *Pregnancy induces numerical and functional changes of CD4+CD25 high regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(7): p. 984-90.
137. Westbrook, R.H., et al., *Outcomes of pregnancy in women with autoimmune hepatitis*. J Autoimmun, 2012. **38**(2-3): p. J239-44.
138. Buchel, E., et al., *Improvement of autoimmune hepatitis during pregnancy followed by flare-up after delivery*. Am J Gastroenterol, 2002. **97**(12): p. 3160-5.
139. Terrabuio, D.R., et al., *Follow-up of pregnant women with autoimmune hepatitis: the disease behavior along with maternal and fetal outcomes*. J Clin Gastroenterol, 2009. **43**(4): p. 350-6.
140. Schramm, C., et al., *Pregnancy in autoimmune hepatitis: outcome and risk factors*. Am J Gastroenterol, 2006. **101**(3): p. 556-60.
141. Orbach, H., et al., *Prolactin and autoimmunity: hyperprolactinemia correlates with serositis and anemia in SLE patients*. Clin Rev Allergy Immunol, 2012. **42**(2): p. 189-98.
142. Ostensen, M. and F. Forger, *How safe are anti-rheumatic drugs during pregnancy?* Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(3): p. 470-5.
143. Gervais, A., et al., *Decrease in serum ALT and increase in serum HCV RNA during pregnancy in women with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2000. **32**(2): p. 293-9.
144. Vitozzi, S., et al., *Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein*. J Immunol Methods, 2002. **262**(1-2): p. 103-10.
145. Oo, Y.H., et al., *Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2886-98.
146. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
147. Beland, K., et al., *Liver restores immune homeostasis after local inflammation despite the presence of autoreactive T cells*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e48192.
148. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.
149. Tamauchi, H., et al., *Evidence of GATA-3-dependent Th2 commitment during the in vivo immune response*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 179-87.
150. Holdsworth, S.R., A.R. Kitching, and P.G. Tipping, *Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis*. Kidney Int, 1999. **55**(4): p. 1198-216.
151. Martin, R.M., J.L. Brady, and A.M. Lew, *The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice*. J Immunol Methods, 1998. **212**(2): p. 187-92.
152. Gilmore, W., et al., *Preliminary studies of cytokine secretion patterns associated with pregnancy in MS patients*. J Neurol Sci, 2004. **224**(1-2): p. 69-76.
153. Zachou, K., E. Rigopoulou, and G.N. Dalekos, *Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease*. J Autoimmune Dis, 2004. **1**(1): p. 2.

154. Janeway C.A, T.P., Walport M., *Immunobiology*. 7th ed. 2008, New York: Garland Publishing. 887.
155. Forger, F., et al., *Pregnancy mediated improvement of rheumatoid arthritis*. Swiss Med Wkly, 2012. **142**: p. w13644.
156. Palmeira, P., et al., *IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 985646.
157. Benster, B. and E.J. Wood, *Immunoglobulin levels in normal pregnancy and pregnancy complicated by hypertension*. J Obstet Gynaecol Br Commonw, 1970. **77**(6): p. 518-22.
158. Pitcher-Wilmott, R.W., P. Hindocha, and C.B. Wood, *The placental transfer of IgG subclasses in human pregnancy*. Clin Exp Immunol, 1980. **41**(2): p. 303-8.
159. Vergani, D., et al., *Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage*. Liver, 1987. **7**(6): p. 307-15.
160. Gerth, A.J., L. Lin, and S.L. Peng, *T-bet regulates T-independent IgG2a class switching*. Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 937-44.
161. Hay, F.C., M.G. Hull, and G. Torrigiani, *The transfer of human IgG subclasses from mother to foetus*. Clin Exp Immunol, 1971. **9**(3): p. 355-8.
162. Simister, N.E., *Placental transport of immunoglobulin G*. Vaccine, 2003. **21**(24): p. 3365-9.
163. Garty, B.Z., et al., *Placental transfer of immunoglobulin G subclasses*. Clin Diagn Lab Immunol, 1994. **1**(6): p. 667-9.
164. Vergani, D. and G. Mieli-Vergani, *Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(21): p. 3306-12.
165. Dorfman, D.M., et al., *T-bet, a T-cell-associated transcription factor, is expressed in a subset of B-cell lymphoproliferative disorders*. Am J Clin Pathol, 2004. **122**(2): p. 292-7.
166. Heckman, K.L., et al., *T-bet expression by dendritic cells is required for the repolarization of allergic airway inflammation*. Eur J Immunol, 2008. **38**(9): p. 2464-74.
167. Lapierre, P., et al., *Adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells in an autoimmune hepatitis murine model restores peripheral tolerance*. Hepatology, 2013. **57**(1): p. 217-27.
168. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008. **133**(5): p. 775-87.
169. Eksteen, B., et al., *Epithelial inflammation is associated with CCL28 production and the recruitment of regulatory T cells expressing CCR10*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 593-603.
170. Ajuebor, M.N., J.A. Carey, and M.G. Swain, *CCR5 in T cell-mediated liver diseases: what's going on?* J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2039-45.
171. Thaxton, J.E. and S. Sharma, *Interleukin-10: a multi-faceted agent of pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2010. **63**(6): p. 482-91.
172. 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.
173. Jensen, F., et al., *Regulatory B10 Cells Restore Pregnancy Tolerance in a Mouse Model*. Biol Reprod, 2013.

174. Thomson, A.W., et al., *Immunobiology of liver dendritic cells*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(1): p. 65-73.
175. Goldman, J.M., A.S. Murr, and R.L. Cooper, *The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies*. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2007. **80**(2): p. 84-97.
176. Aggarwal, N., et al., *Pregnancy outcome in women with autoimmune hepatitis*. Arch Gynecol Obstet, 2011. **284**(1): p. 19-23.
177. Uribe, M., N.C. Chavez-Tapia, and N. Mendez-Sanchez, *Pregnancy and autoimmune hepatitis*. Ann Hepatol, 2006. **5**(3): p. 187-9.