

Université de Montréal

Rôle des lymphocytes T CD4 et de l'environnement cytokinique sur l'activité et la pathogenèse  
de l'hépatite auto-immune

*Par*

Vanessa Navalhas Cipriano

Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maître en Sciences biomédicales, option  
Médecine expérimentale

Décembre 2023

© Vanessa Navalhas Cipriano, 2023



Université de Montréal

Faculté de médecine

---

*Ce mémoire intitulé*

**Rôle des lymphocytes T CD4 et de l'environnement cytokinique sur l'activité et la pathogenèse de l'hépatite auto-immune**

*Présenté par*

**Vanessa Navalhas Cipriano**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Mélanie Dieudé**

Président-rapporteur

**Marc Bilodeau**

Directeur de recherche

**Pascal Lapierre**

Codirecteur

**Massimiliano Paganelli**

Membre du jury



## Résumé

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie auto-immune multifactorielle du foie de pathogénèse inconnue. Cette maladie est caractérisée par une perte de la tolérance immunologique envers des antigènes du soi hépatiques entraînant une destruction progressive du parenchyme hépatique en absence de traitements. La prednisone avec l'azathioprine est le traitement de première ligne pour les patients atteints d'HAI. Cette combinaison d'immunosuppresseurs permet de réduire l'inflammation du foie et permet d'induire une rémission chez environ 80 à 90% des patients. Bien que la majorité des patients atteints d'HAI répondent bien à long terme aux traitements disponibles, 10 à 20% de ceux-ci ne répondront pas aux traitements, développeront une cirrhose et pourront nécessiter éventuellement d'une greffe hépatique. Puisqu'à l'heure actuelle aucun test clinique, biologique ou histologique n'est capable de prédire s'il y aura réponse aux traitements et rémission chez les patients atteints d'HAI, il est important d'identifier des biomarqueurs capables de prédire la réponse au traitement et l'activité de la maladie chez ces patients. L'hypothèse de ce projet est que la rémission clinique et une réponse favorable au traitement chez les patients HAI sont influencées par des médiateurs immunologiques (cellules et/ou cytokines) qui, lorsqu'identifiés, pourraient être utilisés pour évaluer la réponse au traitement. Le but de ce projet est donc d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI.

Selon les résultats obtenus, il est possible de suggérer que l'IL-16 pourrait influencer l'activité de l'HAI en affectant à la fois les voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Les résultats obtenus suggèrent aussi que l'IL-10, l'IL-16 et certaines sous-populations de lymphocytes T CD4 effecteurs et régulateurs pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider l'utilité de ces biomarqueurs dans la prédiction de la réponse au traitement et de l'activité de la maladie chez les patients atteints d'HAI.

**Mots-clés :** Auto-immunité, biomarqueur, cytokine.



## Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a multifactorial autoimmune liver disease of unknown pathogenesis characterized by a loss of immunological tolerance towards hepatic self-antigens leading to progressive destruction of the liver parenchyma in the absence of treatment. Prednisone with azathioprine is the first-line treatment for AIH patients. This combination of immunosuppressants helps reduce liver inflammation and induces remission in approximately 80 to 90% of patients. Although most AIH patients respond to available treatments, 10 to 20% will not respond to treatment and will develop cirrhosis and may eventually require a liver transplant. Currently, no clinical, biological, or histological parameters can predict the initial response to treatment or long-term remission of patients with AIH. Therefore, there is a crying need for reliable biomarkers capable of predicting response to treatment and disease activity in these patients. The hypothesis of this project is that clinical remission and a favorable response to treatment in AIH patients are influenced by immunological mediators (cells and/or cytokines) which, when identified, could be used to evaluate the response to treatment. The aim of this project is therefore to identify biomarker(s) of disease activity and treatment response in AIH patients.

According to our results, we believe that IL-16 could influence AIH activity by affecting both pro-inflammatory and anti-inflammatory pathways. Our results also suggest that IL-10, IL-16 and subpopulations of effector and regulatory CD4 T cells could be putative biomarkers of disease activity and response to treatment in AIH patients. However, further research is needed to validate the usefulness of these biomarkers in predicting treatment response and disease activity in AIH patients.

**Keywords:** Autoimmunity, biomarker, cytokine.



# Table des matières

Résumé .....	5
Abstract .....	7
Table des matières .....	9
Liste des tableaux .....	13
Liste des figures .....	15
Liste des sigles et abréviations .....	17
Remerciements .....	21
Chapitre 1 – Le système immunitaire .....	23
Immunité innée .....	23
Réponse inflammatoire .....	24
Cytokines .....	25
Macrophages .....	26
Cellules Natural Killer .....	27
Cellules dendritiques .....	27
Immunité adaptative .....	29
Immunité cellulaire .....	29
Lymphocytes T CD8 cytotoxiques .....	29
Lymphocytes T CD4 auxiliaires .....	30
Cellules NKT .....	32
Immunité humorale .....	32
Lymphocytes B .....	33
Anticorps .....	34

Réponse mémoire .....	34
Tolérance .....	35
Tolérance centrale.....	36
Tolérance périphérique .....	37
Tolérance du foie.....	38
Bris de tolérance du soi .....	40
Autoimmunité .....	41
Maladies auto-immunes systémiques (non spécifiques d'organes).....	41
Maladies auto-immunes spécifiques d'organes .....	42
Chapitre 2 – Hépatite auto-immune .....	43
Épidémiologie.....	43
Susceptibilité .....	43
Manifestations cliniques .....	44
Histologie.....	44
Évaluation histologique.....	45
Biochimie.....	45
Diagnostic.....	45
Traitement.....	47
Pathogenèse.....	49
Lymphocytes T CD4 .....	51
Interleukine-16.....	52
Interleukine-10.....	53
Interleukine-2 .....	54
Chapitre 3 – Projet de mémoire.....	55

Hypothèses de travail.....	55
Objectifs de recherche .....	56
Chapitre 4 – Méthodologie .....	57
Chapitre 5 – Résultats .....	69
IL-16.....	70
IL-10.....	75
IL-2.....	80
Analyse PCA.....	82
Chapitre 6 – Discussion générale .....	85
IL-16.....	86
IL-10.....	92
IL-2.....	95
Analyse PCA.....	98
Chapitre 7 – Conclusion.....	101
Références bibliographiques.....	105



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Critères de diagnostic simplifié de l’HAI.....	47
<b>Tableau 2.</b> Caractéristiques morphologiques de la biopsie pour la classification de l’histologie dans les critères de diagnostic simplifié de l’HAI.....	47
<b>Tableau 3.</b> Caractéristiques des amorces spécifiques à nos gènes d’intérêts.....	59
<b>Tableau 4.</b> Panels et caractéristiques des anticorps utilisés en cytométrie en flux.....	61
<b>Tableau 5.</b> Analyse PCA en fonction des niveaux de sous-populations de lymphocytes T effecteurs.....	83
<b>Tableau 6.</b> Analyse PCA en fonction des niveaux de sous-populations de lymphocytes T régulateurs.....	84



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Immunopathogénèse de l'hépatite auto-immune.....	50
<b>Figure 2.</b> Effets de l'IL-16 sur les lymphocytes T CD4.....	53
<b>Figure 3.</b> Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD4 effecteurs.....	62
<b>Figure 4.</b> Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD8.....	63
<b>Figure 5.</b> Stratégie de gating pour les cellules natural killer (NK).....	64
<b>Figure 6.</b> Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD4 régulateurs.....	65
<b>Figure 7.</b> Schématisation de l'essai de migration.....	67
<b>Figure 8.</b> Stratégie de gating pour les lymphocytes T dans les essai de migration.....	68
<b>Figure 9.</b> Évaluation des niveaux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe et l'année du diagnostic.....	70
<b>Figure 10.</b> Les patients HAI ont des taux circulants d'IL-16 significativement plus faibles après le traitement.....	71
<b>Figure 11.</b> Les patients HAI avec des taux élevés d'ALT ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés.....	71
<b>Figure 12.</b> Les patients HAI traités à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-16 nettement inférieurs.....	72
<b>Figure 13.</b> Les niveaux plasmatiques d'IL-16 corrént avec les niveaux de lymphocytes T CD4 activés chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT.....	73
<b>Figure 14.</b> Les niveaux plasmatiques d'IL-16 corrént avec les niveaux de lymphocytes T CD4 régulateurs chez les patients HAI.....	73
<b>Figure 15.</b> Les taux plasmatiques d'IL-16 corrént avec les taux plasmatiques d'IL-2 chez les patients HAI.....	74

<b>Figure 16.</b> <i>In vitro</i> , l'IL-16 favorise de manière préférentielle la migration des lymphocytes T CD4 chez les patients HAI.....	74
<b>Figure 17.</b> Les patients HAI ayant une expression hépatique élevée d'IL-16 ont des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés.....	75
<b>Figure 18.</b> Évaluation des niveaux plasmatique d'IL-10 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe, de l'année du diagnostic, des niveaux d'ALT et du traitement.....	76
<b>Figure 19.</b> Les patients HAI qui répondent au traitement expriment plus d'IL-10.....	77
<b>Figure 20.</b> Les taux plasmatiques d'IL-10 corréntent avec les taux d'ALT chez les patients HAI.....	78
<b>Figure 21.</b> Les niveaux d'expression d'IL-10 corréntent avec les niveaux de cellules T régulatrices chez les patients HAI.....	78
<b>Figure 22.</b> Les patients HAI qui répondent au traitement ont des taux normaux de T <sub>REG</sub> .....	79
<b>Figure 23.</b> Évaluation des niveaux plasmatique d'IL-2 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe, de l'année du diagnostic et des niveaux d'ALT.....	80
<b>Figure 24.</b> Les patients HAI traités à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-2 nettement inférieurs.....	81
<b>Figure 25.</b> Mécanismes proposés pour les dommages causés au foie chez les patients atteints d'HAI.....	103

## Liste des sigles et abréviations

PAMP : Motifs moléculaires associés aux pathogènes

PRR : Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires

DAMP : Motifs moléculaires associés aux dégâts

NLR : Récepteurs de type NOD

TLR : Récepteurs de type Toll

RLR : Récepteurs de type RIG-I

CLR : Lectines de type C

CAM : Molécules d'adhésion cellulaire

IL : Interleukines

IFN : Interférons

TNF : Facteurs de nécrose des tumeurs

CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible

NK : Natural Killer

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

TCR : Récepteur des lymphocytes T

CTL : Lymphocyte T CD8 cytotoxique

FasL : Ligand de Fas

T<sub>REG</sub> : Lymphocyte T régulateur

T<sub>FH</sub> : Lymphocytes T auxiliaire folliculaire

Ig : Immunoglobuline

BCR : Récepteur des lymphocytes B

TD : Thymo-dépendante

TI : Thymo-indépendante

CG : Centre germinatif

T<sub>M</sub> : Lymphocyte T mémoire

T<sub>CM</sub> : Lymphocytes T central mémoire

T<sub>EM</sub> : Lymphocyte T effecteur mémoire

T<sub>RM</sub> : Lymphocyte T résident mémoire

DP : Thymocyte double positif (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>)

cTEC : Cellule épithéliale du cortex thymique

SP : Thymocyte simple positif (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>)

TSA : Antigène tissu spécifique

mTEC : Cellule épithéliale de la médulla thymique

nT<sub>REG</sub> : Lymphocyte T régulateur naturel

iT<sub>REG</sub> : Lymphocyte T régulateur induit en périphérie

HAI : Hépatite auto-immune

ANA : anticorps anti-nucléaire

SMA : anticorps anti-muscle lisse

LKM1 : anticorps anti-foie-rein microsome

LC1 : anticorps anti-foie cytosol 1

HLA : antigène leucocytaire humain

CBP : Cholangite biliaire primitive

CSP : Cholangite sclérosante primitive

ALT : Alanine aminotransférase

AST : Aspartate aminotransférase

IL-16 : Interleukine-16

IL-10 : Interleukine-10

IL-2 : Interleukine-2

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique



## Remerciements

Je désire commencer ce mémoire en remerciant toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien au courant de mes études aux cycles supérieurs et aidé lors de la rédaction de ce mémoire.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Marc Bilodeau, ainsi que de mon codirecteur, Dr Pascal Lapierre. Tous les deux, vous m'avez donné tous les outils nécessaires à ma réussite et vous m'avez permis de parfaire mes connaissances tout au long de ma maîtrise. Pascal, je tiens à te remercier pour ta patience, ta disponibilité et de tes judicieux conseils qui ont contribué au succès de mes études aux cycles supérieurs. Tu as été un excellent mentor qui a toujours cru en moi même lorsque je doutais de moi.

J'aimerais aussi remercier l'équipe de recherche avec qui j'ai travaillé durant mes études. Valérie-Ann, tu m'as partagé tes connaissances et expériences dans ce milieu, ce qui m'a permis de parfaire mes habilités en laboratoire. Vincent, tu m'as aidé et conseillé durant mes deux ans de maîtrise. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance dans l'exécution de différentes techniques au laboratoire. Travailler avec vous au laboratoire me manquera grandement.

Je ne pourrais terminer sans dire un merci à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenu tout au long de mes études. Je voudrais remercier mes parents, Cristiana et Rui, pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis afin que je puisse réaliser mes rêves. J'aimerais aussi remercier mon frère, Samuel, qui me fait toujours beaucoup rire grâce à sa bonne humeur contagieuse. Je remercie finalement mon amoureux, Hugues, et mes amis, William et Ève, pour leur soutien moral, surtout lors de périodes plus difficiles. Sans ma famille et mes amis, je ne me serais jamais rendue aussi loin. Merci de toujours être là pour moi et de me montrer à quel point vous êtes fiers de moi.



# Chapitre 1 – Le système immunitaire

Le système immunitaire offre une protection contre les organismes et les substances étrangères qui peuvent se retrouver dans les tissus et fluides corporels (1). La réponse immunitaire est composée de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Ces deux systèmes travaillent ensemble et assurent différentes fonctions dans le but d'éliminer une infection ou des cellules étrangères. En effet, des signaux produits suite à l'activation de la réponse immunitaire innée permettent à la réponse immunitaire adaptative d'entrer en action (1).

## Immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les pathogènes (1). Les mécanismes de ce système sont non spécifiques et agissent rapidement permettant ainsi d'empêcher la propagation de la plupart des agents infectieux (1). L'immunité innée fournit une protection contre les pathogènes à l'aide des barrières physiques comme la peau et les muqueuses ainsi que grâce aux cellules du système immunitaire et de protéines (2). À la suite du franchissement des barrières physiques par les pathogènes, les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) exprimés par ceux-ci sont reconnus par des récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR) présents à la surface ou bien dans le cytoplasme des leucocytes phagocytaires, dont les monocytes, les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques (1). Cela déclenche la phagocytose, un mécanisme permettant l'élimination des pathogènes (1). Plus précisément, la phagocytose est un mécanisme permettant l'internalisation de microorganismes, de particules étrangères et/ou de débris cellulaires dans des phagosomes (1). Les phagosomes fusionnent ensuite avec les lysosomes, qui eux contiennent des agents permettant la dégradation du contenu de ceux-ci, tuant ainsi les pathogènes (1). De plus, les PRRs reconnaissent aussi des motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMP) qui sont des signaux de stress sécrétés par les cellules mourantes (1). Le lien entre les PRRs et les PAMPs et DAMPS induit l'expression de gènes codant pour des cytokines et médiateurs pro-inflammatoires (1). Parmi plusieurs classes de PRRs, il y a les récepteurs de type NOD (NLRs), Toll (TLRs), RIG-I (RLRs) et les lectines de type C (CLRs) (1). Les NLRs reconnaissent des débris de la paroi cellulaire des pathogènes à l'intérieur du cytosol et

induisent la formation d'inflammasomes (1). Ces inflammasomes activent la Caspase-1 qui elle active des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 et IL-18 qui seront sécrétées par les cellules immunitaires (1). Les TLRs constituent une famille de récepteurs composés de 10 membres chez l'humain (TLR1-TLR10) présents à la surface des leucocytes, des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules épithéliales ainsi qu'au niveau intracellulaire (endosomes et lysosomes) (1). Chaque TLR reconnaît un répertoire spécifique de PAMPs (1). Les voies de signalisation des TLR aboutissent à l'activation de NF- $\kappa$ B qui induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines par les macrophages et les cellules dendritiques (1). Les CLR reconnaissent des polysaccharides à la surface des pathogènes alors que les RLR reconnaissent l'ARN double-brin au niveau du cytosol (1). Leurs voies de signalisation aboutissent à l'activation de facteurs de transcription dont NF- $\kappa$ B (1). En bref, les voies de signalisation des PRRs activent des gènes qui codent pour des cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines qui contribuent à la réponse inflammatoire (1).

### **Réponse inflammatoire**

La réponse inflammatoire est caractérisée macroscopiquement par la chaleur, la douleur, la rougeur et l'œdème (1). Elle permet surtout de recruter des leucocytes au site d'infection (1). En effet, les leucocytes qui résident dans les tissus comme les macrophages et les cellules dendritiques sont activés lorsqu'ils reconnaissent des PAMPs et des DAMPs à l'aide des récepteurs PRRs. Suite à leur activation, ces cellules vont exprimer des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des prostaglandines et de l'histamine (1). Ces composants de l'immunité innée augmentent la perméabilité vasculaire et l'expression des molécules d'adhésion (CAM) en agissant sur les cellules endothéliales vasculaires des vaisseaux sanguins (1). Ainsi, les leucocytes en circulation attirés par le tissu enflammé, adhèrent, via les CAM, aux cellules endothéliales vasculaires et sont ainsi en mesure de se rendre dans le tissu infecté en traversant la paroi des capillaires par extravasation (1). La réponse inflammatoire permet de recruter entre autres des neutrophiles ainsi que des macrophages au site d'infection dans le but d'éliminer les agents infectieux (1). La réponse inflammatoire, caractérisée comme étant aigüe lorsqu'elle est de courte durée, contribue à la clairance des pathogènes et se termine par une phase de résolution (1). Cependant, l'inflammation peut devenir chronique lorsqu'elle est de longue durée

et qu'il n'y a pas de phase de résolution (1). Dans les deux cas, ces réponses inflammatoires sont médiées par des cytokines (1).

## **Cytokines**

Les cytokines sont des molécules de communication qui interagissent avec leur récepteur à la surface d'une cellule (1). Les cytokines qui permettent la communication entre les leucocytes sont appelées interleukines (IL) alors que les cytokines spécialisées dans le déplacement des cellules immunitaires d'un endroit à un autre en les attirant sont appelées les chimiokines (1). Dépendant de la cytokine, l'interaction de celle-ci avec son récepteur peut induire un changement dans l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines à la surface d'une cellule cible (1). Cette interaction peut aussi induire un changement dans le programme transcriptionnel d'une cellule cible (1). Les cytokines sont aussi importantes pour la survie, la différenciation et la prolifération des cellules cibles (1). Les cytokines détiennent plusieurs modes d'action soit la synergie lorsque les effets de deux cytokines travaillant ensemble sont plus grands que lorsqu'elles agissent seules, l'antagonisme lorsqu'une cytokine inhibe une autre et l'induction de cascades lorsque l'effet de la cytokine sur une cellule cible est d'induire la production d'autres cytokines par celle-ci (1). Il existe six familles de cytokines (1). Tout d'abord, la famille de l'interleukine 1 (IL-1) est composée des membres suivants : IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18 et IL-33 (1). Ces cytokines jouent un grand rôle dans la médiation de l'inflammation (1). Il y a ensuite la famille des hématopoïétines qui comprennent l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-7, l'IL-12, l'IL-13, l'IL-15, l'IL-21 et l'IL-23 qui ont diverses fonctions (1). Par exemple, l'IL-6 induit la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes et la sécrétion d'anticorps alors que l'IL-4 et l'IL-12 favorisent la différenciation des lymphocytes Th2 et Th1 respectivement (1). Particulièrement, l'IL-2 induit la prolifération des lymphocytes T et B (1). Il y a la famille des interférons (IFN) comme l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$ , l'IFN- $\gamma$ , l'IL-10, l'IL-19, l'IL-20, l'IL-22 et l'IL-24 qui jouent un grand rôle dans les réponses antivirales (1). Particulièrement, l'IL-10 est une cytokine exprimée par les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules T et B qui régule les réponses immunitaires (1). Il y a la famille des facteurs de nécrose des tumeurs (TNF) comme le TNF- $\alpha$  et TNF- $\beta$  qui augmentent les réactions inflammatoires (1). Il y a aussi la famille de l'interleukine-17 (IL-17) qui est impliquée dans l'activation des neutrophiles (1). Finalement, il y a la famille des chimiokines dont l'IL-8 qui a des

fonctions chimioattractantes (1). Particulièrement, malgré qu'elle ne soit pas considérée comme membre de la famille des chimiokines, l'IL-16 agit comme un chimioattractant pour les cellules T CD4 et les monocytes (3). Il existe deux types de cytokines. Il y a les cytokines pro-inflammatoires qui contribuent à la réponse inflammatoire (1). Il y a aussi les cytokines anti-inflammatoires qui vont plutôt réguler les réponses pro-inflammatoires (4). Cependant, il est important de noter que certaines cytokines peuvent autant avoir des effets pro-inflammatoires qu'anti-inflammatoire (4).

## **Macrophages**

La lignée myéloïde est à l'origine du développement des globules rouges, des granulocytes (éosinophiles, basophiles et neutrophiles) et des monocytes (1). Les monocytes qui migrent vers les tissus se différencient en macrophages (5). Les macrophages sont des cellules importantes dans la défense contre les pathogènes et dans l'élimination de cellules mourantes (5). Cependant, ils ont aussi d'autres fonctions importantes dont la réparation tissulaire (5). De plus, les macrophages ont souvent des fonctions particulières dans le tissu où ils résident (1). Dans un tissu infecté, les macrophages ont une importante activité phagocytaire qui permet l'élimination des agents infectieux et des débris cellulaires (5). Les macrophages peuvent aussi présenter aux cellules du système immunitaire adaptatif les antigènes étrangers capturés sous forme de peptides via le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (5). Les macrophages recrutent et activent aussi d'autres cellules immunitaires au site d'infection en libérant des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines suite à la rencontre des agents infectieux (5). Particulièrement, suite à la liaison des TLRs des macrophages aux PAMPs, il y a activation des voies de signalisation des TLR et l'activation de NF- $\kappa$ B (1). NF- $\kappa$ B induit l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) qui permet la production de NO- par les macrophages contribuant ainsi à la réponse inflammatoire et à la clairance des pathogènes (5). NF- $\kappa$ B induit aussi l'expression de cytokines chimioattractantes et pro-inflammatoires par les macrophages comme TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$  et l'expression de molécules d'adhésion (5). Les macrophages décrits précédemment sont les macrophages de type M1 ayant des fonctions associées à une meilleure activité phagocytaire, une présentation antigénique améliorée ainsi que d'une libération importante de cytokines pro-inflammatoires (5). Cependant, il existe aussi des macrophages de type M2 ayant des fonctions associées au remodelage et à la réparation tissulaire suite à

l'infection (5). La polarisation des macrophages vers les types M1 ou M2 est médiée par des cytokines (5). La polarisation des macrophages vers le type M1 est principalement médié par l'IFN- $\gamma$  alors que la polarisation des macrophages vers le type M2 est médié par les cytokines IL-4 et IL-13 (5).

### **Cellules Natural Killer**

Les cellules Natural Killer (NK) sont une population de lymphocytes qui dérivent de la lignée lymphoïde (1). Les cellules NK s'activent et répondent rapidement aux composantes associées aux pathogènes, aux lésions, au stress et au cancer exprimées par les cellules environnantes (1). Suite à leur activation, ces cellules libèrent le contenu de leurs granules cytotoxiques, composées de protéines effectrices telles que la perforine et les granzymes, vers les cellules tumorales, infectées et stressées (1). Les cellules NK peuvent aussi induire l'apoptose via les interactions entre Fas et FasL (1). De plus, les cellules NK expriment plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- $\alpha$ , l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  et l'IFN- $\gamma$  (1). Les récepteurs des cellules NK sont composés d'un ensemble de récepteurs activateurs et inhibiteurs (1). Les récepteurs inhibiteurs se lient au complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et empêchent la cellule NK de tuer la cellule cible (1). Les récepteurs activateurs déclenchent la sécrétion des granules cytotoxiques vers une cellule cible lorsqu'un récepteur inhibiteur est libre (1). Les cellules NK tuent donc les cellules qui n'expriment pas des niveaux normaux du CMH I et qui n'expriment plus de composantes du soi (1). Les récepteurs inhibiteurs sont membres de la famille des KIR qui inhibent l'activité cytolytique de la cellule NK lors de la liaison au CMH I (1). Chaque récepteur KIR exprimé à la surface des cellules NK est spécifique à une molécule du CMH (1). Les récepteurs activateurs sont pour la plupart des récepteurs de type C-lectine et permettent de concentrer l'activité cytolytique de la cellule NK vers une cellule cible (1).

### **Cellules dendritiques**

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui dérivent autant de la lignée myéloïde que de la lignée lymphoïde (1). Les cellules dendritiques se retrouvent à l'extérieur des ganglions lymphatiques et leur rôle est de capturer les antigènes environnants à titre de sentinelle (1). La capture d'antigènes par les cellules dendritiques se fait soit par

pinocytose ou par phagocytose (6). Tout comme les macrophages, les cellules dendritiques peuvent reconnaître des antigènes à l'aide de leurs récepteurs de surface et endocyter les pathogènes. Les cellules dendritiques effectuent cela à l'aide des récepteurs Fcγ et CLR (7). Cependant, contrairement aux macrophages qui digèrent rapidement les antigènes après la phagocytose, les cellules dendritiques digèrent les antigènes en peptides et préservent ceux-ci (6). Que ça soit en présence de pathogènes ou non, ces cellules migrent ensuite via les vaisseaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques où elles présenteront les antigènes capturés aux cellules T naïves (6). Les antigènes exogènes capturés par les cellules dendritiques sont présentés par le CMH II aux lymphocytes T CD4+ (6). Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent que des antigènes endogènes présentés par le CMH I exprimé par toute cellule nucléée (7). En revanche, les cellules T CD8+ ne peuvent être activées que par les CPA grâce aux signaux de costimulation (8). Les cellules dendritiques peuvent donc présenter des antigènes exogènes par le CMH I aux lymphocytes T CD8+ via la présentation croisée (6). Ainsi, les cellules dendritiques sont en mesure de présenter des antigènes capturés via leur CMH I et CMH II aux lymphocytes T CD8+ et T CD4+ respectivement qui entrent dans le ganglion. Les peptides présentés par le CMH I et CMH II se lient aux récepteurs des lymphocytes T (TCR). Lorsqu'un TCR interagit avec le peptide présenté sur le CMH auquel il est spécifique, une interaction entre la cellule dendritique et le lymphocyte naïf est possible (6). Cette interaction entre le TCR et le complexe CMH-peptide accentuée par la liaison des corécepteurs CD4 et CD8 au CMH II et CMH I respectivement est le premier signal d'activation des lymphocytes T (6). Le deuxième signal d'activation des lymphocytes T est l'interaction entre la molécule de costimulation CD28 exprimé par les lymphocytes T et ses ligands soit CD80/86 exprimé par les CPA (1). Ces deux signaux induisent ensuite la production de cytokines par les CPA (sécrétion paracrine) et par les lymphocytes T (sécrétion autocrine) (1). Le troisième signal d'activation des lymphocytes T est donc médié par des cytokines. L'interaction entre les cellules T et les CPA médiée par trois signaux est ce qui caractérise le début de l'immunité adaptative (1). Les cellules dendritiques sont donc les acteurs principaux du lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (1).

## **Immunité adaptative**

L'immunité adaptative est déclenchée lorsque le TCR d'un lymphocyte T naïf interagit avec le complexe peptide-CMH d'une CPA pour lequel il est spécifique (1). Comme mentionné précédemment, le TCR des lymphocytes T CD8 naïfs reconnaît le complexe CMH-I-peptide alors que le TCR des lymphocytes T CD4 naïfs reconnaît le complexe CMH-II-peptide (1). Lorsque la liaison d'un TCR d'un lymphocyte T a une forte affinité et une bonne spécificité pour son complexe CMH-peptide, cela déclenche la prolifération et la différenciation des lymphocytes T en cellules effectrices (1). Les lymphocytes T CD8 naïfs activés deviennent des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) alors que les lymphocytes T CD4 naïfs activés deviennent des lymphocytes T CD4 auxiliaires (1). Les cellules T CD8 cytotoxiques se déplacent vers le tissu infecté afin de tuer les cellules infectées alors que les lymphocytes T CD4 auxiliaires via la sécrétion de cytokines médient la réponse mémoire et la réponse humorale des lymphocytes B (1). Elles induisent aussi l'augmentation de l'activité des macrophages et des lymphocytes T CD8 cytotoxiques au site de l'infection (1). Ainsi, tous ensemble, les lymphocytes T et B médient l'immunité adaptative. Précisément, les lymphocytes T médient l'immunité cellulaire et les lymphocytes B médient l'immunité humorale.

### **Immunité cellulaire**

L'immunité cellulaire de l'immunité adaptative est médiée par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés. Les lymphocytes T CD8 activés acquièrent des fonctions cytotoxiques dans le but d'éliminer les cellules infectées. Ces cellules effectuent cela en reconnaissant le peptide étranger, qui a abouti à leur activation, présent sur le CMH I exprimé par toute cellule nucléée infectée (1). Les lymphocytes T CD4 activés deviennent des cellules auxiliaires qui sécrètent une panoplie de cytokines dans le but d'augmenter les capacités phagocytaires et cytotoxiques des macrophages et des lymphocytes T CD8 cytotoxiques respectivement (1). L'immunité cellulaire de l'immunité adaptative est aussi médiée par les cellules NKT (1).

### **Lymphocytes T CD8 cytotoxiques**

L'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques est caractérisée par l'expression du récepteur de l'IL-2 et la sécrétion d'IL-2 qui est important pour la prolifération et la différenciation de ces

cellules (1). Ces cellules peuvent tuer des cellules infectées via les deux mécanismes suivants : cytolysse dépendante de la granzyme et de la perforine et la cytotoxicité effectuée par Fas (1). Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques peuvent tout d'abord tuer des cellules via des molécules pro-apoptotiques comme la perforine et les granzymes qui sont contenues dans des granules intracellulaires (1). Lorsque qu'un lymphocyte T CD8 cytotoxique reconnaît le peptide pour lequel il est spécifique couplé au CMH I présent sur une cellule infectée, des vésicules vont fusionner avec la membrane plasmique et libérer, à la jonction entre les deux cellules, des perforines et des granzymes (1). Les perforines permettent tout d'abord la formation de pores sur la membrane de la cellule infectée (1). De cette manière, les granzymes sont en mesure de rentrer dans le cytoplasme de la cellule infectée et induisent la fragmentation de l'ADN, caractéristique de l'apoptose qui induit la mort cellulaire (1). La cytotoxicité peut aussi être effectuée par la liaison entre Fas, présente sur les cellules cibles, et le ligand de Fas (FasL) présent à la surface des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (1). Cette liaison induit l'apoptose de la cellule infectée (1). Bref, que la mort cellulaire soit effectuée par les perforines et granzymes ou par Fas, les deux mécanismes de cytotoxicité des lymphocytes T CD8 cytotoxiques induisent l'activation de voies de signalisation qui permettent la mort d'une cellule infectée via l'apoptose (1).

### **Lymphocytes T CD4 auxiliaires**

Il existe deux principales sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires soit Th1 et Th2 sécrétant chacune une liste de cytokines qui leur est propre (1). Les lymphocytes T CD4 Th1 sécrètent l'IL-2, qui, tel que mentionné précédemment est importante dans la prolifération et la différenciation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, l'IFN- $\gamma$  et le TNF- $\beta$  (1). Ce profil cytokinique permet à cette sous-population de médier l'activité phagocytaire des macrophages et les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (1). Les lymphocytes T CD4 Th2 sécrètent plutôt l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-9, l'IL-10 et l'IL-13 et régulent le développement des lymphocytes B (1). Ce qui oriente le développement d'un lymphocyte T CD4 vers une sous-population ou bien une autre est le troisième signal d'activation d'un lymphocyte naïf suite à son interaction avec une CPA qui est fourni par des cytokines (1). Si ces cytokines, nommées cytokines polarisantes, sont l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , les lymphocytes T CD4 activés se différencient en lymphocytes T CD4 Th1 alors que si ce sont l'IL-4 et l'IL-6, les lymphocytes T CD4 activés se différencient en

lymphocytes T CD4 Th2 (1). Ces cytokines polarisantes induisent l'activation de gènes qui donnent lieu à l'expression d'un profil de cytokines propre à la sous-population effectrice (1). Pour ce qui est de la différenciation des cellules Th1, des cytokines polarisantes, dont l'IL-12 et l'IL-18, sont produites par les cellules dendritiques ayant reconnu des agents infectieux via leur PRRs (1). Cela déclenche donc des voies de signalisation induisant l'expression de T-Bet chez les cellules Th1. Celui-ci est un facteur de transcription permettant l'expression des cytokines propres aux Th1 (1). Ainsi, les cellules Th1 sont impliquées dans la protection de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires grâce à la sécrétion de leurs cytokines effectrices (1). Pour ce qui est de la différenciation des cellules Th2, une cytokine polarisante soit l'IL-4 déclenche les voies de signalisation induisant l'expression de GATA-3 qui est un facteur de transcription permettant de réguler l'expression des cytokines que les cellules Th2 sécrètent (1). Ainsi, les cellules Th2 sont impliquées dans la protection de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires grâce à la sécrétion de leurs cytokines effectrices qui favorisent l'activation des lymphocytes B et la commutation de classe des anticorps (1). D'autres sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires existent aussi comme les lymphocytes T régulateurs (T<sub>REG</sub>) qui sont caractérisés par l'expression de CD4, CD25 et FoxP3 (9). En présence de TGF- $\beta$ , il y a induction de l'expression de FoxP3 au sein de certaines cellules T naïves activées dans les organes lymphoïdes secondaires (1). FoxP3 est un facteur de transcription clé des T<sub>REG</sub> (1). Cela induit l'expression d'IL-10 et de TGF- $\beta$  par ces cellules leur permettant ainsi d'appliquer leurs fonctions suppressives soit de diminuer l'inflammation, d'inhiber les réponses effectrices et d'inhiber l'activation et l'expansion des cellules Th1 et Th2, des lymphocytes T CD8 cytotoxiques et des lymphocytes B (1-9). Ces cellules permettent aussi de limiter la réponse des lymphocytes T auto-immuns (1). En effet, elles permettent de maintenir la tolérance en luttant contre l'auto-immunité (1). Il est connu qu'une déplétion des T<sub>REG</sub> conduit à des maladies auto-immunes et inflammatoires (9). Il existe aussi les lymphocytes T CD4 Th17 qui sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription ROR- $\gamma$ t (1). Ces cellules contribuent à l'immunité à médiation cellulaire en protégeant contre les infections causées par des pathogènes extracellulaires et en contribuant à l'inflammation grâce à la sécrétion de cytokines comme IL-17A, IL-17F et IL-22 (1). Il y a aussi les cellules T auxiliaires folliculaires (T<sub>FH</sub>) qui vont réguler l'immunité à médiation humorale (1). Plus spécifiquement, ces cellules sont retrouvées

dans les follicules et les centres germinatifs où elles aident les lymphocytes B (1). Elles sont caractérisées par le facteur de transcription Bcl-6 (1). Ces cellules expriment l'IL-21, ce qui cause la différenciation des lymphocytes B (1). Finalement, il y a les cellules Tr1 qui suppriment les réponses immunitaires en sécrétant l'IL-10 (1), les cellules Th3 qui sécrètent du TGF- $\beta$  pour inhiber le développement des cellules Th1 et Th2 (10) et les cellules Th9 qui sécrètent l'IL-9 et confèrent une immunité contre les vers parasites (11).

### **Cellules NKT**

Les cellules NKT sont des cellules NK qui expriment à leur surface des TCR (1). Contrairement au TCR des lymphocytes T, le TCR des cellules NKT ne reconnaît pas de peptides associés au CMH (1). Il reconnaît plutôt des glycolipides présentés par la molécule CD1d exprimé par les CPA (1). Il y a des cellules NKT de type auxiliaire et de type cytotoxique (1). Les cellules NKT détiennent plusieurs fonctions (12). Entre autres, elles expriment des cytokines de type Th1 et de type Th2 ainsi que des chimiokines (12). De plus, elles favorisent l'activation des cellules NK, des macrophages, des neutrophiles et des cellules T et B (12). Elles jouent aussi un rôle dans la différenciation des cellules T CD4 naïves en cellules effectrices (12).

### **Immunité humorale**

L'immunité à médiation humorale de l'immunité adaptative est médiée par les lymphocytes B. Ces cellules sont en mesure de sécréter des anticorps qui pourront se lier de manière spécifique à un agent infectieux (1). Chaque lymphocyte B détient un récepteur de type immunoglobuline (Ig) membranaire soit le récepteur de cellules B (BCR) qui est spécifique à un antigène (1). Les cellules B sont en mesure d'effectuer deux types de réponses. La première est la réponse humorale thymo-dépendante (TD) qui demande la participation d'une cellule T auxiliaire CD4 qui activera la cellule B (1). Cette réponse aboutit éventuellement à la différenciation des cellules B en plasmocytes soit des cellules sécrétrices d'anticorps de haute affinité permettant l'élimination des pathogènes (1). Les cellules B sont aussi en mesure d'effectuer une autre réponse humorale soit la réponse thymo-indépendante (TI) qui s'effectue à l'aide des antigènes TI qui peuvent se lier au PRRs et au BCR des cellules B (1). Ainsi, la cellule B n'a pas nécessairement besoin d'une cellule T auxiliaire pour être activée (1).

## **Lymphocytes B**

Les lymphocytes B capturent des antigènes dans les régions folliculaires de la rate ou des ganglions lymphatiques (1). Si une cellule B rencontre l'antigène pour lequel son BCR est spécifique, elle présentera celui-ci sous forme de peptide via son CMH II (1). Cette interaction entre l'agent infectieux et le BCR induit l'expression de récepteurs de chimiokines chez celle-ci, lui permettant donc ainsi de se rendre dans les zones cellulaires T des ganglions où elles rentreront en contact avec une cellule T auxiliaire spécifique pour le même antigène (1). En effet, les cellules T auxiliaires CD4 activées présentant le même antigène peuvent ainsi se lier au complexe CMH-peptide des cellules B grâce à l'interaction entre CD40L sur la cellule T et CD40 sur la cellule B et le co-récepteur CD28 sur la cellule T et CD80/86 sur la cellule B (1). Par la suite, via la sécrétion de cytokines polarisantes comme IL-2 et IL-4, les cellules T auxiliaires CD4 induisent l'activation et la prolifération des cellules B (1). Une partie des cellules B vont former des foyers primaires de plasmocytes qui sécrètent de grandes quantités d'anticorps IgM soit la première vague d'anticorps (1). Une autre partie des cellules B se rendent dans les follicules primaires des ganglions lymphatiques ou de la rate pour former un centre germinatif (CG) où il y a hypermutation somatique soit le réarrangement des régions variables des gènes d'Ig codant le site de liaison à l'antigène et recombinaison de commutation de classes soit le changement de classe des anticorps produit par les cellules B (1). La commutation isotypique consiste en la substitution de la région constante du gène de la chaîne lourde d'un anticorps par celle d'un autre sans que les régions variables mutées soient modifiées (1). La commutation isotypique s'effectue entre deux régions S (switch) situées en amont de chaque gène de région constante de chaîne lourde des immunoglobines (1). L'hypermutation somatique et la commutation isotypique permettent aux cellules B d'avoir un BCR avec une plus grande affinité pour son antigène ainsi que la production d'anticorps de haute affinité par les plasmocytes (1). Les cellules T<sub>FH</sub> médient la maturation et le développement des cellules B dans les centres germinatifs en fournissant des signaux régulant la diversité des mutations des BCR et la recombinaison de commutation de classes (13).

## **Anticorps**

Les anticorps sont composés de deux chaînes légères et de deux chaînes lourdes (1). Chaque chaîne lourde et légère contient une région variable, différente d'un anticorps à l'autre et site de liaison à l'antigène, et une région constante (1). La région constante des chaînes légères peut être divisée en deux classes soit les chaînes kappa ( $\kappa$ ) ou lambda ( $\lambda$ ) (1). La région constante des chaînes lourdes peut être divisée en cinq classes soit les chaînes mu ( $\mu$ ), delta ( $\delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) et alpha ( $\alpha$ ) (1). Ceux-ci sont nommés des isotopes et déterminent les cinq classes d'immunoglobulines soit IgM, IgD, IgG, IgE et IgA respectivement (1). De plus, il existe aussi des sous-types de chaînes lourdes et donc des sous-classes d'anticorps (1). Cela est le cas pour les IgA (IgA1 et IgA2) et pour les IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) (1). Les cinq classes d'anticorps ont différentes fonctions et sont localisées à différents endroits dans le corps (14). Les IgM sont les premiers anticorps produits par les plasmocytes puisque leur sécrétion ne dépend pas de l'hypermutation somatique et la recombinaison de commutation de classes (14). Les IgM ont une faible affinité pour l'antigène, mais une forte avidité due à leur capacité de former des pentamères (14). Les IgA neutralisent les antigènes principalement dans les muqueuses de l'épithélium intestinal et le tractus respiratoire (14). Les IgG neutralisent et opsonisent les agents infectieux dans le but d'induire la phagocytose en se liant aux récepteurs Fc (1-14). Les IgE sont présentes à la surface des mastocytes et activent les réactions allergiques lorsqu'ils se lient à l'allergène (14).

## **Réponse mémoire**

Après élimination de l'agent infectieux, une réponse mémoire s'établit. La réponse mémoire est plus forte et plus rapide que la première réponse (1). Suite à la clairance de l'infection, la plupart des cellules T effectrices meurent par apoptose et une faible proportion de cette population devient des lymphocytes T mémoires (TM) (1). Il existe trois sous-populations de lymphocytes T mémoires soit les lymphocytes T centraux mémoires (TCM), les lymphocytes T effecteurs mémoires (TEM) et les lymphocytes T résidents mémoires (TRM) (1-15). Les cellules TCM résident dans les tissus lymphoïdes secondaires et peuvent se différencier en plusieurs sous-types de cellules T effectrices après la rencontre avec l'agent infectieux préalablement reconnu (1). Les cellules TEM sont des cellules effectrices qui résident dans différents organes non-lymphoïdes

(peau, foie, poumons, reins), dépendant du site d'infection, à la recherche du pathogène pour lequel elles sont spécifiques (15). Ainsi, celles-ci effectueront rapidement leurs fonctions effectrices dès la reconnaissance de l'agent infectieux préalablement reconnu (1). Les cellules TRM, contrairement aux cellules TEM et TCM, ne peuvent pas recirculer dans le sang (15). Ces cellules résidents dans les tissus périphériques et participent à la défense de première ligne en éliminant les pathogènes préalablement reconnu qui passent à travers les barrières physiques (15). Concernant les cellules B, après l'hypermutation somatique et la recombinaison de commutation de classes, certaines d'entre elles se différencient en plasmocytes de longue durée alors que d'autres deviennent des cellules B mémoires commutées (1). Les cellules B mémoires fournissent une réponse plus rapide et plus efficace lorsqu'elles seront réactivées par l'antigène pour lequel elles sont spécifiques (1). Les plasmocytes de longue durée résident dans les organes et la moelle osseuse et sécrètent constamment des anticorps spécifiques contre les antigènes préalablement rencontrés (1).

## **Tolérance**

La tolérance immunitaire est un processus permettant de prévenir le développement d'une réponse immune envers un antigène. La tolérance envers le soi, elle, permet d'empêcher que les cellules immunitaires et les anticorps spécifiques à des antigènes du soi répondent de manière agressive envers des composantes de l'hôte (1). Sans tolérance du soi, les cellules de l'hôte seraient endommagées par les réponses humorales et/ou effectrices médiées par les lymphocytes B et T menant au développement de maladies auto-immunes (1). La tolérance est établie de deux manières différentes soit via la tolérance centrale et la tolérance périphérique. La tolérance centrale permet d'éliminer les cellules T dans le thymus et les cellules B dans la moelle osseuse qui reconnaissent des antigènes du soi via le CMH avec une grande affinité (1). Cependant, des lymphocytes autoréactifs sont tout de même en mesure de se retrouver en périphérie et dans les tissus lymphoïdes secondaires (1). Il y a donc la tolérance périphérique qui permet d'inactiver les lymphocytes autoréactifs et d'inhiber les réponses immunitaires contre les antigènes du soi (1).

## Tolérance centrale

La tolérance centrale des lymphocytes T s'effectue dans le thymus en deux étapes soit la sélection positive et la sélection négative. Lors de la sélection positive dans le cortex du thymus, les thymocytes doubles positifs (DP), exprimant les co-récepteurs CD4 et CD8, qui expriment un TCR qui ne se lie pas au complexe auto-peptide-CMH exprimé par les cellules épithéliales du cortex thymique (cTEC) meurent par apoptose. Les thymocytes DP qui ont une faible affinité pour le complexe auto-peptide-CMH se différencient en thymocytes simples positifs (SP) qui expriment soit le co-récepteur CD4 ou CD8 (16). Lors de la sélection négative dans la médulla du thymus, des antigènes tissus spécifiques (TSAs) sont présentés par les cellules épithéliales de la médulla thymique (mTECs) et les cellules dendritiques aux thymocytes SP (16). Les mTECs expriment le gène AIRE qui permet l'expression de TSAs (16). Ainsi, les thymocytes SP qui ont une haute affinité pour le complexe auto-peptide-CMH exprimé par les mTECs meurent par apoptose (16). L'élimination des lymphocytes T autoréactifs peut se faire de différentes manières dans le thymus (16). Lors de la sélection positive, l'élimination des thymocytes se fait par négligence (16). En effet, les thymocytes ayant un TCR qui ne reconnaît pas le complexe auto-peptide-CMH ne reçoivent pas le signal du TCR (16). Ainsi, il y a induction de la voie de mort par négligence (16). Lors de la sélection négative, l'élimination des thymocytes se fait par délétion clonale (16). La tolérance centrale des lymphocytes B s'effectue dans la moelle osseuse (17). Les cellules B, qui expriment un BCR mature sous forme d'IgM, peuvent soit subir une sélection positive et arrêter le réarrangement des régions variables des gènes d'Ig ou subir une sélection négative si elle réagit contre un antigène du soi (17). Cependant, une partie de ces cellules n'ont pas un signal assez fort pour subir la sélection positive (17). Ces cellules sont donc vouées à continuer le réarrangement des régions variables des gènes d'Ig (17). Malgré la présence de tous ces mécanismes, certains lymphocytes peuvent échapper à la mort cellulaire. Il y a donc génération de cellules T régulatrices naturelles (nT<sub>REG</sub>) au sein du thymus afin de pouvoir, en périphérie, supprimer les réponses auto-immunes des lymphocytes autoréactifs qui se sont échappés. Les cellules nT<sub>REG</sub> proviennent d'une population de thymocytes qui ont une affinité intermédiaire pour les antigènes du soi rencontrés dans le thymus (1). En présence de TGF- $\beta$  et d'IL-2 et/ou via des interactions intercellulaires, ces cellules exprimeront le facteur de transcription FoxP3 et

deviendront des cellules nT<sub>REG</sub> (1-16). 1 à 2% des lymphocytes T CD4 sont des nT<sub>REG</sub> chez l'humain (18). Ces cellules détiennent un large répertoire de reconnaissance d'antigènes du soi et du non-soi et contrôlent les réponses auto-immunes en inhibant les fonctions effectrices en périphérie (18). Ces cellules sont souvent identifiées parmi les lymphocytes T CD4 parce qu'elles expriment des niveaux élevés de CD25 (18). Cependant, sachant que les cellules T récemment activées expriment aussi CD25, CD127 et FoxP3 sont aussi des marqueurs utilisés pour discriminer ces cellules parmi les lymphocytes T CD4 (18). Il est important de noter qu'en plus des nT<sub>REG</sub>, il y a des T<sub>REG</sub> induits en périphérie (iT<sub>REG</sub>) qui ont des fonctions similaires à celles des nT<sub>REG</sub> en périphérie (18).

### **Tolérance périphérique**

Malgré la tolérance centrale, il y a tout de même des lymphocytes spécifiques à un antigène du soi en périphérie. En effet, il n'y a pas expression de tous les antigènes du soi lors de la sélection négative et les lymphocytes faiblement autoréactifs échappent au processus d'élimination de la tolérance centrale (1). La tolérance périphérique s'effectue via les trois mécanismes suivants : l'anergie, l'apoptose et les T<sub>REG</sub>. L'anergie est un état d'hyporéactivité à long terme (16). En ce qui concerne les lymphocytes T, lorsqu'une cellule est stimulée par un auto-antigène sans le signal 2 d'activation des lymphocytes T, elle devient anergique (1). Cela est caractérisé par une suppression du signal TCR et de l'expression d'IL-2 (16). La suppression des lymphocytes T s'effectue via le blocage de l'activation de mTOR et les molécules de costimulation comme PD-1 et CTLA-4 (16). En effet, parmi plusieurs molécules de co-stimulation, certaines d'entre elles inhibent au lieu de stimuler les cellules T (1). Par exemple, CTLA-4, exprimé dès que les cellules T sont activées, peut se lier aux molécules CD80/86 avec une plus grande avidité que CD28 et inhiber les fonctions effectrices des cellules T (16). De même pour PD-1, exprimé par les cellules T, lorsqu'il interagit avec ses ligands PD-L1 et PD-L2 (16). En ce qui concerne les lymphocytes B, lorsqu'ils rencontrent l'antigène pour lequel ils sont spécifiques sans l'aide d'un lymphocyte T CD4 auxiliaire, ils deviennent anergiques (1). L'apoptose via les récepteurs Fas et Bim est aussi une manière en périphérie d'éliminer les lymphocytes autoréactifs (16).

Finalement, il y a les T<sub>REG</sub> (nT<sub>REG</sub> et iT<sub>REG</sub>) qui jouent un grand rôle dans l'inhibition de l'auto-immunité (1). Ces cellules suppriment la réponse immunitaire contre les antigènes du soi et les antigènes du non-soi comme les allergènes et les microbes commensaux (1). Ces cellules régulent à la baisse les réponses immunitaires via différents mécanismes (18). Les T<sub>REG</sub> effectuent, tout d'abord, cela en exprimant des cytokines inhibitrices comme l'IL-10 (18). L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive qui, lorsqu'elle se lie à son récepteur, active des voies de signalisation induisant l'expression de gènes impliqués dans l'inhibition et la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de la présentation antigénique (19). En plus, il y a expression de gènes impliqués dans la tolérance (19). Les T<sub>REG</sub> peuvent aussi effectuer leur rôle en éliminant les cellules effectrices via les perforines et les granzymes (18). Finalement, les T<sub>REG</sub> peuvent aussi moduler la fonction immunostimulatrice des cellules dendritiques via un signal inhibiteur grâce au récepteur CTLA-4 (18). Ainsi, les cellules dendritiques sont beaucoup moins en mesure de stimuler les cellules effectrices auto-réactives. Les T<sub>REG</sub> jouent donc un rôle important dans le contrôle de l'autoimmunité (18). En effet, dans plusieurs maladies auto-immunes, il est possible d'observer une fréquence et/ou une fonction suppressive réduite des T<sub>REG</sub> (18).

Il existe aussi en périphérie des sites immunoprivilégiés, c'est-à-dire des sites qui peuvent tolérer l'entrée d'antigènes sans induction d'une réponse inflammatoire (20). Cela permet de protéger des composantes vitales qui pourraient être endommagées par l'inflammation (20). Le cerveau et les yeux sont de bons exemples de sites immunoprivilégiés (20). Plusieurs mécanismes permettent de promouvoir le maintien d'un site immunoprivilégié (20). Par exemple, dans l'œil, il y a production de cytokines immunosuppressives, une diminution de l'expression du CMH et une expression constitutive de FasL (20). Il y aussi induction de tolérance en périphérie dans certains organes comme le rein et le foie.

### **Tolérance du foie**

Le foie est un organe constitué d'hépatocytes, de cholangiocytes, de cellules endothéliales des sinusoides, de cellules de Kupffer, de cellules stellaires hépatiques, de cellules dendritiques et de lymphocytes intrahépatiques (21). Sachant que 75% de l'apport sanguin de cet organe vient de l'intestin et de la rate par la veine porte, il est important qu'il soit en mesure de développer une tolérance orale envers les antigènes intestinaux, mais aussi qu'il soit en mesure de répondre aux

pathogènes (21). Plusieurs mécanismes semblent contribuer à la tolérance du foie (22). Tout d'abord, les cellules dendritiques et les lymphocytes NKT produisent des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (22). De plus, il y a activation intrahépatique de lymphocytes T CD8 naïfs au sein du foie en absence d'inflammation et celle-ci semble altérer leur fonction effectrice et diminue leur survie (22). Cela peut se produire lorsqu'une cellule T CD8 naïve entre en contact, dans la lumière sinusoidale, avec les cellules de Kupffer, les cellules dendritiques, les cellules endothéliales des sinusoides ou les hépatocytes (22). En effet, il est possible pour les hépatocytes d'interagir avec les cellules T CD8 grâce à leurs microvillosités qui peuvent traverser les pores fenestrés entre les cellules endothéliales de la paroi des sinusoides vers la lumière sinusoidale et à la fois via les pseudopodes des lymphocytes qui traversent les pores fenestrés vers l'espace de Disse (22). L'interaction et l'activation des lymphocytes sont aussi favorisées par un faible flux sanguin et un petit diamètre dans les sinusoides (23). En absence d'inflammation, les hépatocytes expriment le CMH I et peuvent donc être de bonnes CPA pour les lymphocytes T CD8 (23). Cependant, l'activation des lymphocytes T par les hépatocytes mène à la tolérance plutôt qu'à une réponse immunitaire (23). En effet, les cellules T activées par les hépatocytes meurent par négligence à cause d'une faible production d'IL-2 et d'expression du récepteur d'IL-2 (24). Les hépatocytes sont donc en mesure d'activer les lymphocytes T CD8 naïfs, mais ne parviennent pas à leur fournir des signaux de survie. Ainsi, les lymphocytes T CD8 ne peuvent pas acquérir leurs fonctions cytotoxiques et cela contribue à la tolérance des lymphocytes T envers les antigènes du foie (23). La mort par négligence des cellules T CD8 autoréactives semble aussi être effectuée par les cellules dendritiques (23). Les cellules de Kupffer jouent un rôle de surveillance dans les sinusoides et éliminent les endotoxines, les antigènes par phagocytose et les complexes immuns tout en sécrétant des cytokines comme IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  (23). Ces cellules contribuent aussi à l'apoptose des cellules T CD8 activées via la voie de signalisation Fas/FasL (21). En effet, il y a aussi élimination de cellules T CD8 activées dans le foie à la suite d'une réponse immunitaire (21). Concernant les lymphocytes T CD4, il n'y a pas encore de données in vivo démontrant clairement qu'il pourrait y avoir activation de ceux-ci dans le foie (22). L'hypothèse actuelle est que les cellules endothéliales des sinusoides, les cellules dendritiques et les cellules de Kupffer, exprimant le CMH II, pourraient activer les cellules T CD4

naïves en absence d'inflammation et influencer leurs réponses (22-23). De plus, *in vitro*, il a été démontré que des hépatocytes présentant des antigènes via le CMH II aux lymphocytes T CD4 ont pu les activer menant à leur prolifération et à la production de cytokines (24). Bref, l'activation des lymphocytes T dans le foie est importante dans l'établissement d'une tolérance périphérique envers les antigènes intrahépatiques pour lesquels certaines cellules T autoréactives naïves et activées, qui ont échappé la sélection négative dans le thymus, sont spécifiques à (23). Cependant, l'activation des lymphocytes T CD8 spécifique à un antigène hépatique n'induit pas toujours une tolérance et cela dépend de facteurs comme la présence ou non d'inflammation, le niveau d'expression de l'antigène et la nature de la CPA (25).

### **Bris de tolérance du soi**

Il est maintenant reconnu que le répertoire normal contient des lymphocytes autoréactifs spécifiques à des antigènes du soi. Lorsqu'un autoantigène est présenté aux lymphocytes T autoréactifs par les CPA, il y a activation de ceux-ci. Le bris de la tolérance du soi est initié ainsi. Plusieurs mécanismes peuvent induire un bris de tolérance envers le soi. Parmi ceux-ci, il y a les lésions dans l'ADN causées par l'exposition à des carcinogènes et/ou à des agents infectieux (1). En effet, ces lésions peuvent affecter des gènes codant pour des molécules de signalisation, des molécules inhibitrices et des régulateurs de l'apoptose ce qui pourrait affecter les mécanismes d'anergie et de régulation en périphérie (1). Le mimétisme moléculaire, soit le fait que certaines structures protéiques de pathogènes ressemblent à un antigène du soi, peut aussi contribuer au bris de la tolérance au soi (1). Ainsi, les anticorps spécifiques à un pathogène peuvent aussi être spécifiques à une composante du soi (1). Finalement, la libération d'antigènes séquestrés peut contribuer au bris de la tolérance au soi (1). En effet, certains antigènes tissulaires non exprimés dans le thymus peuvent se retrouver en circulation à la suite d'une blessure ou d'une infection (1). Ceux-ci peuvent ensuite faire la rencontre d'un lymphocyte T autoréactif (1). Pour la plupart des maladies auto-immunes, une combinaison de ces mécanismes peut être la cause de la maladie (1). Lorsqu'il y a bris de la tolérance, il y a production d'autoanticorps qui reconnaissent les composantes du soi par les cellules B et/ou stimulation des réponses effectrices par les cellules T autoréactives causant la destruction des cellules et/ou une réponse inflammatoire (1). Cela mène au développement de l'auto-immunité.

## **Autoimmunité**

Chaque maladie auto-immune est caractérisée par les antigènes du soi ciblés par les cellules autoréactives (1). Il existe deux sous-types de maladies auto-immunes soit les maladies auto-immunes spécifiques d'organes et les maladies auto-immunes systémiques (1). Plusieurs facteurs peuvent augmenter la susceptibilité d'une personne à une maladie auto-immune. Tout d'abord, il y a le sexe. En effet, les femmes sont plus susceptibles aux maladies auto-immunes que les hommes (1). Cela semble s'expliquer par les hormones sexuelles puisque l'œstrogène semble participer au renforcement de la réponse immunitaire alors que l'androgène semble plutôt participer à la suppression de la réponse immunitaire (1). Ensuite, il y a les facteurs environnementaux comme la diète et les infections (1). De plus, plusieurs gènes jouant un rôle dans la réponse immunitaire augmentent la susceptibilité à l'auto-immunité (1). Particulièrement, certains allèles du CMH sont associés à des maladies auto-immunes (1). Finalement, que ça soit dans les maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organes, certaines sous-populations de lymphocytes T CD4 auxiliaires semblent être liées à la pathogenèse de ces maladies (1). Par exemple, un défaut de nombre et/ou de fonction des lymphocytes T régulateurs peut entraîner le développement de maladies auto-immunes (1). Les symptômes de maladies auto-immunes sont souvent soulagés par les immunosuppresseurs. La plupart d'entre eux permettent de supprimer les réponses inflammatoires et d'inhiber la prolifération des lymphocytes, mais ce ne sont pas des traitements curatifs (1). De plus, ce sont des médicaments qui induisent beaucoup d'effets secondaires chez les patients (1). En effet, les patients sous immunosuppresseurs risquent d'avoir des infections incontrôlées et de développer un cancer puisque l'efficacité du système immunitaire est réduite (1). Il existe donc aussi des traitements immunosuppresseurs qui ciblent un type cellulaire spécifique dans une maladie particulière afin de réduire les effets secondaires des traitements à large spectre (1).

### **Maladies auto-immunes systémiques (non spécifiques d'organes)**

Les maladies auto-immunes systémiques sont caractérisées par une réponse autoréactive envers divers antigènes du soi présents dans différents organes et tissus (1). Les dommages sont donc disséminés (1). Les lésions tissulaires disséminées sont médiées par les réponses cellulaires et/ou

humorales via les auto-anticorps ou le cumul des complexes immuns (1). Le lupus érythémateux disséminé et la polyarthrite rhumatoïde sont de bons exemples de maladies auto-immunes systémiques (1).

### **Maladies auto-immunes spécifiques d'organes**

Les maladies auto-immunes spécifiques d'organes sont caractérisées par l'atteinte pathologique d'un organe cible causant le déclin de sa fonction (1). Elles peuvent être médiées par des autoanticorps bloquant un récepteur spécifique et/ou par une infiltration et activation de CTLs dans l'organe menant à l'inflammation et à la destruction de cellules (1). Par exemple, la myasthénie grave est une maladie auto-immune médiée par des autoanticorps bloquant le récepteur de l'acétylcholine causant l'affaiblissement des muscles alors que le diabète de type I est médié par la destruction des cellules bêta, cellules productrices d'insuline, dans le pancréas par les CTLs menant à la diminution de production d'insuline (1). Dans certaines maladies, les auto-anticorps peuvent aussi provoquer la destruction des cellules exprimant le récepteur pour lequel ils sont spécifiques par une lyse par le complément due aux anticorps ou par cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (1). Cependant, ce n'est pas le cas dans toutes les maladies auto-immunes spécifiques d'organes.

## Chapitre 2 – Hépatite auto-immune

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie auto-immune spécifique au foie. C'est une maladie multifactorielle de pathogenèse inconnue qui survient à la suite d'une perte de tolérance immunologique envers des antigènes du soi présents dans le foie (26). Cette perte de la tolérance conduit éventuellement au recrutement de CTLs dans le foie qui eux provoquent la destruction du tissu hépatique et à l'induction de la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B (27). Il existe deux types d'hépatite auto-immune soit l'HAI de type I et l'HAI de type II et ce qui les distinguent est la présence d'auto-anticorps différents (26). L'HAI de type I est caractérisée par la présence des auto-anticorps anti-nucléaires (ANA) et/ou d'auto-anticorps anti-muscle lisse (SMA) alors que l'HAI de type II caractérisée par la présence des auto-anticorps anti-foie-rein microsome (LKM1) et/ou d'auto-anticorps anti-foie cytosol 1 (LC1) (26).

### Épidémiologie

L'incidence de cette maladie rare est d'environ 1 sur 100 000 habitants par an alors que sa prévalence est d'environ 10 à 20 cas sur 100 000 par an (28). Cette maladie est plus commune chez les femmes que chez les hommes avec un ratio observé de 3,6:1 (28). En revanche, il est toujours possible d'observer des cas d'HAI chez les deux sexes, dans toutes les tranches d'âge ainsi que dans différents groupes ethniques (26). Parmi les deux types d'HAI, 80% des cas sont diagnostiqués comme étant l'HAI de type I (28).

### Susceptibilité

Autant des facteurs génétiques que non génétiques semblent augmenter la susceptibilité d'une personne à l'HAI. Entre autres, le sexe, l'âge et les hormones sexuelles semblent être des facteurs non génétiques importants alors que certains gènes situés au locus de l'antigène leucocytaire humain (HLA) sur le chromosome 6 semblent être un des facteurs génétiques les plus importants (26). En effet, en Amérique du Nord, les allèles HLA-A1-B8, HLA-DRB1\*0301 (HLA-DR3) et HLA-DRB1\*0401 (HLA-DR4) ont été associés à une susceptibilité à l'HAI (26). L'association la plus importante a été trouvée avec les allèles HLA-DR3 et HLA-DR4 (29). Sachant que les antigènes sont présentés aux lymphocytes T CD4 via les molécules du CMH II, ces cellules pourraient donc

jouer un rôle central dans la pathogenèse de cette maladie. D'autres gènes hors du locus HLA ont aussi été associés à l'HAI (26), cependant, les causes et les processus qui permettent le déclenchement ainsi que le développement de l'HAI ne sont toujours pas connus. Il est tout de même supposé que plusieurs facteurs environnementaux pourraient conduire à l'activation et à la prolifération massive de lymphocytes T au repos qui ne sont pas spécifiques à l'infection, dont des cellules T autoréactives qui conduiraient à un bris de la tolérance envers les antigènes hépatiques chez des individus ayant déjà une prédisposition génétique les rendant plus susceptibles à l'HAI (26). Il est aussi suggéré que les infections virales du foie, qui engendrent la destruction des hépatocytes, permettent le relargage de protéines du soi dans un milieu pro-inflammatoire permettant l'activation de lymphocytes T autoréactifs envers des antigènes hépatiques (26). Il est également suggéré que le mimétisme moléculaire pourrait aussi jouer un rôle dans l'activation de lymphocytes T autoréactifs (26). Plusieurs scénarios sont retenus afin d'expliquer le déclenchement d'une réponse auto-immune envers le foie, mais rien n'est confirmé pour l'HAI.

## **Manifestations cliniques**

Les patients souffrant de cette maladie développent généralement des symptômes non spécifiques à l'HAI comme la fatigue et la perte de poids (26-27). Les signes physiques de l'HAI sont souvent liés à une maladie hépatique avancée (27). L'HAI peut aussi être accompagné d'autres pathologies qui touchent le foie (27). Celles-ci sont qualifiées de syndromes de chevauchements (27). Il y a la cholangite biliaire primitive (CBP) qui est une maladie auto-immune caractérisée par l'inflammation et la destruction des canaux biliaires interlobulaires (30) et il y a la cholangite sclérosante primitive (CSP) qui est une maladie caractérisée par une inflammation fibrosante des gros canaux biliaires (31).

## **Histologie**

Les signes histologiques typiques de l'HAI sont les suivants : une hépatite d'interface lymphocytaire, un infiltrat portal et lobulaire riche en plasmocytes, la formation de rosettes et l'emperipolèse de lymphocytes dans les hépatocytes (27). Cependant, ces critères ne sont pas des critères spécifiques à l'HAI. La rémission histologique est caractérisée par l'absence

d'inflammation des tissus hépatiques après traitement (27). L'activité inflammatoire et le stade de la fibrose peuvent être déterminés par les systèmes de classification Metavir et Ishak (Modified HAI) (32).

### **Évaluation histologique**

La méthode de classification Metavir permet de mesurer l'activité inflammatoire sur une échelle de A0 à A3 et la fibrose sur une échelle de F0 à F4 alors que la méthode de classification Ishak (Modified HAI) mesure l'activité inflammatoire sur 18 et la fibrose sur une échelle de 6 (33). Le FibroScan est une méthode non invasive qui permet de mesurer la rigidité du foie. Avec cette méthode, il est possible de diagnostiquer la cirrhose et de distinguer les stades avancés de la fibrose (F3 et F4) des stades moins sévères (F0 à F2) (27).

### **Biochimie**

Chez les patients HAI, les niveaux plasmatiques d'alanine aminotransférase (ALT) et d'aspartate aminotransférase (AST) sont élevés. Ce sont toutes les deux des enzymes surtout présentes dans le foie qui, lorsque les hépatocytes sont endommagés, sont libérées dans le sang. Il y a aussi détection d'auto-anticorps chez les patients HAI. Comme mentionné précédemment, les auto-anticorps caractéristiques de l'HAI de type I sont les auto-anticorps anti-ANA et/ou anti-SMA alors que les auto-anticorps caractéristiques de l'HAI de type II sont les auto-anticorps anti-LKM1 et/ou anti-LC1 (26). Les auto-anticorps anti-LKM1 et anti-LC1 ciblent respectivement le cytochrome P4502D6 et le formiminotransférase cyclodeaminase (26). Ainsi, contrairement à l'HAI de type I, les auto-anticorps de l'HAI de type II ciblent des antigènes spécifiques aux hépatocytes (26). La plupart des patients HAI ont aussi des niveaux élevés d'IgG dans le sérum (27). Cela est causé par les cellules T<sub>FH</sub> qui induisent la conversion des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant des IgG (27). La rémission biochimique est caractérisée par une normalisation des taux plasmatiques d'AST, d'ALT et d'IgG après traitement (27).

### **Diagnostic**

Un patient est diagnostiqué avec l'HAI lorsqu'il y a présence d'un ou de plusieurs auto-anticorps mentionnés précédemment, une biopsie démontrant une signature caractéristique de l'HAI, un

taux élevé d'IgG, d'AST et d'ALT dans le sérum et exclusion des hépatites virales (27). Les critères de diagnostic de l'HAI ont été créés en 1993, puis révisés en 1999, et finalement simplifiés en 2008 (27). La version révisée a une meilleure sensibilité alors que la version simplifiée a une meilleure spécificité (27). Aujourd'hui, la version simplifiée est couramment utilisée pour diagnostiquer les patients HAI typiques (27). La version simplifiée se base sur le calcul d'un score à l'aide de quatre critères soit les auto-anticorps, les IgG, l'absence d'hépatite virale et l'histologie (32). Tout d'abord, un titre d'auto-anticorps ANA ou SMA  $\geq 1:40$  permet l'addition d'un point et un titre d'auto-anticorps ANA ou SMA  $\geq 1:80$  ou un titre d'auto-anticorps LKM  $\geq 1:40$  ou la présence d'auto-anticorps SLA permet l'addition de deux points (32). La somme des deux résultats se limite à un maximum de deux points (34). Par la suite, un niveau sérique d'IgG supérieure à la limite normale permet l'addition d'un point alors qu'un niveau sérique d'IgG 1.10 fois supérieure à la limite normale permet l'addition de deux points (32). Ensuite, l'absence d'hépatite virale permet l'ajout de deux points (32). Finalement, une biopsie du foie est toujours effectuée puisqu'elle est importante pour le diagnostic de l'HAI (32). Les caractéristiques morphologiques de la biopsie sont typiques à l'HAI lorsqu'il y présence d'une hépatite d'interface avec infiltrat lymphocytaire/lymphoplasmocytaire portal et lobulaire, de rosettes et d'emperipolèse (32). Cela permet l'ajout de deux points au score (32). Cependant, s'il est possible d'observer des lésions associées à une hépatite chronique avec infiltrat lymphocytaire, mais qu'il manque les autres caractéristiques morphologiques typiques à l'HAI, cette biopsie sera plutôt classifiée de compatible à l'HAI (32). Cela permet l'ajout d'un seul point (32). Dans le cas où les caractéristiques morphologiques de la biopsie suggèrent un autre diagnostic, aucun point n'est ajouté dans le score (32). Un score  $\geq 6$  indique une HAI probable alors qu'un score  $\geq 7$  indique avec certitude d'une HAI (32).

**Tableau 1.** Critères de diagnostic simplifié de l’HAI

Caractéristique	Valeur seuil	Points
ANA ou SMA	≥ 1:40	1
ANA ou SMA	≥ 1:80	2
ou LKM	≥ 1:40	
ou SLA	+	
IgG	> Limite normale*	1
	> 1.10 fois la limite normale	2
Hépatite virale	-	2
Histologie du foie	Typique à l’HAI	2
	Compatible à l’HAI	1

\*Limite normale des IgG au CHUM : [5,39-13,70] g/L

Adapté de : Covelli *et al.*, 2021 (32).

**Tableau 2.** Caractéristiques morphologiques de la biopsie pour la classification de l’histologie dans les critères de diagnostic simplifié de l’HAI

Classification de l’histologie	Caractéristiques morphologiques
Typique à l’HAI	Hépatite d’interface avec infiltrat lymphocytaire/lymphoplasmocytaire portal et lobulaire Formation de rosettes Emperipolèse
Compatible à l’HAI	Hépatite chronique avec infiltrat lymphocytaire sans les autres caractéristiques morphologiques typiques à l’HAI
Atypique à l’HAI	Caractéristiques morphologiques suggèrent un autre diagnostic

Adapté de : Covelli *et al.*, 2021 (32).

## Traitement

Les traitements de première ligne de l’HAI permettent d’améliorer les symptômes, de prévenir la progression de la maladie et de contrôler l’inflammation hépatique (27). Une réponse favorable au traitement se traduit par la normalisation des niveaux plasmatiques de l’ALT, l’AST et les IgG (27). La prednisone avec l’azathioprine est le traitement de première ligne pour les patients HAI

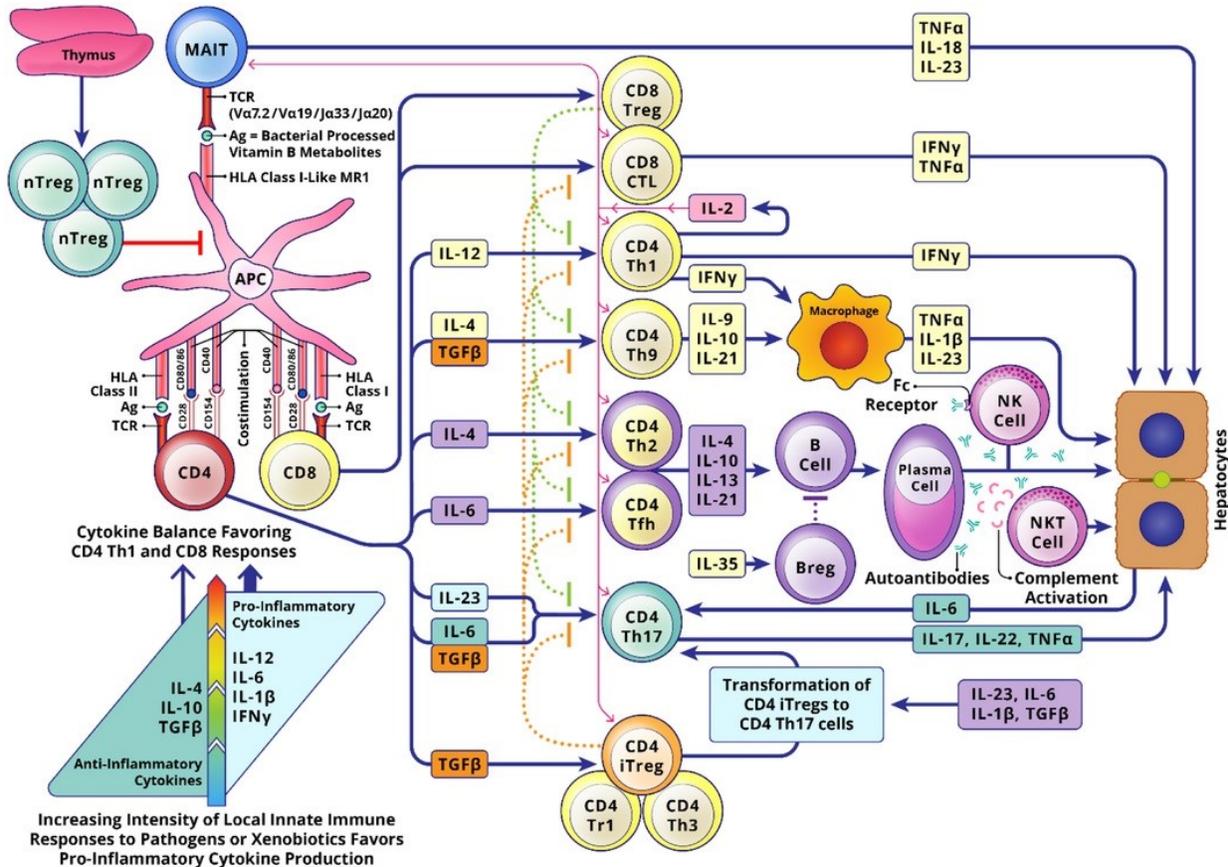
(35). Cette combinaison d'immunosuppresseurs permet de réduire l'inflammation du foie (35). La prednisone est un corticostéroïde qui est converti en prednisolone dans le foie (36). La prednisone inhibe la migration des leucocytes polymorphonucléaires en diminuant l'augmentation de la perméabilité capillaire et entraîne l'altération et l'inhibition de l'expression de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires (36). Elle peut aussi induire la mort des lymphocytes immatures et une diminution du nombre de lymphocytes circulants (36). Ce médicament induit beaucoup d'effets secondaires comme de l'hyperglycémie, l'insomnie, une augmentation de l'appétit et un gain de poids (36). L'azathioprine quant à elle est convertie en mercaptopurine et thioguanine qui sont des métabolites qui s'incorporent dans l'ADN qui se réplique (37). Cela permet donc d'empêcher la prolifération des cellules, dont celles qui sont impliquées dans la réponse auto-immune envers le foie. Plusieurs effets secondaires sont associés à l'azathioprine comme la nausée, la fièvre, la fatigue, l'arthralgie et la myalgie (37). En effet, plusieurs effets secondaires sont associés à la prednisone et l'azathioprine puisque ce sont des immunosuppresseurs non spécifiques (35). Une fois qu'une réponse favorable au traitement est observée, la dose de la prednisone est progressivement diminuée et éventuellement, le patient peut complètement arrêter d'en prendre et prendre uniquement l'azathioprine (27). Cela permet d'avoir moins d'effets secondaires et d'éviter les complications à long terme des glucocorticoïdes (27). L'administration de budésonide avec l'azathioprine figure aussi parmi les traitements de première ligne (27). Il y a toujours des traitements de deuxième ligne pour les patients qui ne répondent pas à ce premier traitement. Pour les traitements de deuxième ligne, il y a le mycophenolate mofetil (MMF) et les inhibiteurs de calcineurine (cyclosporine et tacrolimus) (27). Si les traitements de première et deuxième ligne s'avèrent inefficaces, de nouvelles immunothérapies ciblant des sous-populations de cellules immunitaires ou de cytokines spécifiques pourraient être envisagées comme traitements de troisième ligne (35). Le rituximab, anticorps anti-CD20 induisant la déplétion des cellules B, a été utilisé chez les patients HAI difficiles à traiter et une rémission a été observée (38-39). Ce traitement permettrait d'éliminer les cellules B autoréactives qui pourraient présenter des peptides du soi aux cellules T autoréactives envers les hépatocytes (35). Il y a aussi l'infliximab, anticorps neutralisant le TNF- $\alpha$ , qui a été utilisé pour la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis, la colite ulcéreuse et la maladie de

Crohn avec succès (40). Cependant, ce traitement a rarement été utilisé chez les patients HAI puisque le rôle du TNF- $\alpha$  dans la pathogenèse de l'HAI n'a pas été identifié (35). De plus, sachant que l'HAI est une maladie médiée par les lymphocytes T, les anticorps anti-CD3 permettraient d'éliminer les lymphocytes T CD4 et CD8 autoréactifs causant des dommages au foie chez les patients HAI (35). Dans un modèle murin d'HAI de type II, la déplétion des lymphocytes T à l'aide des anticorps anti-CD3 a induit une normalisation des niveaux plasmatiques des ALT, une réduction des titres d'auto-anticorps et la disparition des infiltrats inflammatoire dans le foie (41). Finalement, sachant que les T<sub>REG</sub> sont importantes dans la tolérance du soi, la perfusion de T<sub>REG</sub> autologues après une expansion *ex vivo* ou l'administration d'IL-2 à faible dose pour la multiplication des T<sub>REG</sub> pourrait être envisagée pour les patients HAI (35). Ces thérapies permettraient d'augmenter la fréquence de T<sub>REG</sub>. Cependant, toutes ces nouvelles immunothérapies ont été effectuées sur une base expérimentale et sur un nombre limité de patients (35). Il est difficile de développer de telles thérapies à grande échelle sachant que les sous-populations de cellules immunitaires et médiateurs impliqués dans la pathogenèse de l'HAI n'ont pas encore été identifiés (35). D'autres études seraient nécessaires pour tester l'efficacité de ces thérapies spécifiques chez les patients HAI (35).

## Pathogenèse

Hypothétiquement, dans le contexte de l'hépatite immune, le milieu cytokinique du foie provoque la prolifération et la maturation de plusieurs sous-types de lymphocytes T CD4 auxiliaires spécifiques à un auto-antigène du foie soit Th1, Th2, Th3, Th9 Th17, T<sub>REG</sub> et T<sub>FH</sub> (27). Il est suggéré que les cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD4 Th1 provoquent l'expansion des CTLs spécifiques à un auto-antigène et l'activation des macrophages qui eux contribuent à la destruction du tissu hépatique (27). Il est suggéré que des cytokines sécrétées par les cellules T CD4 Th2 induisent la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B alors que d'autres cytokines exprimées par les lymphocytes T CD4 T<sub>FH</sub> induisent la commutation de classe des anticorps vers les IgG et la maturation des cellules B en plasmocytes (27). Il est suggéré que les cellules T CD4 Th17 amplifient l'inflammation et les lésions au tissu hépatique (27). De plus, une hypothèse fréquemment mise de l'avant est que les T<sub>REG</sub> ne semblent pas être capables de contrôler les réponses auto-immunes que les lymphocytes T CD4 et T CD8 autoréactifs effectuent

contre les hépatocytes (27). En absence de traitements, ces réponses immunitaires conduisent progressivement à une fibrose et éventuellement à une cirrhose (27). L'hépatite auto-immune est donc une maladie complexe puisque plusieurs effecteurs semblent y contribuer.



**Figure 1.-** Immunopathogénèse de l'hépatite auto-immune.

Cette figure représente l'immunopathogénèse suggérée en ce moment de l'hépatite auto-immune. Tout d'abord, il est suggéré que les CPA présentent des autoantigènes hépatiques aux lymphocytes T CD4 et CD8 autoréactifs et les activent. Ensuite, il est suggéré qu'il y a maturation de plusieurs sous-types de lymphocytes T CD4 auxiliaires (Th1, Th3, Th9, Th17, T<sub>REG</sub>, Tr1 et T<sub>FH</sub>) spécifiques à un antigène hépatique. Les cytokines produites par ces différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 induiraient la stimulation d'autres cellules soit les macrophages, les lymphocytes T CD8 et les lymphocytes B. Aussi, il est suggéré que les macrophages et les CTLs provoquent plusieurs lésions du parenchyme hépatique alors que les lymphocytes B, en se liant aux auto-peptides pour lesquels ils sont spécifiques, sécrètent des auto-anticorps. Une hypothèse aussi mise de l'avant est que les T<sub>REG</sub> sont incapables de contrôler les réponses autoréactives envers les antigènes hépatiques. La

destruction des hépatocytes amplifie la réponse inflammatoire au sein du foie menant donc à une cirrhose en absence de traitement.

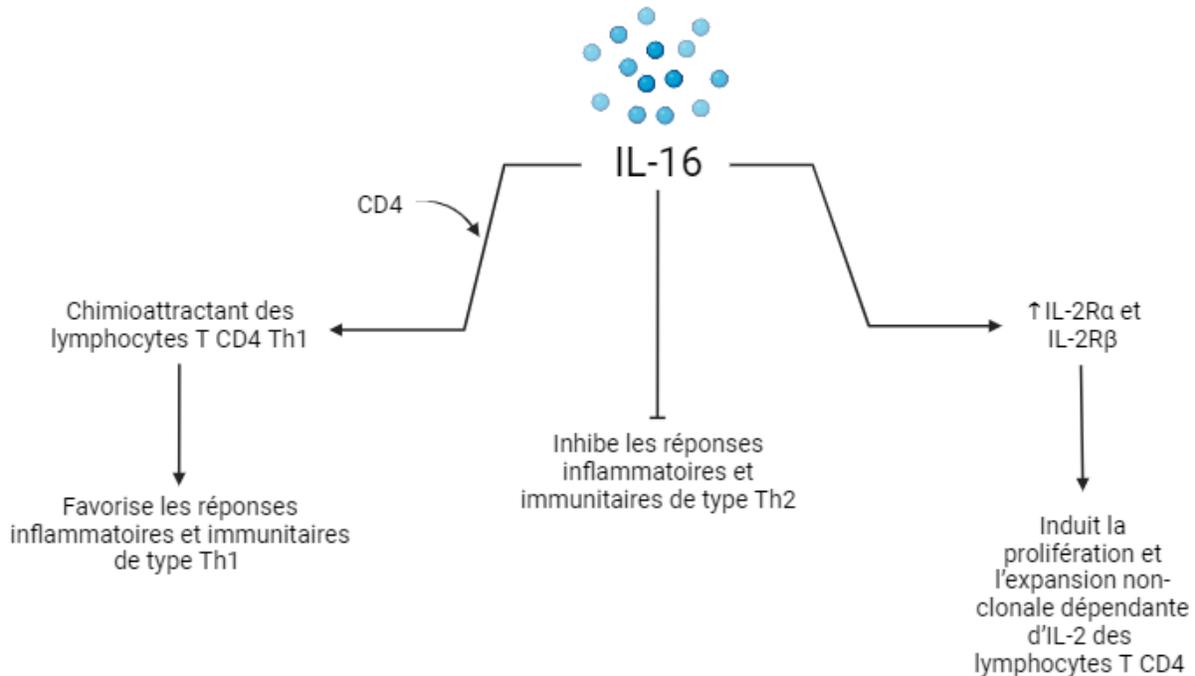
Tiré de : Mack *et al.*, 2020 (27).

### **Lymphocytes T CD4**

Sachant qu'il y a des molécules d'adhésion exprimées dans le foie de manière constitutive (ICAM-1, VCAM-1 et VAP-1), l'hypothèse est que les lymphocytes T autoréactifs, activés en périphérie, qui se rendent dans le foie sont retenus via ces molécules (42). Ainsi, il est suggéré que les cellules T activées, qui sont spécifiques à un complexe autoantigène-CMH, déclenchent le processus inflammatoire (42). Cela induirait donc le recrutement d'autres lymphocytes dans le foie via différentes chimiokines (42). Il a été démontré que, chez les patients HAI, la majorité des lymphocytes T CD4 dans le foie était des Th1 (42). Sachant que, dans des conditions physiologiques normales, le foie peut induire une tolérance aux antigènes hépatiques en induisant la conversion des lymphocytes T CD4 effecteurs en T<sub>REG</sub>, il est possible de suggérer que les T<sub>REG</sub> pourraient aussi être impliquées dans l'HAI (43). En effet, un défaut de nombre ou de fonction des T<sub>REG</sub> causerait un déséquilibre qui permettrait le développement d'une réponse immunitaire excessive envers le foie conduisant à une hépatite auto-immune. Des études suggèrent que chez les patients HAI, il y a une diminution de la fréquence et/ou des déficiences fonctionnelles des T<sub>REG</sub> (43). Bref, une réponse altérée des T<sub>REG</sub> contribuerait à la progression de la maladie et des lésions hépatiques (44). Cependant, il est important de mentionner que d'autres études démontrent que les patients HAI détiennent des niveaux normaux et une fonctionnalité normale des T<sub>REG</sub> (45). En effet, ce serait plutôt le traitement immunosuppresseur qui induirait une diminution de la fréquence des T<sub>REG</sub> chez les patients HAI (45). Ces contradictions pourraient être expliquées par le fait que les lymphocytes T effecteurs activés expriment de manière transitoire les marqueurs CD25 et FoxP3, couramment utilisés pour identifier les T<sub>REG</sub> (35). De plus, les cellules T effectrices des patients HAI semblent être beaucoup moins sensibles au contrôle des T<sub>REG</sub> (44). Les lymphocytes T CD4 semblent donc être des acteurs importants dans l'HAI. Cependant, afin que ces cellules soient recrutées dans le foie, elles doivent dépendre des cytokines, qui, elles, pourraient aussi jouer un rôle dans la maladie.

## Interleukine-16

L'interleukine-16 (IL-16) a été l'une des premières cytokines caractérisées comme ayant une activité chimioattractante envers les lymphocytes T chez l'humain (46). L'IL-16, ligand du récepteur CD4 et cytokine pro-inflammatoire, est aujourd'hui connue comme étant un chimioattractant des lymphocytes T CD4 Th1 producteurs d'IL-2 (47). L'IL-16 est synthétisée par des cellules immunitaires comme les cellules T et les cellules dendritiques, mais aussi par des cellules non immunitaires (46). L'ARN messager de l'IL16 et son précurseur, pro-IL-16, sont constitutivement exprimés chez les lymphocytes T, mais les quantités de la forme bioactive de l'IL-16 varient d'une cellule à l'autre (46). Par exemple, chez les cellules T CD8 à l'état de repos, il y a présence de la forme bioactive d'IL-16 à cause de la présence de caspase-3 constitutivement active qui clive pro-IL-16 (46). Au contraire, la cellule T CD4 doit être activée afin que la caspase 3 s'active et clive pro-IL-16 (47). Lors de sa libération, cette cytokine induit l'expression des récepteurs alpha et bêta de l'IL-2 par les cellules T CD4 et protège ces cellules de l'apoptose (47). Ainsi, cette cytokine permet la prolifération et l'expansion non-clonale dépendante d'IL-2 des lymphocytes T CD4 (47). De plus, l'IL-16 semble être un chimioattractant plus efficace pour les cellules T CD4 Th1 que Th2 (47). En effet, l'IL-16 favorise plutôt les réponses inflammatoires et immunitaires de type I que de type II (47). L'IL-16 pourrait donc être un des principaux médiateurs de l'HAI, car en favorisant les réponses Th1, il y a expansion des CTLs autoréactifs et activation des macrophages qui eux contribuent à la destruction du tissu hépatique et à l'amplification de l'inflammation dans le foie. En effet, des études *in vivo* démontrent que l'IL-16 participe au recrutement et à l'activation des lymphocytes T CD4 aux sites d'inflammation associés aux maladies auto-immunes (46).



**Figure 2.-** Effets de l'IL-16 sur les lymphocytes T CD4.

En se liant à son récepteur, CD4, l'IL-16 attire préférentiellement les lymphocytes T CD4 de type Th1 ce qui favorise les réponses inflammatoires et immunitaires de type Th1 et inhibe les réponses inflammatoires et immunitaires de type Th2. L'IL-16 induit aussi l'expression d'IL-2R $\alpha$  et IL-2R $\beta$  par les lymphocytes T CD4 causant la prolifération dépendante de l'IL-2 de celles-ci.

Adapté de : K.C. Wilson *et al.*, 2004 (47).

## Interleukine-10

L'interleukine-10 (IL-10) est une cytokine anti-inflammatoire qui régule à la baisse la production de cytokines pro-inflammatoires et, en limitant les réponses immunitaires, joue un rôle central dans la prévention des dommages à médiation immunitaire chez l'hôte (19). Une dérégulation de la production d'IL-10 jouerait un rôle important dans l'apparition et le développement de plusieurs maladies auto-immunes (19). Plusieurs cellules immunitaires produisent de l'IL-10 soit les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T et B (48). L'IL-10 semble principalement cibler les macrophages (48). Lorsque l'IL-10 se lie à son récepteur, IL-10R à la surface des macrophages, il y a activation de voies de signalisation entraînant une diminution de la présentation antigénique, de la phagocytose et de la libération de cytokines pro-inflammatoires

par celles-ci (19). L'IL-10 inhibe aussi les réponses immunitaires des cellules T en régulant à la baisse le CMH II, les molécules co-stimulatrices et les molécules d'adhésion sur les CPA (48). Comme mentionné précédemment, les T<sub>REG</sub> sécrètent de l'IL-10. Via sécrétion autocrine, l'IL-10 favorise la survie et les fonctions suppressives des T<sub>REG</sub> en maintenant l'expression de FoxP3 (9). Ainsi, la production d'IL-10 semble primordiale pour que les T<sub>REG</sub> effectuent leurs fonctions immunosuppressives et maintiennent la tolérance.

## **Interleukine-2**

L'interleukine-2 (IL-2) est une cytokine qui régule les réponses immunitaires (49). Les principales sources d'IL-2 sont les lymphocytes T CD4 et T CD8 activés (49). Elle induit la différenciation et la prolifération des cellules T CD4 et CD8 (49). L'IL-2 est aussi importante dans la génération, la différenciation et le maintien des cellules T régulatrices afin de fournir une protection contre les maladies auto-immunes (49). Le récepteur de haute affinité de l'IL-2 contient trois sous-unités soit IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  et IL-2R $\gamma$  (49). Ce récepteur est principalement exprimé par les cellules T CD4 et CD8 après leur activation (49). Le récepteur de l'IL-2 est aussi exprimé par les T<sub>REG</sub>, cependant, elles ne sécrètent pas d'IL-2 (49). La capacité des T<sub>REG</sub> d'effectuer leurs fonctions suppressives dépend donc de l'IL-2 produite par les cellules T activées (49). En effet, les T<sub>REG</sub> se lient à l'IL-2 produite par les cellules T CD4 activées et ainsi peuvent inhiber la production de cytokines par celles-ci (49). L'expression de FoxP3 par les T<sub>REG</sub> est aussi régulée par l'IL-2 (49). De plus, les T<sub>REG</sub> ont une plus grande sensibilité à l'IL-2 leur permettant ainsi de séquestrer l'IL-2 environnant produite par les cellules T activées (50). Cela empêche donc la prolifération des cellules T et favorise la fonction suppressive des T<sub>REG</sub> (50). Puisque l'IL-2 est essentielle aux fonctions des T<sub>REG</sub>, un défaut de signalisation de l'IL-2 jouerait un rôle important dans l'apparition et le développement de maladies auto-immunes (50). En effet, si les T<sub>REG</sub> ne répondent pas à l'IL-2, la prolifération des cellules T est renforcée, ce qui contribuerait à une amplification de l'inflammation et de la réponse immunitaire des cellules T autoréactives.

## **Chapitre 3 – Projet de mémoire**

L'hépatite auto-immune est une maladie auto-immune multifactorielle de pathogenèse inconnue. Cette maladie est caractérisée par une perte de la tolérance immunologique envers des antigènes du soi hépatiques entraînant une destruction progressive du parenchyme hépatique en absence de traitements. Les traitements de première ligne de l'HAI, soit la prednisone et l'azathioprine, permettent généralement d'obtenir une réponse adéquate chez environ 80 à 90% des patients. Cependant, si l'inflammation hépatique n'est pas contrôlée, l'évolution vers la cirrhose peut survenir chez 10 à 20% des patients, conduisant à une transplantation hépatique pour certains d'entre eux. Présentement, aucune caractéristique clinique, biologique ou histologique ne peut prédire avec précision la réponse complète initiale ou la rémission à long terme de l'HAI. De plus, l'HAI est une maladie à évolution fluctuante et, actuellement, les cliniciens n'ont aucun moyen de prédire les poussées d'activité de la maladie. C'est donc pour cela qu'il est important d'identifier des biomarqueurs fiables pour aider les cliniciens à prédire l'activité de la maladie et la réponse des patients face à des traitements spécifiques ou évaluer rapidement l'efficacité de ces thérapies pour inverser le processus inflammatoire. Le but de cette étude est donc d'identifier un ou plusieurs biomarqueurs de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI afin d'améliorer les soins, prédire les résultats du traitement et permettre un traitement personnalisé.

### **Hypothèses de travail**

L'hypothèse générale de cette étude est que la rémission clinique et une réponse favorable au traitement immunosuppresseur chez les patients HAI sont influencées par des médiateurs immunologiques (cellules et/ou cytokines) qui, lorsqu'identifiés, pourraient être utilisés pour évaluer la réponse au traitement. Le lien entre les gènes des HLA de classe II et l'HAI suggère que les lymphocytes T CD4 pourraient jouer un rôle central dans la pathogenèse de cette maladie. Parmi plusieurs cytokines reliées aux lymphocytes T CD4, l'IL-16, l'IL-2 et l'IL-10 sont celles qui ont suscité un intérêt, car elles semblaient modulées chez les patients HAI. Tout d'abord, sachant que l'IL-16 pourrait être impliquée dans le recrutement et l'activation des cellules T CD4 via son

pouvoir chimioattractant, il est possible d'émettre l'hypothèse que la production d'IL-16 induirait le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD4 autoréactifs et serait liée à la progression de la maladie chez les patients HAI. De plus, sachant que l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et que les T<sub>REG</sub> sont spécialisées dans la suppression des réponses immunitaires, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'un retour à la normale des niveaux de T<sub>REG</sub> et une production d'IL-10 seraient liés à une réponse favorable au traitement chez les patients HAI. Finalement, sachant que l'IL-2 est essentielle pour la survie et la différenciation des T<sub>REG</sub> et qu'il semble y avoir une altération de la fonction suppressive des T<sub>REG</sub> chez les patients HAI, il est possible d'émettre l'hypothèse que la production d'IL-2 par les cellules T activées à la suite d'une réponse favorable au traitement favoriserait plutôt la survie des T<sub>REG</sub> et permettrait à ces cellules de regagner leurs fonctions chez les patients HAI. Bref, en supposant que les cytokines IL-2 et IL-10 seraient plutôt liées à la rémission et au contrôle du processus inflammatoire alors que l'IL-16 favoriserait plutôt l'inflammation hépatique, il est possible de supposer que ces cytokines pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'évaluation de la réponse au traitement et de l'activité de la maladie.

## **Objectifs de recherche**

Afin de vérifier ces hypothèses, le premier objectif de recherche était d'évaluer l'expression par les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et les niveaux plasmatiques des cytokines IL-16, IL-2 et IL-10 chez les patients HAI. Cela a été effectué sur des échantillons biologiques obtenus au moment du diagnostic et durant le traitement afin de déterminer s'il y a un lien entre l'expression et/ou la sécrétion de ces cytokines et l'évolution de la maladie. Le deuxième objectif de recherche était d'évaluer les niveaux circulants de différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 chez les patients HAI au moment du diagnostic et durant le traitement. Cela a été effectué afin de déterminer s'il y a un lien entre les biomarqueurs potentiels proposés précédemment pour l'HAI et les lymphocytes T CD4 effecteurs et/ou régulateurs chez les patients HAI. Le troisième objectif était d'évaluer l'expression hépatique de l'IL-16 dans le but de déterminer si ce qui était observé en circulation représentait la situation dans le foie chez les patients HAI. Le troisième objectif était d'évaluer le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 afin de déterminer si l'IL-16 pourrait être impliquée dans le recrutement de cellules T CD4 dans le foie dans l'HAI.

## Chapitre 4 – Méthodologie

**Sélection des patients.** Un total de 100 patients atteints d'HAI de type I et 7 patients atteints d'HAI de type II ont été sélectionnés pour cette étude. Les sujets ont été choisis selon plusieurs critères d'exclusions. Tout d'abord, tout patient souffrant de syndromes de chevauchements (HAI/CBP, HAI/CSP, HAI/CBP/CSP), ayant subi une transplantation de foie ou ayant toute autre atteinte au foie qui n'est pas l'HAI a été exclu. Par la suite, tout patient dont le diagnostic de l'HAI ne semble pas être confirmé (HAI peu probable, HAI probable, HAI à confirmer, HAI possible) a été exclu. Ces informations provenaient des notes au dossier des patients qui ont été fournies par le clinicien. Parmi les patients HAI de type I et de type II restants, toute patiente enceinte a été exclue de cette étude. Cette étude a donc été effectuée sur un total de 303 échantillons provenant de 107 patients HAI. Tous les échantillons qui ont été sélectionnés provenaient de patients des deux sexes, de tout âge, ayant différents niveaux d'ALT et qui sont sous différents traitements. Pour les échantillons de biopsies, un total de 7 patients HAI parmi les 107 patients HAI ont été sélectionnés au hasard pour un total de 7 échantillons. Un total de 5 patients ayant des atteintes hépatiques autre que l'HAI ont aussi été sélectionnés à titre de contrôles pour un total de 4 échantillons de biopsies et 4 échantillons de PBMCs. Ces patients ont été sélectionnés en fonction de l'histologie du foie. En effet, chacun d'entre eux ne démontrait aucun signe histologique typique de l'HAI. Les échantillons de biopsies de patients HAI et contrôles qui ont été sélectionnés provenaient de patients des deux sexes, de tout âge, ayant différents niveaux d'ALT et qui sont sous différents traitements.

**Échantillons.** Les échantillons de plasma sanguin de patients HAI provenant de la Biobanque de recherche sur l'hépatite autoimmune (CRCHUM) ont été conservés à -80°C. Le plasma sanguin a été prélevé pour chacun des tubes de sang reçus après centrifugation à 450g durant 10 minutes. Les échantillons de PBMCs et de biopsie de patients HAI provenant de la Biobanque de Recherche sur l'Hépatite Autoimmune (CRCHUM) ont été conservés à long terme dans l'azote liquide. Les PBMCs ont été isolés du sang total après centrifugation à 1200g durant 15 minutes à l'aide des tubes SepMate™ de StemCell et d'un milieu de séparation des lymphocytes (LSM) utilisé pour l'isolement *in vitro* des lymphocytes de l'ensemble du sang. Les PBMCs ont ensuite été suspendus

dans un milieu de congélation composé de 90% de sérum de veau fœtal (FBS) et 10% de DMSO pour être finalement répartis dans des tubes cryogéniques pour la congélation. Les cellules ont été congelées dans un contenant de congélation Mr. Frosty™ durant 24 heures à -80°C avant d'avoir été conservées à long terme dans l'azote liquide.

**Extraction d'ARN.** L'ARN a été extrait de 191 échantillons de PBMCs de patients HAI, de 7 échantillons de biopsie de patients HAI et de 4 échantillons de biopsie de patients contrôles. Les tubes de PBMCs ont d'abord été transférés de l'azote liquide à un bain-marie de 37°C. Les tubes ont été maintenus à la surface de l'eau du bain-marie pour la décongélation. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 350g pendant 5 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, le culot de cellules a été suspendu dans un millilitre de TRIzol™ Reagent de Invitrogen™. 200µL de chloroforme a ensuite été ajouté aux tubes et ceux-ci ont été vortexés durant 30 secondes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 14000rpm et 4°C durant 15 minutes. Après avoir récupéré la phase aqueuse dans des tubes propres, 500µL d'isopropanol et 1µL de GlycoBlue™ Coprecipitant de Invitrogen™ ont été ajoutés à ces tubes afin d'augmenter la visibilité du culot d'acides nucléiques. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 14000rpm et 4°C durant 10 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, un millilitre d'éthanol 75% a été ajouté aux tubes. Par la suite, les tubes ont été centrifugés à 14000rpm et 4°C durant 5 minutes. Après avoir aspiré le surnageant, le culot a été séché sur glace et suspendu dans 10µL d'H<sub>2</sub>O (sans RNase). L'ARN a été conservé à -80°C.

**Transcription inverse (RT).** L'ARN extrait de tous les échantillons mentionnés précédemment a ensuite été converti en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (RT) en utilisant le kit QuantiTect Reverse Transcription de Qiagen en suivant les instructions du fabricant. La préparation d'ADNc pour la PCR quantitative a été faite en mélangeant 5µL du produit final de la réaction avec 45µL d'H<sub>2</sub>O (sans RNase). L'ADNc a été conservé à -80°C.

**PCR quantitative (qPCR).** Les échantillons d'ADNc provenant de 191 échantillons de PBMCs patients HAI, de 7 échantillons de biopsie de patients HAI et de 4 échantillons de biopsie de patients contrôles ont été analysés dans cette étude. L'expression relative d'IL-16, d'IL-2 et d'IL-10 par les PBMCs et des biopsies a été déterminée par PCR quantitative (qPCR). Le format FASTA des séquences nucléotidiques de nos gènes d'intérêts a été obtenu à l'aide de l'outil RefSeqGene

de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/>) et Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a été utilisé en tant qu'outil pour trouver des amorces spécifiques à nos gènes d'intérêts. Les séquences des amorces utilisées, la taille des amplicons obtenus ainsi que les températures d'hybridation des amorces sont répertoriées dans le tableau III. Les gènes de référence qui ont été utilisés pour normaliser l'expression des gènes obtenue par qPCR pour nos gènes d'intérêts sont les gènes S9 et HMBS (51-52). La réaction de qPCR a été effectuée en mélangeant 5µL d'ADNc et 15µL du mix qPCR contenant les réactifs suivants : Tampon SYBR Green de Qiagen, amorce forward (dilution 1/10), amorce reverse (dilution 1/10) et H<sub>2</sub>O (sans RNase). Les tubes qPCR ont été déposés dans le Corbett Research Rotor-Gene 3000. L'amplification par qPCR a été réalisée pendant 2 heures durant 40 cycles de : premièrement, 94°C pendant 15 secondes, deuxièmement, 59°C pendant 30 secondes et troisièmement, 72°C pendant 30 secondes. L'analyse des courbes a été fait avec le logiciel Rotor-gene 6 avec un seuil de détection de 0,327. Les calculs du  $\Delta Ct$  et du fold gene expression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) ont ensuite été effectués.

**Tableau 3.** Caractéristiques des amorces spécifiques à nos gènes d'intérêts

Gène	Séquences des amorces	Taille de l'amplicon (pb)	Température d'hybridation (T <sub>m</sub> ) en °C
S9	F: 5'-CGTCTCGACCAAGAGCTGA-3' R: 5'-GGTCCTTCTCATCAAGCGTC-3'	123	59
HMBS	F: 5'-AAGCGGAGCCATGTCTGGTAAC-3' R: 5'-GTACCCACGCGAATCACTCTCA-3'	84/151/175	60
IL-16	F: 5'-GCCTCTTAAGCAGTGGGTGT-3' R: 5'-CACAGACCAAGTCCTCCACA-3'	96	59
IL-10	F: 5'-CTCATGGCTTTGTAGATGCCT-3' R: 5'-GCTGTCATCGATTTCTCCC-3'	103	59
IL-2	F: 5'-GCACTTCCTCCAGAGTTTG-3' R: 5'-TCACCAGGATGCTCACATTT-3'	102	59

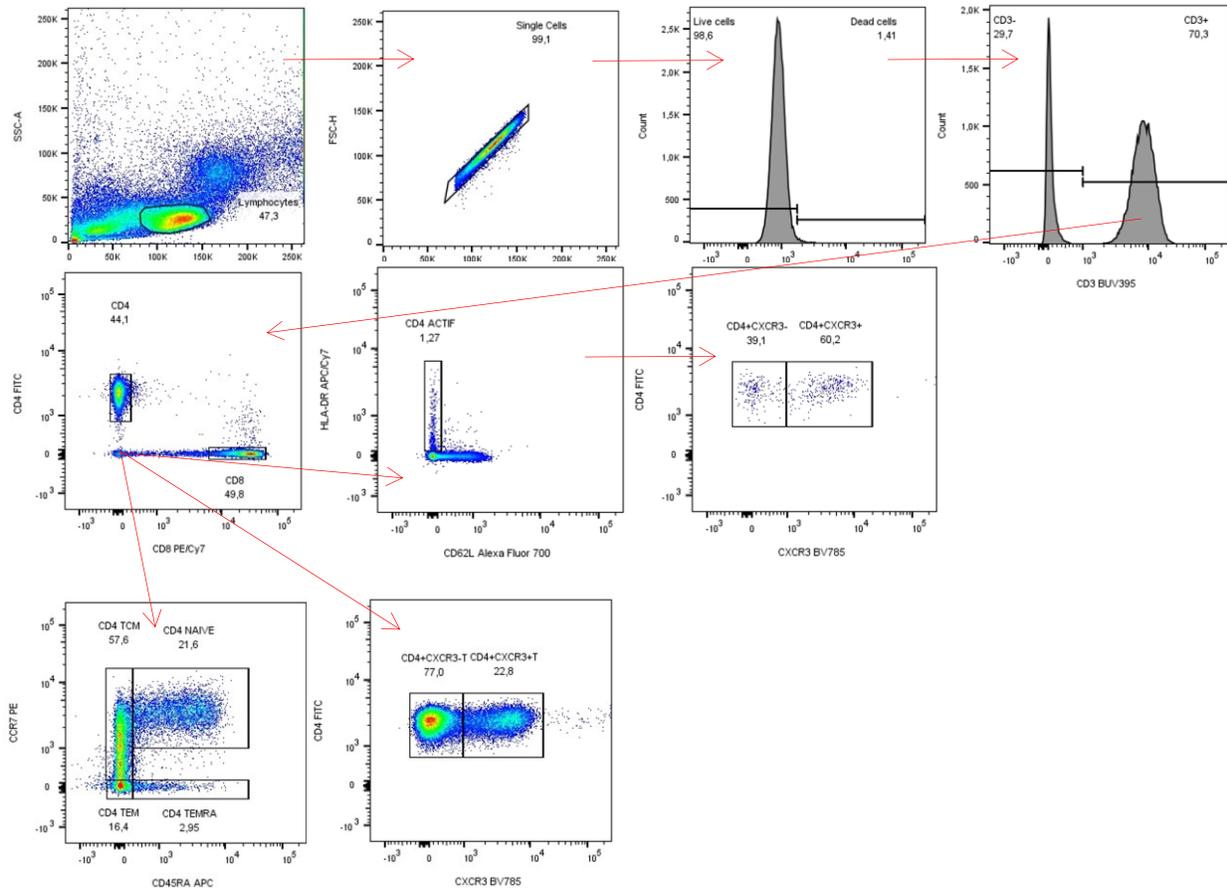
**ELISA.** 303 échantillons de plasmas de patients HAI ont été analysés dans cette étude. La concentration d'IL-16 dans le plasma de patients HAI a été déterminée à l'aide du kit Human IL-16 DuoSet ELISA de R&D Systems selon le protocole du fabricant. La concentration d'IL-10 (pg/mL) dans le plasma de patients HAI a été déterminée à l'aide du kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-10 de BioLegend selon le protocole du fabricant. La concentration d'IL-2 (pg/mL) dans le plasma de patients HAI a été déterminée à l'aide du kit ELISA MAX™ Deluxe Set Human IL-2 de BioLegend selon le protocole du fabricant. La lecture de la plaque a été fait à 450 et 570nm au spectrophotomètre. L'absorbance à 570nm (bruit de fond) a été soustraite de l'absorbance à 450nm avant d'avoir construit une courbe standard (polynomiale ou puissance dépendant de celle qui correspond le mieux aux données) corrélant l'absorbance et la concentration de la cytokine. Ainsi, la concentration en pg/mL de nos cytokines d'intérêts dans le plasma des patients HAI a été calculée.

**Cytométrie en flux.** 51 échantillons de PBMCs provenant de patients HAI ont été analysés par cytométrie en flux. 5 échantillons de PBMCs provenant de patients sains ont aussi été analysés par cytométrie en flux par un ancien étudiant. Les panels de cytométrie en flux utilisés et les caractéristiques des anticorps utilisés sont répertoriés dans le tableau IV. La stratégie de gating est représentée pour le panel T CD4 effecteur dans les figures 3, 4 et 5 et pour le panel T CD4 régulateur dans la figure 6. Le marqueur de viabilité qui a été utilisé est le Zombie Yellow™ de BioLegend ayant une excitation à 405nm par le laser violet et une émission à 572nm. Il a été reconstitué selon les instructions du fabricant. Concernant le protocole, les tubes de PBMCs ont d'abord été transférés de l'azote liquide à la surface de l'eau du bain-marie à 37°C pour la décongélation. Les PBMCs ont ensuite été transférés dans un tube en polypropylène de 50 mL dans lequel il a été ajouté goutte par goutte du RPMI complet (10% FBS + 5mL PEN/STREP) jusqu'à 40 mL. Après une centrifugation à 350g durant 5 minutes à 20°C, le surnageant a été retiré. Le marquage a été effectué sur approximativement 1 à 2 millions de cellules par tube de cytométrie en flux de 5mL. Finalement, le marquage de viabilité, de surface et intracellulaire de FOXP3 a été effectué sur les PBMCs selon le protocole du fabricant (BioLegend). Les lavages ont été effectués avec un tampon FACS (PBS + 2%FBS) et les cellules ont été fixées à la toute fin à l'aide du tampon de fixation de BioLegend. Les cellules ont été analysées au cytomètre en flux FACSymphony™ de

BD Biosciences et le logiciel FlowJo™ a été utilisé pour analyser les résultats obtenus au cytomètre en flux.

**Tableau 4.** Panels et caractéristiques des anticorps utilisés en cytométrie en flux

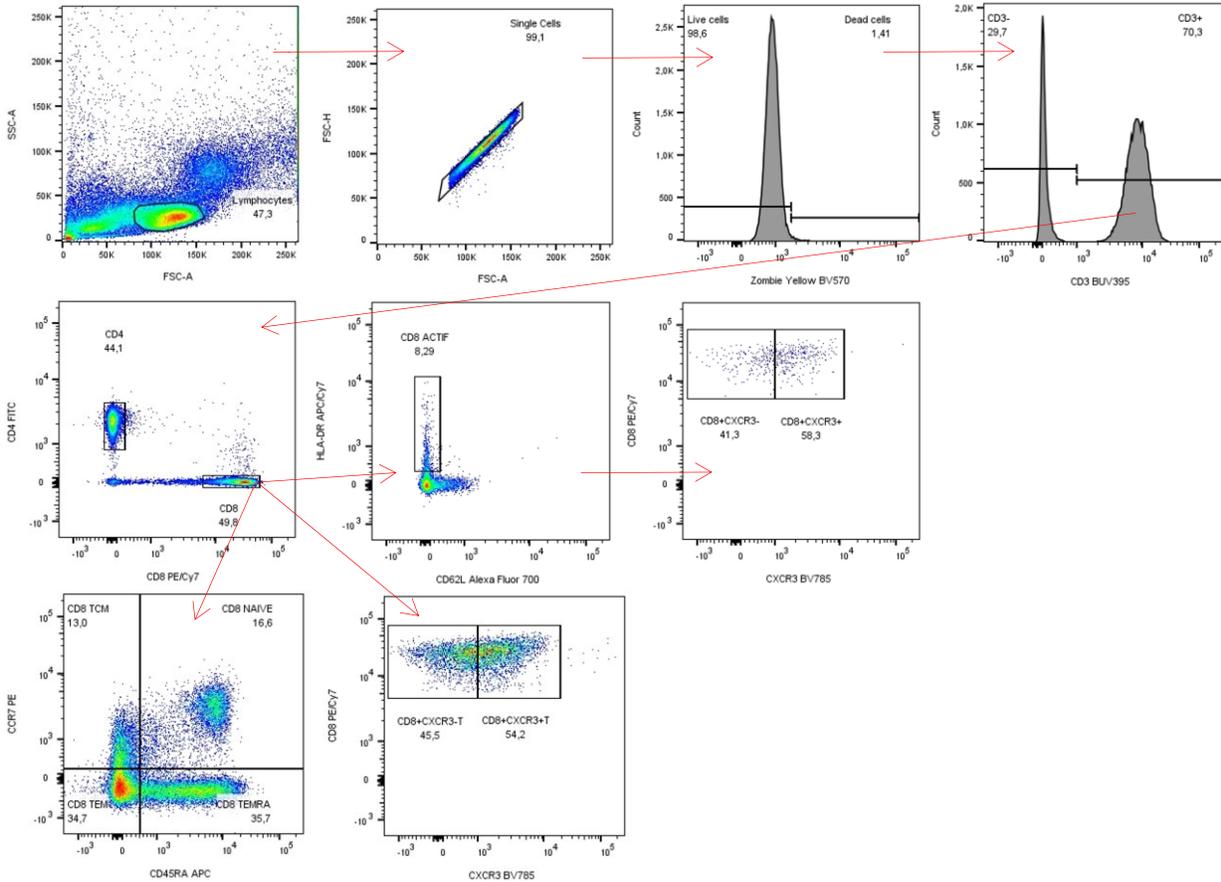
Panel	Fluorophore	Anticorps	Excitation (nm)	Laser d'excitation	Émission (nm)	# clone
T CD4 effecteur/régulateur	FITC	CD4	488	Bleu	525	SK3 (BioLegend)
T CD4 effecteur/régulateur	BUV395	CD3	355	Ultraviolet	395	UCHT1 (BD Horizon)
T CD4 effecteur/régulateur	PE/Cyanine7	CD8	488 et 561	Bleu et Jaune/Vert	774	SK1 (BioLegend)
T CD4 effecteur	APC	CD45RA	633	Rouge	660	HI100 (BioLegend)
T CD4 effecteur	PE	CCR7	488 et 561	Bleu et Jaune/Vert	575	G043H7 (BioLegend)
T CD4 effecteur/régulateur	BV785	CXCR3	405	Violet	785	G025H7 (BioLegend)
T CD4 effecteur	APC/Cyanine7	HLA-DR	633	Rouge	774	L243 (BioLegend)
T CD4 effecteur	PerCP/Cyanine5.5	CD16	488	Bleu	690	3G8 (BioLegend)
T CD4 effecteur	PE/Dazzle™ 594	CD56	488 et 561	Bleu et Jaune/Vert	610	HCD56 (BioLegend)
T CD4 effecteur	Alexa Fluor® 700	CD62L	633	Rouge	719	DREG-56 (BioLegend)
T CD4 régulateur	APC	CD25	633	Rouge	660	BC96 (BioLegend)
T CD4 régulateur	PE	FOXP3	488 et 561	Bleu et Jaune/Vert	575	206D (BioLegend)
T CD4 régulateur	APC/Cyanine7	CD39	633	Rouge	774	A1 (BioLegend)
T CD4 régulateur	Alexa Fluor® 700	CD127	633	Rouge	719	A019D5 (BioLegend)



**Abréviations :** CD4 TCM; pour lymphocytes T CD4 centraux mémoires, CD4 TEM; pour lymphocytes T CD4 effecteurs mémoires, CD4 TEMRA; pour lymphocytes T CD4 effecteurs mémoires réexprimant CD45RA, CD4 NAIVE; pour lymphocytes T CD4 naïfs.

**Figure 3.** - Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD4 effecteurs

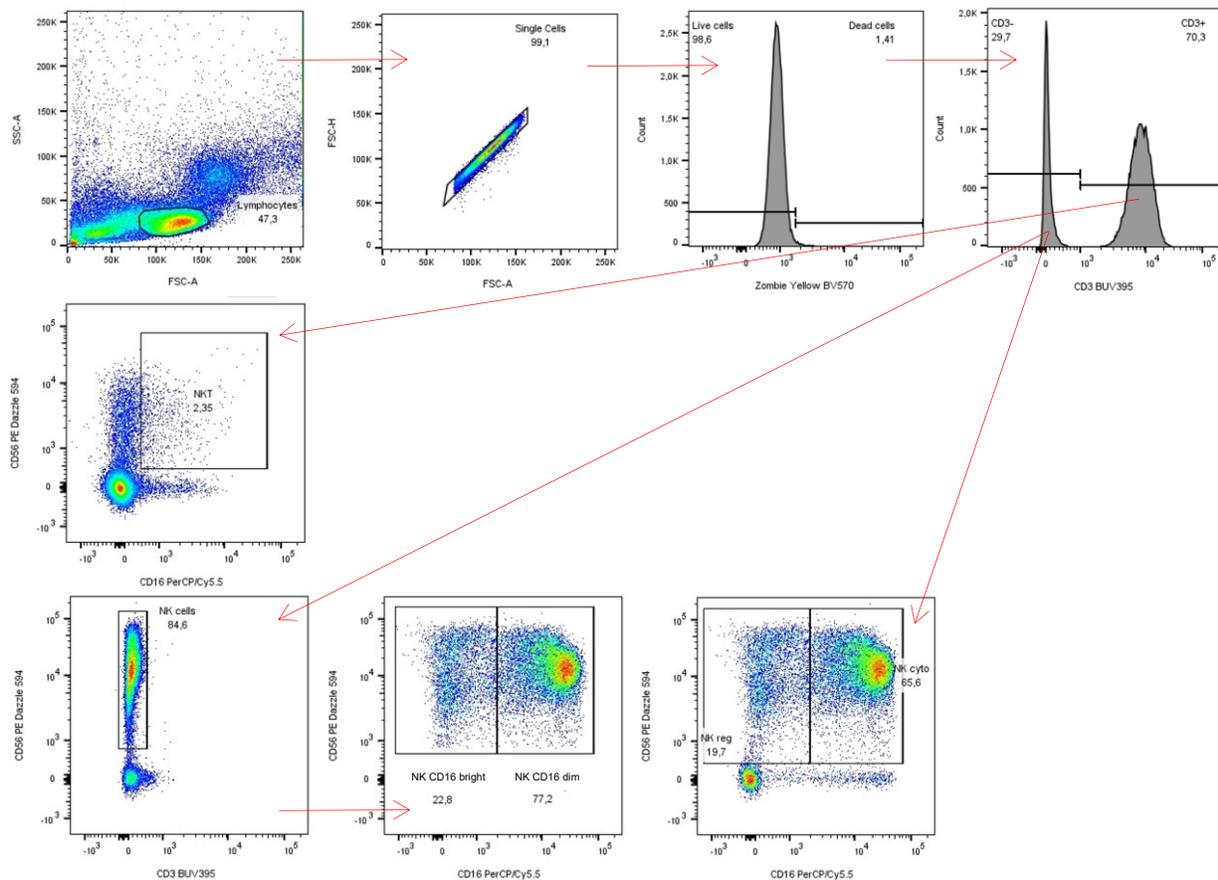
Parmi la totalité des lymphocytes T CD4 ( $CD3^+CD4^+CD8^-$ ), le pourcentage des sous-populations de lymphocytes T CD4 TCM ( $CCR7^+CD45RA^-$ ), naïfs ( $CCR7^+CD45RA^+$ ), TEM ( $CCR7^-CD45RA^-$ ) et TEMRA ( $CCR7^-CD45RA^+$ ) a été déterminé chez les patients HAI. CCR7 est un marqueur de migration des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes (53) et CD45RA est un marqueur de cellules T naïves (54). Ensuite, parmi la totalité des lymphocytes T CD4, le pourcentage de cellules T CD4 exprimant CXCR3 a été déterminé chez les patients HAI. CXCR3 est un marqueur de migration des cellules T CD4 Th1 vers les sites d'inflammation de type Th1 en périphérie (55). De plus, parmi la totalité des lymphocytes T CD4, le pourcentage de cellules T CD4 activées ( $HLA-DR^+CD62L^-$ ) a été déterminé chez les patients HAI. HLA-DR est un marqueur d'activation des cellules T (56) et CD62L est un marqueur de cellules T naïves (57). Finalement, le pourcentage de cellules T CD4 activées exprimant CXCR3 a été déterminé chez les patients HAI.



**Abréviations :** CD8 TCM; pour lymphocytes T CD8 centraux mémoires, CD8 TEM; pour lymphocytes T CD8 effecteurs mémoires, CD8 TEMRA; pour lymphocytes T CD8 effecteurs mémoires réexprimant CD45RA, CD8 NAIVE; pour lymphocytes T CD8 naifs.

**Figure 4. –** Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD8

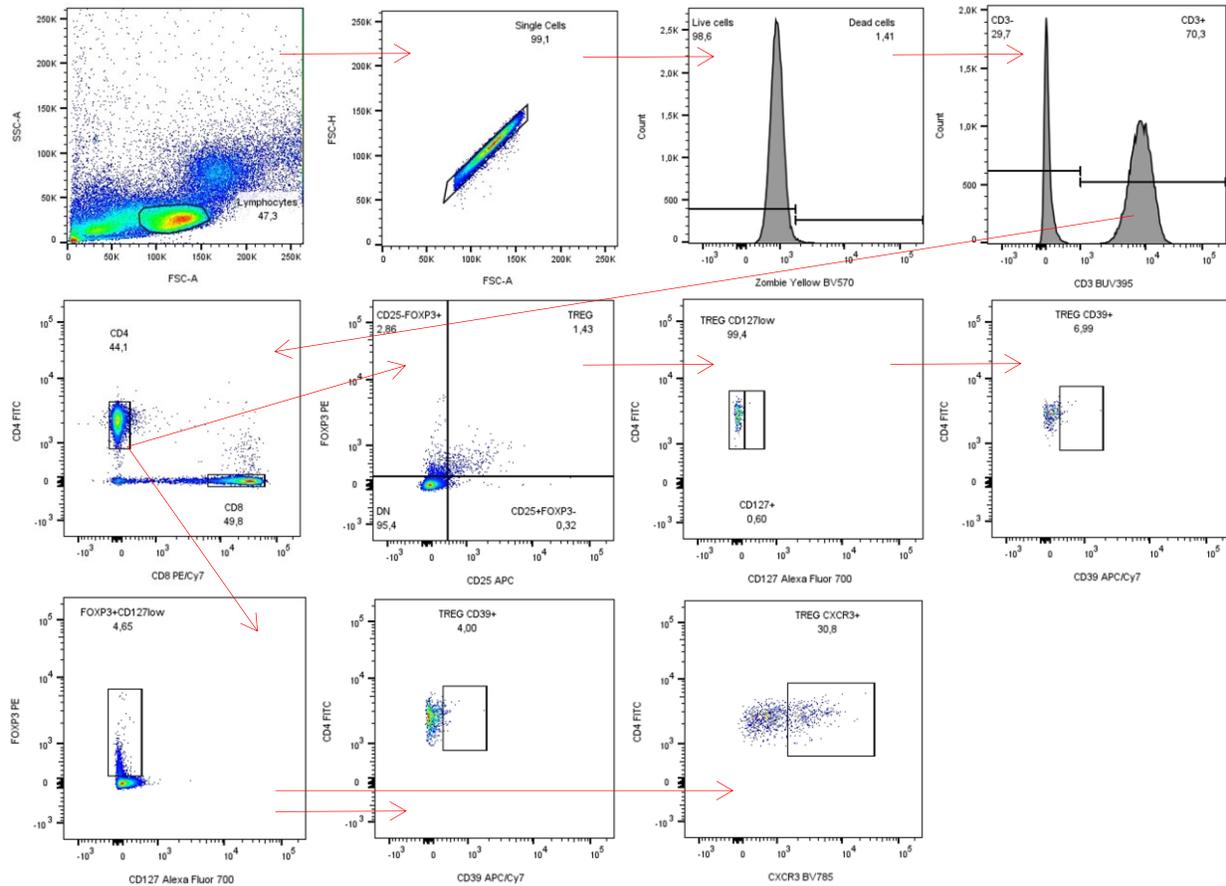
Parmi la totalité des lymphocytes T CD8 ( $CD3^+CD4^-CD8^+$ ), le pourcentage des sous-populations de lymphocytes T CD8 TCM ( $CCR7^+CD45RA^-$ ), naifs ( $CCR7^+CD45RA^+$ ), TEM ( $CCR7^-CD45RA^-$ ) et TEMRA ( $CCR7^-CD45RA^+$ ) ont été déterminé chez les patients HAI. Ensuite, parmi la totalité des lymphocytes T CD8, le pourcentage de cellules T CD8 exprimant CXCR3 a été déterminé chez les patients HAI. CXCR3 est un aussi marqueur de migration des cellules T CD8 vers les sites d'inflammation de type Th1 en périphérie (55). Aussi, parmi la totalité des lymphocytes T CD8, le pourcentage de cellules T CD8 activées ( $HLA-DR^+CD62L^-$ ) a été déterminé chez les patients HAI. Finalement, le pourcentage de cellules T CD8 activées exprimant CXCR3 a été déterminé chez les patients HAI.



**Abbreviations :** NKT; pour lymphocytes NKT, NK CD16 dim ( $CD3^-CD56^{dim}CD16^+$ ); pour sous-population de cellules NK Dim, NK CD16 bright ( $CD3^-CD56^{bright}CD16^-$ ); pour sous-population de cellules NK Bright; NK reg; pour sous-population de cellules NK immunorégulatrices; NK cyto; pour sous-population de cellules NK cytolytiques.

**Figure 5. –** Stratégie de gating pour les cellules natural killer (NK)

Parmi la totalité des cellules exprimant CD3, le pourcentage de lymphocytes NKT ( $CD3^+CD56^+CD16^+$ ) a d'abord été déterminé chez les patients HAI. Ensuite, parmi la totalité des cellules n'exprimant pas CD3, le pourcentage des cellules NK ( $CD3^-CD56^+$ ), NK reg ( $CD3^-CD56^+CD16^-$ ) et NK cyto ( $CD3^-CD56^+CD16^+$ ) a été déterminé chez les patients HAI. CD16 et CD56 sont des marqueurs de surface des cellules NK (58). Les cellules NK peuvent être divisées en deux sous-populations différentes en fonction de l'expression de CD56 (58). Il y a les cellules NK Dim ( $CD3^-CD56^{dim}CD16^+$ ) qui ont des fonctions cytotoxiques et les cellules NK Bright ( $CD3^-CD56^{bright}CD16^-$ ) qui ont des fonctions immunorégulatrices (58). Le pourcentage de ces sous-populations a finalement été déterminé chez les patients HAI parmi la totalité des cellules NK.



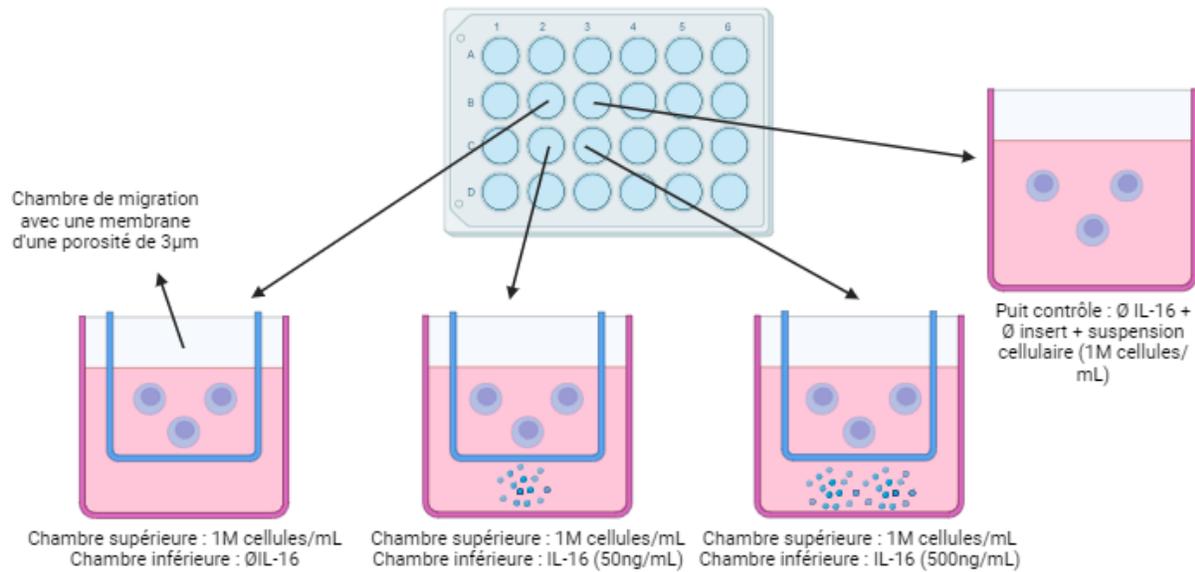
**Abbreviations :** DN; pour double-négatif, TREG; pour lymphocytes T CD4 réguliers.

**Figure 6.** - Stratégie de gating pour les lymphocytes T CD4 réguliers

Parmi la totalité des lymphocytes T CD4 ( $CD3^+CD4^+CD8^-$ ), le pourcentage de lymphocytes T CD4 réguliers ( $FOXP3^+CD25^{high}CD127^{low}$ ) a été déterminé à l'aide des marqueurs FOXP3, CD25 et CD127 chez les patients HAI. FOXP3 est un marqueur spécifique des cellules T régulatrices et celles-ci expriment des niveaux élevés de CD25 et des niveaux faibles des CD127 à leur surface. Finalement, parmi la totalité des cellules T régulatrices, le pourcentage des lymphocytes T réguliers exprimant les marqueurs CXCR3 et CD39 a été déterminé chez les patients HAI. CD39 est un marqueur permettant d'identifier une sous-population de cellules T régulatrices fortement suppressives (59).

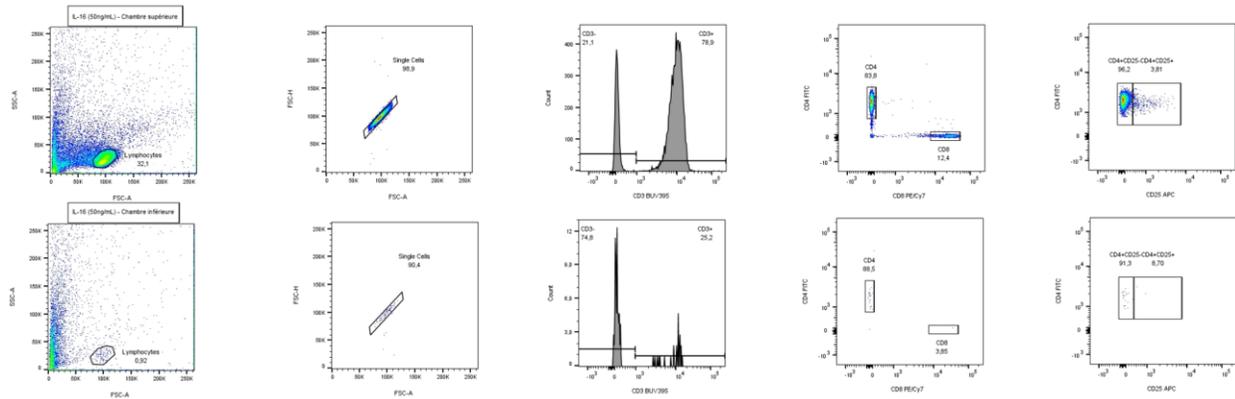
**Essai de chimiotaxie.** Les essais de chimiotaxie ont été effectués sur 9 échantillons de PBMCs provenant de patients HAI et 4 échantillons de PBMCs provenant de patients contrôles. Cela a été effectué afin d'évaluer le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 envers les lymphocytes T chez les patients HAI. Cette technique a été utilisée à l'aide d'IL-16 humain recombinant de BioLegend et du kit QCM Chemotaxis Cell Migration Assay de Sigma-Aldrich. Ce kit contenait des inserts avec

une membrane d'une porosité de 3µm, ce qui est optimal à la migration des leucocytes. La reconstitution de l'IL-16 a été effectuée selon les instructions du fabricant. Concernant le protocole, les PBMCs ont tout d'abord été décongelés comme décrit dans la section précédente. Les cellules ont ensuite été suspendues dans du RPMI complet dans le but d'obtenir une suspension cellulaire de 2M/mL. Par la suite, ces cellules ont été incubées durant 16 à 18 heures à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (4-6% de CO<sub>2</sub>). Le lendemain, les cellules ont été récupérées dans un tube en polypropylène de 50 mL, centrifugées à 350g durant 5 minutes et resuspendues dans un millilitre de RPMI complet après avoir retiré le surnageant. Le test de chimiotaxie a été effectué sur une suspension cellulaire de 1M/mL et selon le protocole du fabricant. Les cellules ont ensuite été incubées durant 2 heures à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> pour la migration. Après 2 heures, les cellules ont été récupérées et déposées dans des tubes FACS et un marquage de surface a été effectué sur les marqueurs suivants : CD3, CD4, CD8 et CD25. Les cellules ont été analysées au cytomètre en flux FACSymphony™ de BD Biosciences et le logiciel FlowJo™ a été utilisé pour analyser les résultats obtenus au cytomètre en flux. La schématisation de l'essai est représentée dans la figure 7 et la stratégie de gating est représentée dans la figure 8. Après avoir déterminé le pourcentage des lymphocytes T CD4, T CD8 et T CD4 exprimant CD25 dans la chambre supérieure et inférieure de chacun des puits, les ratios suivants ont été calculés : CD4/CD8 et CD4CD25<sup>+</sup>/CD4CD25<sup>-</sup>.



**Figure 7.** – Schématisation de l'essai de chimiotaxie

Tout d'abord, du RPMI complet sans IL-16, avec IL-16 à une concentration de 50ng/mL et avec IL-16 à une concentration de 500ng/mL ont été déposés dans trois puits différents d'une plaque de 24 puits. Ensuite, à l'aide de pinces stérilisées à l'éthanol 70%, les inserts ont été placés dans les trois précédents puits. Par la suite, une suspension cellulaire de 1M/mL dans un milieu complet sans IL-16 a été déposée dans la partie supérieure de chaque insert. Un dernier puit dans lequel on dépose une suspension cellulaire de 1M/mL dans un milieu complet sans IL-16 a été utilisé à titre de contrôle et il ne contenait ni IL-16 ni insert. Du PBS 1X a été ajouté dans les puits vides de la plaque afin d'éviter que les milieux s'évaporent. La plaque a ensuite été incubée durant 2 heures à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (4-6% de CO<sub>2</sub>) pour la migration des cellules.



**Figure 8.** – Stratégie de gating pour les lymphocytes T dans les essai de chimiotaxie

Parmi la totalité des cellules exprimant CD3, le pourcentage de lymphocytes T CD4 ( $CD3^+CD4^+CD8^-$ ) et T CD8 ( $CD3^+CD4^-CD8^+$ ) a été déterminé dans la chambre supérieure et inférieure de chacun des puits chez les patients HAI et les patients contrôles. Parmi la totalité des lymphocytes T CD4, le pourcentage de cellules T CD4 exprimant CD25 a été déterminé dans la chambre supérieure et inférieure de chacun des puits chez les patients HAI et les patients contrôles. Aucun marquage de viabilité et intracellulaire de FOXP3 n'a été effectué pour les essais de chimiotaxie.

**Analyses statistiques.** Le test T de Student non apparié a été utilisé afin de comparer les moyennes de deux groupes de sujets indépendants. L'ANOVA (ANalysis Of VAriance) a été utilisée afin de comparer plusieurs moyennes de différents groupes de sujets indépendants. Dans les deux cas, les résultats ont été considérés significatifs lorsque la valeur de p était plus petite que 0,05. La corrélation de Pearson a été utilisée afin de déterminer s'il y avait une corrélation entre deux paramètres différents. Le coefficient de détermination linéaire de Pearson ( $r^2$ ) qui varie de 0 à 1 a été utilisé afin d'évaluer la relation linéaire de deux variables continues et à quel point elles s'expliquent par la régression linéaire simple. Les zones d'intervalle de confiance à 95 % sont affichées en gris dans les graphiques. Les résultats ont été considérés significatifs lorsque la valeur de p était plus petite que 0,05. La courbe ROC a été utilisée pour calculer des seuils de classification en maximisant la spécificité et la sensibilité. L'analyse PCA (analyse en composantes principales) a été utilisée afin d'identifier, parmi notre grand ensemble de données de laboratoire, lesquelles expliquent le mieux la variance de notre variable d'intérêt soit les ALT. Le logiciel qui a été utilisé pour les analyses statistiques est Graphpad Prism 10.

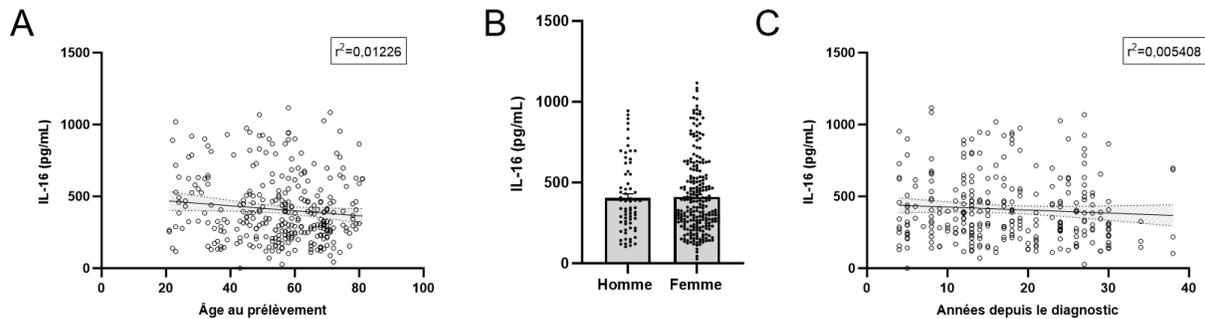
## Chapitre 5 – Résultats

Autant des facteurs génétiques que non génétiques semblent augmenter la susceptibilité d'une personne à l'HAI. Certains gènes, augmentant la susceptibilité à l'HAI, ont été localisés dans le locus du CMH, en particulier les allèles des HLA de classe II qui sont associés aux lymphocytes T CD4. Le lien entre les gènes des HLA de classe II et l'HAI suggère que les lymphocytes T CD4 pourraient jouer un rôle central dans la pathogenèse de cette maladie. De plus, plusieurs études démontrent qu'un défaut d'expression de certains gènes entraînant une altération de la fonction suppressive des lymphocytes T CD4 régulateurs est observé chez les patients HAI. Un criblage préliminaire de plusieurs cytokines reliées aux lymphocytes T CD4 soit l'IL-16, l'IL-23a, l'IL-17, l'IL-17f, l'IL-10, l'IL-2, l'IL-21 et l'IL-22 a été effectué en utilisant notre biobanque d'échantillons biologiques de patients HAI. Parmi celles-ci, l'IL-16, l'IL-2 et l'IL-10 sont celles qui ont suscité un intérêt, car elles semblaient modulées chez les patients HAI.

Afin d'évaluer si les cytokines IL-16, IL-10 et IL-2 pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'évaluation de la réponse au traitement et de l'activité de la maladie chez les patients HAI, l'expression de ces cytokines par les PBMCs a été obtenue par qPCR chez des patients HAI avant le traitement et durant le traitement. Cependant, en effectuant que des qPCR, il est seulement possible de déterminer le potentiel de sécrétion de ces cytokines. Des ELISA ont donc aussi été effectuées afin de déterminer la concentration de ces cytokines dans le plasma sanguin de patients HAI avant le traitement et durant le traitement soit la réelle quantité d'IL-16, d'IL-10 et d'IL-2 sécrété. Ensuite, afin d'évaluer si ce qui était observé en circulation représentait la situation dans le foie chez les patients HAI, l'expression hépatique de l'IL-16, l'IL-2 et l'IL-10 a été obtenue par qPCR. De plus, afin d'évaluer le lien entre différentes sous-populations de lymphocytes T CD4 et nos cytokines d'intérêts chez les patients HAI, les niveaux circulants des lymphocytes T CD4 ont été déterminés par cytométrie en flux chez des patients HAI avant le traitement et durant le traitement. Finalement, afin d'évaluer si l'IL-16 pourrait être impliquée dans le recrutement de cellules T CD4 dans le foie dans l'HAI, le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 a été déterminé par des essais de chimiotaxie.

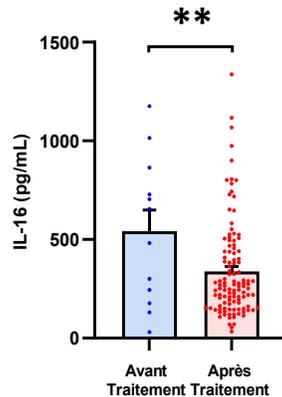
## IL-16

Tout d'abord, les niveaux plasmatiques d'IL-16 ont été évalués chez les patients HAI en fonction des différentes données cliniques suivantes : l'âge, le sexe, l'année du diagnostic, les niveaux d'ALT et le traitement. La figure 9 nous permet d'observer qu'il n'y a pas de corrélation statistiquement significative entre les taux plasmatiques d'IL-16 et l'âge au prélèvement et les années depuis le diagnostic chez les patients HAI. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les niveaux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI de sexe masculin et féminin. La figure 10 nous permet d'observer que les patients HAI ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus faibles après le traitement. La figure 11 nous permet d'observer que les patients HAI ayant des taux élevés d'ALT ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés. La figure 12 nous permet d'observer que les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-16 significativement inférieurs que ceux traités uniquement à l'azathioprine.



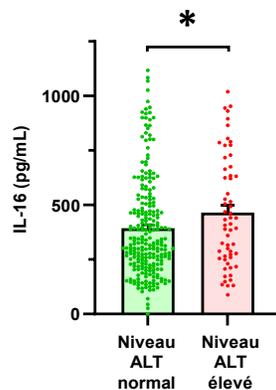
**Figure 9.** – Évaluation des niveaux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe et l'année du diagnostic

(A) Les taux plasmatiques d'IL-16 ne semblent pas corrélés avec l'âge du patient HAI au moment du prélèvement. Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=303, p=0,0518). (B) Les taux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI semblent être similaires entre les hommes et les femmes. Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI de sexe masculin (n=69) et féminin (n=234) (p=0,8626). (C) Les taux plasmatiques d'IL-16 ne semblent pas corrélés avec les années depuis le diagnostic chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=286, p=0,2150).



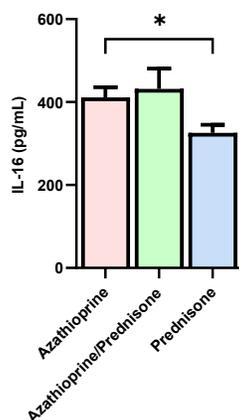
**Figure 10.** - Les patients HAI ont des taux circulants d'IL-16 significativement plus faibles après le traitement

Les patients HAI ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus faibles après le traitement. Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avant (n=12) et après traitement (n=114) (\*\*p=0.0099).



**Figure 11.** - Les patients HAI avec des taux élevés d'ALT ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés

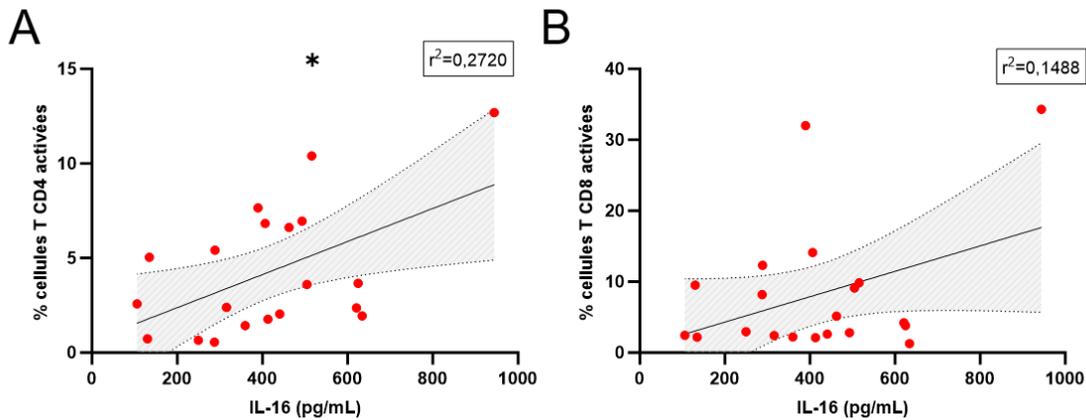
Les patients HAI avec des taux d'ALT élevés (supérieur ou égal à 40 UI/L) ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés que ceux avec des taux d'ALT normaux (inférieur à 40 UI/L). Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avec des taux d'ALT normaux (< 40 UI/L) (n=243) et chez des patients HAI avec des taux d'ALT anormaux ( $\geq$  40 UI/L) (n=59) (\*p=0,0359).



**Figure 12.** – Les patients HAI traités à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d’IL-16 nettement inférieurs

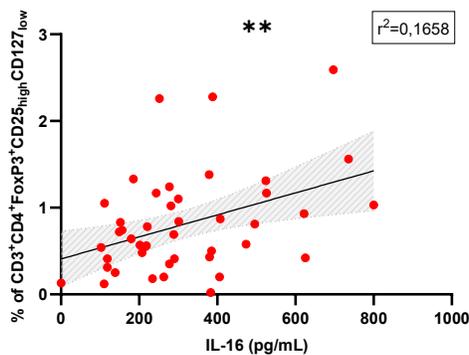
Les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des taux plasmatiques d’IL-16 significativement plus faibles que ceux qui sont traités uniquement à l’azathioprine. Les taux plasmatiques d’IL-16 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI traités à l’azathioprine seulement (n=91), à la prednisone seulement (n=78) et traités à l’azathioprine et la prednisone (n=28) (\*p=0,0304).

Ensuite, les niveaux plasmatiques d’IL-16 chez les patients HAI ont été évalués en fonction des niveaux de sous-populations de lymphocytes T CD4 effecteurs, T CD4 régulateurs et T CD8. La figure 13 démontre qu’il y a une corrélation statistiquement significative entre les niveaux plasmatiques d’IL-16 et les niveaux de cellules T CD4 activées chez les patients HAI avec des niveaux élevés d’ALT. Cependant, il est important de noter que cette corrélation est faible. La figure 14 démontre qu’il y a aussi une corrélation significative entre les taux plasmatiques d’IL-16 et les niveaux de lymphocytes T CD4 régulateurs chez les patients HAI. Cependant, il est important de noter que cette corrélation est aussi faible. Après avoir observé ces résultats, le lien entre l’IL-16 et l’IL-2 a été évalué chez les patients HAI sachant que l’IL-2 est produite par les cellules T activées et est essentielle à la survie et à la différenciation des T<sub>REG</sub>. La figure 15 démontre qu’il y a une corrélation statistiquement significative entre les niveaux plasmatiques d’IL-16 et d’IL-2 chez les patients HAI.



**Figure 13.** – Les niveaux plasmatiques d’IL-16 corrént avec les niveaux de lymphocytes T CD4 activés chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d’ALT

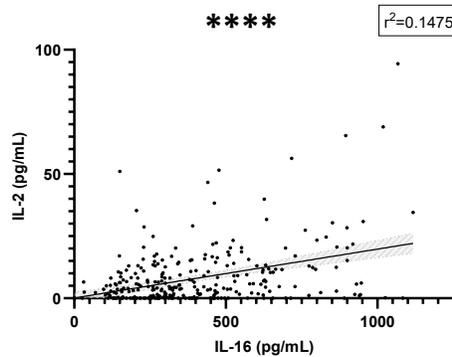
(A) Il semble y avoir une corrélation significative entre les niveaux plasmatiques d’IL-16 et les niveaux circulants de cellules T CD4 activées chez les patients HAI avec des taux élevés d’ALT, (B) mais pas avec les niveaux circulants de cellules T CD8 activées chez les patients HAI avec des taux élevés d’ALT. Les niveaux plasmatiques d’IL-16 ont été mesurés par ELISA et les niveaux circulants de cellules T CD4 activés ont été mesurés par cytométrie en flux chez des patients HAI avec des niveaux élevés d’ALT (> 40 UI/L) (n=20, \*p=0,0184). Les niveaux plasmatiques d’IL-16 ont été mesurés par ELISA et les niveaux circulants de cellules T CD8 activés ont été mesurés par cytométrie en flux chez des patients HAI avec des niveaux élevés d’ALT (> 40 UI/L) (n=20, p=0,0930).



**Figure 14.** – Les niveaux plasmatiques d’IL-16 corrént avec les niveaux de lymphocytes T CD4 régulateurs chez les patients HAI

Les niveaux plasmatiques d’IL-16 semblent corréler avec les niveaux de T<sub>REG</sub> chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d’IL-16 ont été mesurés par ELISA et les niveaux de T<sub>REG</sub>

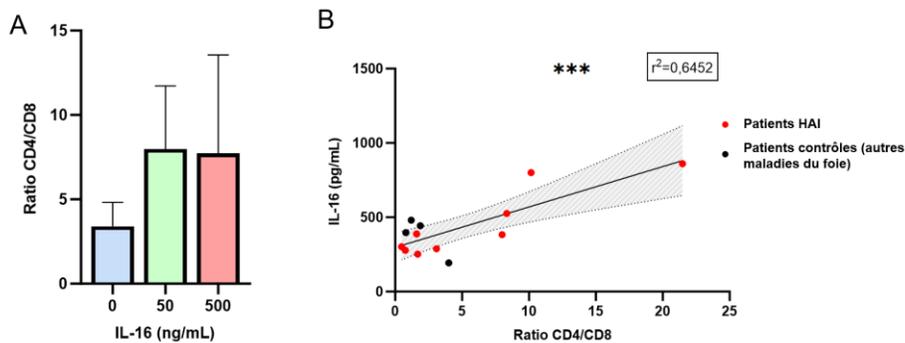
(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) ont été mesurés par cytométrie en flux chez les patients HAI (n=44, \*\*p=0,0061).



**Figure 15.** – Les taux plasmatiques d’IL-16 corrént avec les taux plasmatiques d’IL-2 chez les patients HAI

Une corrélation significative est observée entre les taux circulants d’IL-16 et d’IL-2 chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d’IL-16 et d’IL-2 ont été mesurés par ELISA chez les patients HAI (n=302, \*\*\*\*p<0,0001).

Ensuite, le pouvoir chimioattractant de l’IL-16 envers les lymphocytes T CD4 a été évalué chez les patients HAI. La figure 16 démontre que, *in vitro*, l’IL-16 favorise la migration des lymphocytes T CD4 chez les patients HAI.

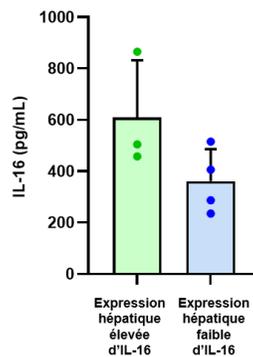


**Figure 16.** – *In vitro*, l’IL-16 favorise de manière préférentielle la migration des lymphocytes T CD4 chez les patients HAI

(A) Une concentration d’IL-16 de 50ng/mL semble être optimale pour la migration des cellules T CD4 *in vitro*. (B) *In vitro*, l’IL-16 favorise la migration des cellules T CD4 et cette migration corréle de manière significative avec les taux plasmatiques d’IL-16 chez les patients HAI (n=13, \*\*\*p=0,0009).

Les taux plasmatiques d'IL-16 ont été mesurés par ELISA et les niveaux de lymphocytes T CD4 et T CD8 ont été mesurés par cytométrie en flux chez des patients HAI (n=9) et des patients contrôles (n=4).

Finalement, l'expression hépatique d'IL-16 a été évaluée chez les patients HAI afin de déterminer si ce qu'on observe en circulation représente la situation dans le foie chez les patients HAI. La figure 17 nous permet d'observer que les patients HAI ayant une expression hépatique élevée d'IL-16 semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés. Cependant, ce résultat n'est pas significatif.



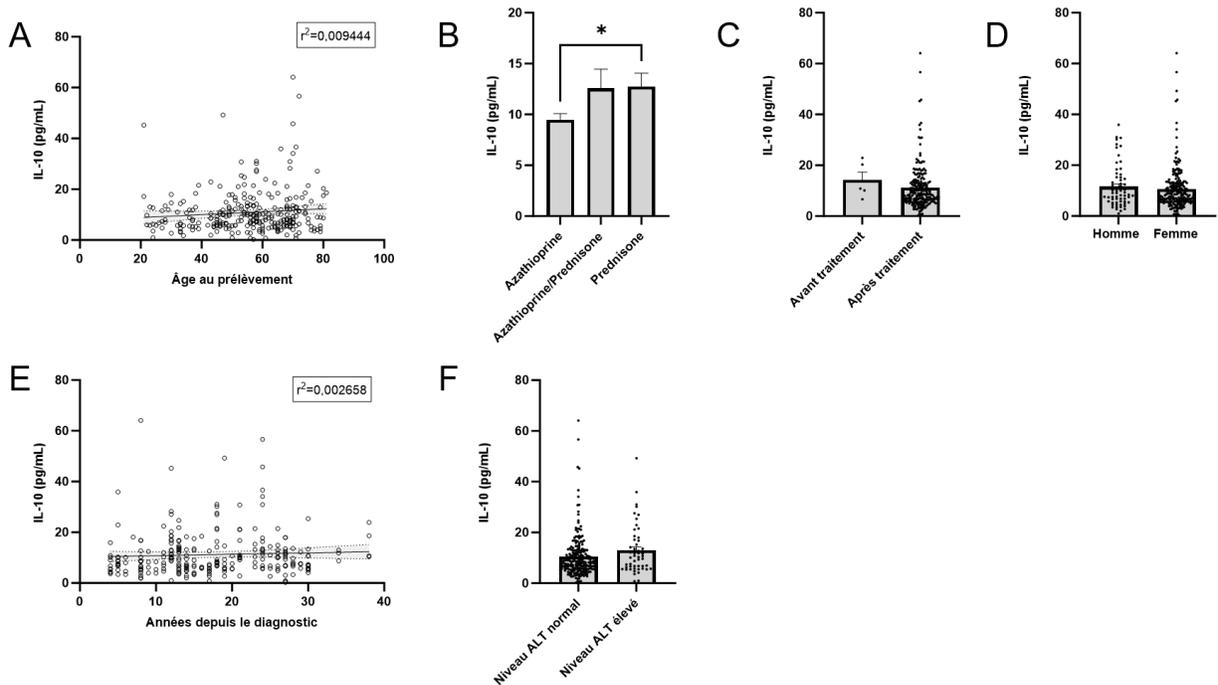
**Figure 17.** – Les patients HAI ayant une expression hépatique élevée d'IL-16 ont des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés

Les patients HAI avec une expression hépatique élevée d'IL-16 ( $>10^5$  (Fold)) semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés que ceux avec une expression hépatique faible d'IL-16 ( $<10^5$  (Fold)). Cette différence n'est pas significative. La valeur seuil pour l'expression hépatique d'IL-16 avec la sensibilité (57,14%) et la spécificité (75%) les plus élevées a été calculée à  $10^5$  (Fold) à l'aide de la courbe ROC. L'expression hépatique de l'IL-16 a été mesurée par qPCR chez des patients HAI (n=7, p=0,1158).

## IL-10

Tout d'abord, les niveaux plasmatiques d'IL-10 ont été évalués chez les patients HAI en fonction des différentes données cliniques suivantes : l'âge, le sexe, l'année du diagnostic, les niveaux d'ALT et le traitement. La figure 18 nous permet d'observer qu'il n'y a pas de corrélation statistiquement significative entre les taux plasmatiques d'IL-10 et l'âge au prélèvement et les années depuis le diagnostic. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les niveaux

plasmatiques d'IL-10 chez les patients HAI avant et après traitement, de sexe masculin et féminin et avec des taux d'ALT élevés et normaux. Il est important de noter que les taux plasmatiques d'IL-10 sont significativement plus élevés chez les patients HAI traités uniquement à la prednisone.

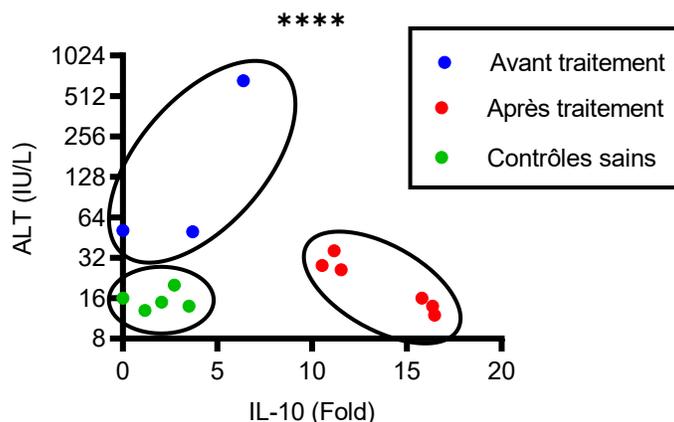


**Figure 18.** – Évaluation des niveaux plasmatiques d'IL-10 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe, de l'année du diagnostic, des niveaux d'ALT et du traitement

(A) Les taux plasmatiques d'IL-10 ne semblent pas corrélés avec l'âge du patient HAI au moment du prélèvement. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=303, p=0,1028). (B) Les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des taux plasmatiques d'IL-10 significativement plus élevés que ceux qui sont traités uniquement à l'azathioprine. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI traités à l'azathioprine seulement (n=81), à la prednisone seulement (n=64) et traités à l'azathioprine et la prednisone (n=24) (\*p=0,0465). (C) Les patients HAI avant et après traitement semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-10 similaires. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avant (n=5) et après traitement (n=207) (p=0,4521). (D) Les taux plasmatiques d'IL-10 chez les patients HAI semblent être similaires entre les hommes et les femmes. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI de sexe masculin (n=62) et féminin (n=221) (p=0,4731). (E) Les taux plasmatiques d'IL-10 ne semblent pas corrélés avec les années depuis le diagnostic chez les

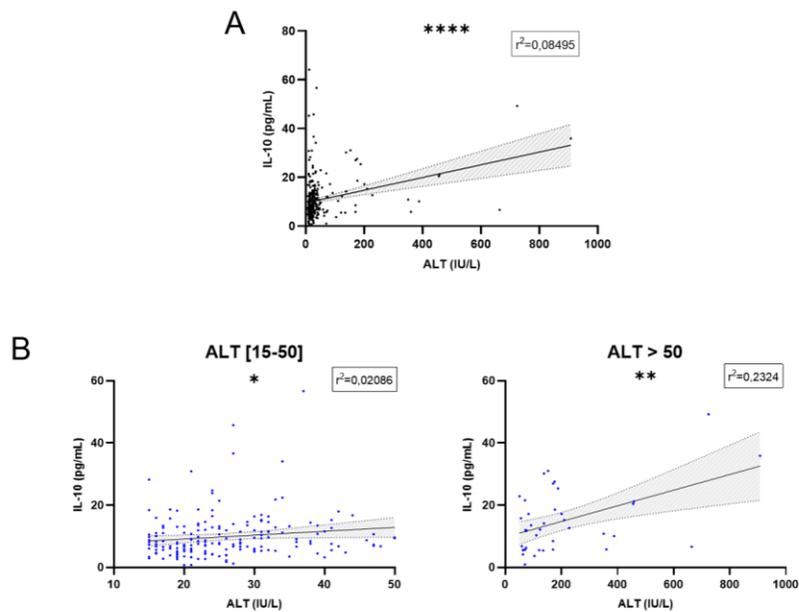
patients HAI. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=262, p=0,4059). (F) Les patients HAI avec des taux d'ALT élevés (supérieur ou égal à 40 UI/L) et ceux avec des taux d'ALT normaux (inférieur à 40 UI/L) semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-10 similaires. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avec des taux d'ALT normaux (< 40 UI/L) (n=223) et chez des patients HAI avec des taux d'ALT anormaux ( $\geq 40$  UI/L) (n=52) (p=0,0556).

Ensuite, l'expression et les taux plasmatiques d'IL-10 ont été évalués chez les patients HAI en fonction des niveaux d'ALT. La figure 19 nous permet d'observer que l'expression d'IL-10 par les PBMCs de patients HAI après traitement est significativement augmentée. La figure 20 nous permet d'observer qu'il y a une corrélation statistiquement significative entre les taux plasmatiques d'IL-10 et les niveaux d'ALT chez les mêmes patients HAI. Cependant, cette corrélation demeure extrêmement faible. La corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-10 et les taux d'ALT entre 15 à 50 IU/L et les taux d'ALT supérieurs à 50 IU/L chez les patients atteints d'HAI est statistiquement significative. La corrélation la plus significative reste tout de même celle entre les taux plasmatiques d'IL-10 et les taux d'ALT supérieurs à 50 IU/L chez les patients HAI. Après avoir observé ces résultats, le lien entre l'IL-10 et les T<sub>REG</sub> a été évalué chez les patients HAI sachant que l'IL-10 est produit par les T<sub>REG</sub>. La figure 21 nous permet d'observer que l'expression d'IL-10 corrèle avec les niveaux de T<sub>REG</sub> chez les patients HAI.

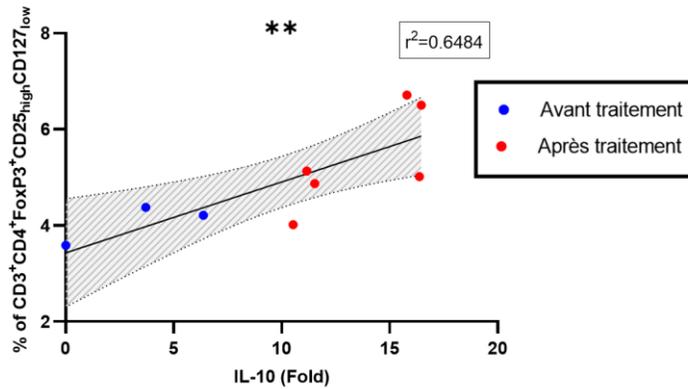


**Figure 19.** - Les patients HAI qui répondent au traitement expriment plus d'IL-10

Avant l'initiation du traitement, l'expression de l'IL-10 par les PBMC des patients HAI est similaire à celle des témoins sains. Après initiation et réponse au traitement, l'expression de l'IL-10 par les PBMC est significativement augmentée (n=14, \*\*\*\*p<0,0001). L'expression d'IL-10 a été mesurée par qPCR chez des patients HAI avant traitement (n=3), après traitement (n=6) et chez des contrôles sains (n=5).



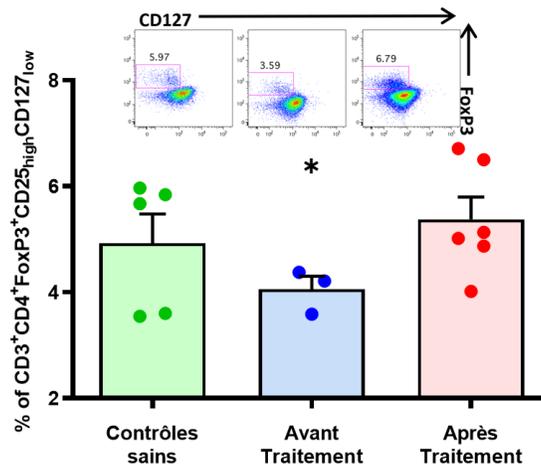
**Figure 20.** - Les taux plasmatiques d'IL-10 corrént avec les taux d'ALT chez les patients HAI (A) Les taux circulants d'IL-10 corrént avec les taux d'ALT chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=292, \*\*\*\*p<0,0001) (B) Les taux plasmatiques d'IL-10 corrént avec des taux d'ALT entre 15 à 50 IU/L et des taux d'ALT supérieurs à 50 IU/L chez les patients atteints d'HAI. La corrélation est de plus en plus statistiquement significative plus les niveaux d'ALT sont élevés. Les taux plasmatiques d'IL-10 ont été mesurés chez des patients HAI avec des niveaux d'ALT [15-50] (n=187, \*p=0,0486) et d'ALT > 50 (n=40, \*\*p=0,0016).



**Figure 21.** - Les niveaux d'expression d'IL-10 corrèlent avec les niveaux de cellules T régulatrices chez les patients HAI

On observe une corrélation statistiquement significative entre les niveaux d'expression d'IL-10 par les PBMCs et les niveaux de T<sub>REG</sub> de patients HAI avant (bleu) et après traitement (rouge) (n=9, \*\*p=0,0088). L'expression d'IL-10 a été mesurée par qPCR chez des patients HAI avant traitement (n=3) et après traitement (n=6).

Finalement, après avoir observé le lien entre l'IL-10 et les T<sub>REG</sub>, les niveaux de T<sub>REG</sub> ont été évalués chez les patients HAI. La figure 22 nous permet d'observer que les patients HAI après traitement ont des taux normaux de T<sub>REG</sub>.

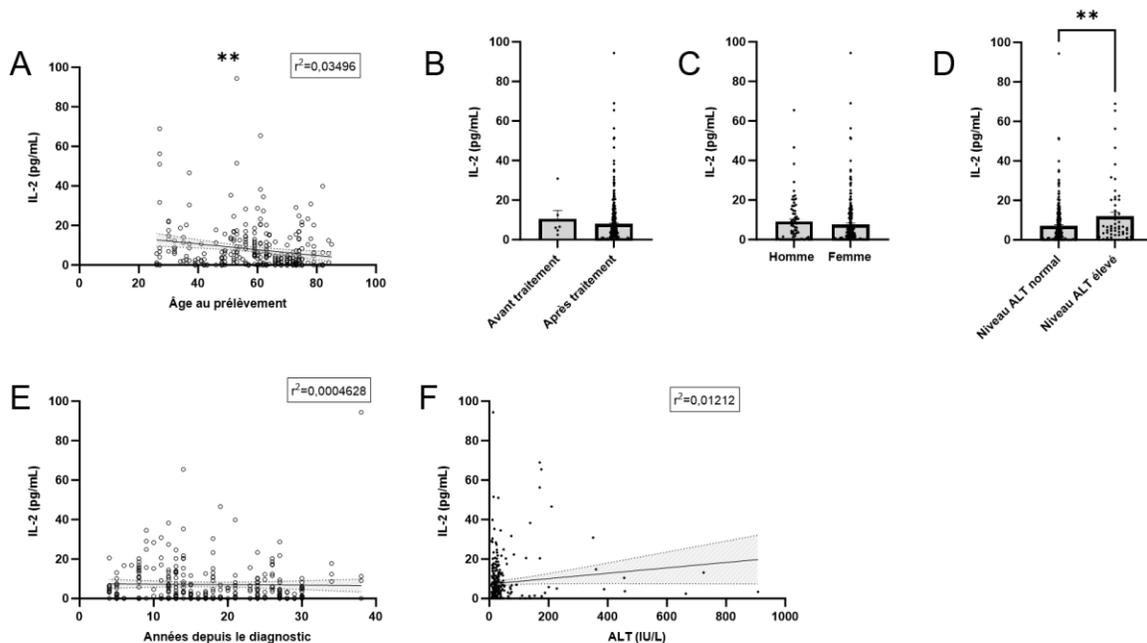


**Figure 22.** - Les patients HAI qui répondent au traitement ont des taux normaux de T<sub>REG</sub>. Les patients qui répondent au traitement ont des taux de T<sub>REG</sub> plus élevés après le traitement (n=6), similaires à ceux des témoins sains (n=5) par rapport aux patients avant traitement qui ont des taux

de T<sub>REG</sub> significativement plus faibles (n=3). Des exemples de FACS de patients sont présentés (\*p=0,05).

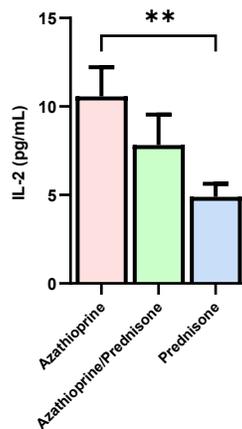
## IL-2

Tout d'abord, les niveaux plasmatiques d'IL-2 ont été évalués chez les patients HAI en fonction des différentes données cliniques suivantes : l'âge, le sexe, l'année du diagnostic et les niveaux d'ALT et le traitement. Dans la figure 23, il est possible d'observer qu'il y a une corrélation statistiquement significative entre les taux plasmatiques d'IL-2 et l'âge au prélèvement chez les patients HAI. Cependant, il ne semble pas y avoir de corrélation statistiquement significative entre les taux plasmatiques d'IL-2 et les années depuis le diagnostic et les niveaux d'ALT chez les patients HAI. Il est aussi possible d'observer que les taux plasmatiques d'IL-2 semblent être similaires entre les patients HAI avant et après traitement et entre les patients HAI de sexe masculin et féminin. Cependant, les patients HAI ayant des taux élevés d'ALT ont des taux plasmatiques d'IL-2 significativement plus élevés. La figure 24 nous permet d'observer que les patients HAI traités uniquement à la prednison ont des niveaux plasmatiques d'IL-2 significativement inférieurs que ceux traités uniquement à l'azathioprine.



**Figure 23.** – Évaluation des niveaux plasmatique d'IL-2 chez les patients HAI en fonction de l'âge, du sexe, de l'année du diagnostic et des niveaux d'ALT

(A) Les taux plasmatiques d'IL-2 semblent corrélés avec l'âge du patient HAI au moment du prélèvement. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=302, \*\*p=0,0011). (B) Les patients HAI avant et après traitement semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-2 similaires. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avant (n=6) et après traitement (n=296) (p=0,5816). (C) Les taux plasmatiques d'IL-2 chez les patients HAI semblent être similaires entre les hommes et les femmes. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI de sexe masculin (n=69) et féminin (n=233) (p=0,3549). (D) Les patients HAI avec des taux d'ALT élevés (supérieur ou égal à 40 UI/L) semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-2 plus élevés que ceux avec des taux d'ALT normaux (inférieur à 40 UI/L). Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI avec des taux d'ALT normaux (< 40 UI/L) (n=236) et chez des patients HAI avec des taux d'ALT anormaux ( $\geq$  40 UI/L) (n=57) (\*\*p=0,0049). (E) Les taux plasmatiques d'IL-2 ne semblent pas corrélés avec les années depuis le diagnostic chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=286, p=0,7172). (F) Les taux plasmatiques d'IL-2 ne semblent pas corrélés avec les taux d'ALT chez les patients HAI. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont été mesurés par ELISA chez des patients HAI (n=293, p=0,0598).



**Figure 24.** – Les patients HAI traités à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-2 nettement inférieurs

Les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des taux plasmatiques d'IL-2 significativement plus faibles que ceux qui sont traités uniquement à l'azathioprine. Les taux plasmatiques d'IL-2 ont

été mesurés par ELISA chez des patients HAI traités à l'azathioprine seulement (n=91), à la prednisone seulement (n=78) et traités à l'azathioprine et la prednisone (n=28) (\*\*p=0,0071).

## Analyse PCA

L'analyse PCA est une analyse statistique qui permet d'analyser de grands ensembles de données ayant un nombre élevé de caractéristiques par observation. Cela permet d'interpréter les données tout en préservant un maximum d'informations. Dans notre cas, pour chacun des prélèvements de notre biobanque, nous avons une multitude de données cliniques et de laboratoires, il est donc important de réduire la dimensionnalité de cet ensemble de données dans le but d'effectuer des analyses statistiques. Dans notre cas, nous avons une variable d'intérêt soit les niveaux d'ALT (IU/L). Nous avons choisi cette variable puisque nous voulons identifier les données qui expliquent le mieux la variance de notre variable d'intérêt. C'est-à-dire que nous voulons identifier les données de laboratoire parmi tant d'autres dans notre biobanque qui peuvent expliquer le mieux la variance des ALT. Pour chacune des données de laboratoire, nous obtenons un score. Un score près de 0 signifie que cette donnée ne contribue pas à la variance de notre variable d'intérêt. Un score négatif signifie qu'il y a une relation inverse entre cette donnée et notre variable d'intérêt. Un score positif signifie qu'il y a une relation positive entre cette donnée et notre variable d'intérêt. Pour la première analyse PCA représentée dans le tableau V, nous avons utilisé les données de laboratoire suivantes : les niveaux de plusieurs sous-populations de lymphocytes T effecteurs, les niveaux circulants des cytokines IL-16, IL-10 et IL-2 et l'expression des cytokines IL-16, IL-10 et IL-2. Il est possible d'observer que les niveaux de lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup> et de lymphocytes T CD8 semblent expliquer le mieux la variance des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Cependant, sachant que parmi les lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup>, il y a possiblement des T<sub>REG</sub> CXCR3<sup>+</sup>, une deuxième analyse a été effectuée. Pour la deuxième analyse PCA représentée dans le tableau VI, nous avons utilisé les données de laboratoires suivantes : les niveaux de plusieurs sous-populations de lymphocytes T régulateurs, les niveaux circulants des cytokines IL-16, IL-10 et IL-2 et l'expression des cytokines IL-16, IL-10 et IL-2. Il est possible d'observer que les T<sub>REG</sub> semblent expliquer le mieux la variance des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Les niveaux de plusieurs sous-populations de lymphocytes T effecteurs et régulateurs ont été mesurés par cytométrie en flux, les niveaux circulants des cytokines ont été

mesurés par ELISA et l'expression des cytokines a été mesurée par qPCR chez des patients HAI (n=40).

**Tableau 5.** Analyse PCA en fonction des niveaux de sous-populations de lymphocytes T effecteurs

Donnée de laboratoire	SCORE
CD4	-0,839932873
CD8 naïf	-0,764036905
CD4 naïf	-0,592164968
T CD8 CXCR3 <sup>+</sup>	-0,33338101
IL-2 (pg/mL)	-0,328857382
T CD4 centraux mémoires	-0,264497251
IL-16 (pg/mL)	-0,2458808
IL-16 (Fold)	-0,223661594
IL-10 (Fold)	-0,167973205
T CD8 centraux mémoires	-0,160383481
NK CD16 dim	-0,117117381
IL-10 (pg/mL)	-0,105355076
IL-2 (Fold)	0,085874918
NK	0,115742139
NK CD16 bright	0,116662063
CD8 ACTIF	0,148299319
Lymphocytes NKT	0,190147236
T CD8 effecteurs mémoires	0,314676504
CD4 TEMRA	0,45279674
CD4 ACTIF	0,470608224
CD8 TEMRA	0,616451108
T CD4 effecteurs mémoires	0,624525793
CD8	0,804696222
T CD4 CXCR3 <sup>+</sup>	0,809918497

**Tableau 6.** Analyse PCA en fonction des niveaux de sous-populations de lymphocytes T régulateurs

Données de laboratoire	SCORE
IL-2 (Fold)	-0,45486536
T <sub>REG</sub> CXCR3 <sup>+</sup>	-0,050118096
IL-16 (Fold)	0,218079277
IL-10 (Fold)	0,245444034
IL-10 (pg/mL)	0,472736587
IL-16 (pg/mL)	0,617417119
T <sub>REG</sub> CD39 <sup>+</sup>	0,668272133
IL-2 (pg/mL)	0,695812189
T <sub>REG</sub> (FOXP3 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> CD127 <sup>low</sup> )	0,803291573

## Chapitre 6 – Discussion générale

Le but de ce projet est d'identifier des biomarqueurs de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI. L'hypothèse de cette étude est que la rémission clinique et une réponse favorable au traitement chez les patients HAI sont influencées par des cellules et/ou cytokines qui, lorsqu'identifiées, pourront être utilisées pour évaluer la réponse au traitement et l'activité de la maladie. Sachant que l'IL-16 pourrait être impliquée dans le recrutement et l'activation des cellules T CD4 via son pouvoir chimioattractant, nous avons émis l'hypothèse que la production d'IL-16 induirait le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD4 autoréactifs au sein du foie et serait liée à la progression de la maladie. Ensuite, sachant que l'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire et que les T<sub>REG</sub> sont spécialisées dans la suppression des réponses immunitaires, nous avons émis l'hypothèse qu'un retour à la normale des niveaux de T<sub>REG</sub> et une production d'IL-10 seraient liés à une réponse favorable au traitement immunosuppresseur. De plus, sachant que l'IL-2 est essentielle pour la survie et la différenciation des T<sub>REG</sub> et qu'il semble y avoir une altération de la fonction suppressive des T<sub>REG</sub> chez les patients HAI, nous avons émis l'hypothèse que la production d'IL-2 par les cellules T activées à la suite d'une réponse favorable au traitement favoriserait plutôt la survie des T<sub>REG</sub> et permettrait à ces cellules de regagner leurs fonctions. Ainsi, en supposant que les cytokines IL-2 et IL-10 seraient plutôt liées à la rémission et à l'inversement du processus inflammatoire alors que l'IL-16 favoriserait plutôt l'inflammation hépatique, il est possible de supposer que ces cytokines pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'évaluation de la réponse au traitement et de l'activité de la maladie.

En résumé, l'expression d'IL-10 par les PBMCs est augmentée de manière significative après le traitement ( $13,64 \pm 2,84$  Fold vs.  $3,36 \pm 3,1$ ,  $n=9$ ,  $*p=0,017$ ) tandis que les taux plasmatiques d'IL-16 ont diminué ( $542,3 \pm 107,2$  vs.  $338,7 \pm 22,7$  pg/mL,  $n=114$ ,  $**p=0,0099$ ). Les patients ayant des taux d'ALT élevés ( $>40$  UI/L) ont des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés ( $393,7 \pm 14,64$  vs.  $465,1 \pm 32,94$ ,  $n=243$ ,  $*p=0,0359$ ) qui corrént avec les taux de cellules T CD4 activées, mais pas avec les taux de cellules T CD8 activées ( $r^2=0,2720$ ,  $n=20$ ,  $*p=0,0184$ ). Les patients qui répondent au traitement ont des taux de T<sub>REG</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>)

normaux après le traitement ( $5,38\pm 0,42\%$ ,  $n=6$ ), similaires à ceux des témoins sains ( $4,93\pm 0,55\%$ ,  $n=5$ ), comparé aux patients avant traitement ( $4,06\pm 0,24\%$ ,  $n=3$ ,  $*p=0,038$ ) et ces taux corrélerent avec l'expression de l'IL-10 ( $r^2=0,6484$ ,  $n=9$ ,  $**p=0,0088$ ) et les taux plasmatiques d'IL-16 ( $r^2=0,1658$ ,  $n=44$ ,  $**p=0,0061$ ). Il est aussi intéressant de noter que les taux plasmatiques d'IL-2 corrélerent avec les taux plasmatiques d'IL-16 ( $r^2=0,1475$ ,  $n=302$ ,  $***p<0,0001$ ). Une analyse PCA a démontré que les niveaux de lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup>, CD8 et T<sub>REG</sub> sont responsables de la majeure partie de la variance des niveaux d'ALT ( $n=40$ ). *In vitro*, l'IL-16 favorise la migration des lymphocytes T CD4, mais pas des lymphocytes T CD8. De plus, des taux plasmatiques élevés d'IL-16 ont été associés à une augmentation de la migration des lymphocytes T CD4 ( $r^2=0,7977$ ,  $n=9$ ,  $**p=0,0012$ ). Il est aussi intéressant de noter que les patients traités uniquement à la prednisone ( $n=78$ ) avaient des taux d'IL-16 et d'IL-2 significativement plus faibles que ceux traités uniquement à l'azathioprine ( $n=91$ ) ( $*p=0,0304$  et  $**p=0,0071$ , respectivement). Ces résultats suggèrent que l'expression d'IL-10 et les niveaux circulants d'IL-16 et de sous-populations de lymphocytes T CD4 et T<sub>REG</sub> pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI.

Les retombées de cette étude se mesurent par une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires associés au développement de l'HAI, des mécanismes qui restent, jusqu'à ce jour, inconnus. De plus, l'identification de biomarqueurs fiables associés à l'activité de la maladie, la réponse au traitement ou à la rémission de l'HAI serait une étape importante dans la prise en charge clinique des patients HAI. En effet, ces biomarqueurs permettraient d'évaluer l'efficacité des traitements à contrôler l'inflammation hépatique ainsi que de prédire les poussées d'activité de la maladie.

## **IL-16**

L'IL-16 est un chimioattractant des lymphocytes T CD4 qui favorise les réponses de type Th1 et induit la prolifération et l'expansion non-clonale dépendante de l'IL-2 des lymphocytes T CD4. Cette cytokine, liée aux lymphocytes T CD4, semble être modulée chez les patients HAI. Ces niveaux plasmatiques sont significativement plus faibles après le traitement et significativement plus élevés chez les patients avec des niveaux élevés d'ALT. Aussi, les patients ayant une

expression hépatique élevée d'IL-16 semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés. Ensuite, la corrélation observée entre l'IL-16 et les lymphocytes T CD4 activés suggère que l'IL-16 pourrait être impliquée dans la réponse auto-immune des lymphocytes T contre le foie chez ces patients. De plus, la corrélation observée entre l'IL-16, l'IL-2 et les niveaux circulants de T<sub>REG</sub> suggère que ces cytokines pourraient avoir des effets synergiques sur les T<sub>REG</sub> chez ces patients. Finalement, *in vitro*, l'IL-16 induit préférentiellement la migration cellulaire des lymphocytes T CD4 et leur sensibilité à l'IL-16 dépend des niveaux circulants d'IL-16 de chacun des patients.

Tout d'abord, la figure 9 démontre que les niveaux plasmatiques d'IL-16 ne corrélaient pas de manière significative avec l'âge au prélèvement et les années depuis le diagnostic ( $r^2=0,01226$ ,  $n=303$ ,  $p=0,0518$  et  $r^2=0,005408$ ,  $n=286$ ,  $p=0,8626$ , respectivement). Cela suggère que les niveaux plasmatiques d'IL-16 seraient indépendants de ces facteurs chez les patients HAI. Cependant, il est tout de même important de noter une légère diminution des niveaux plasmatiques d'IL-16 dans le temps. Cela pourrait être expliqué par le vieillissement du système immunitaire qui est caractérisé par une diminution de son efficacité (60). Par contre, aujourd'hui, nous savons que le vieillissement du système immunitaire est associé au «inflammaging», un phénomène caractérisé par une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (60). Il y a donc une plus grande quantité de cytokines pro-inflammatoires en circulation (61). En nous basant sur ces informations, nous devrions plutôt observer une augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-16, une cytokine pro-inflammatoire, dans le temps, mais ce n'est pas le cas. Il est donc possible de supposer que puisque les patients HAI sont traités par des immunosuppresseurs, diminuant donc la production de cytokines pro-inflammatoires, on observe plutôt une stabilisation des niveaux plasmatiques de l'IL-16 avec l'âge. Ensuite, cette figure démontre que les niveaux plasmatiques d'IL-16 semblent être similaires entre les patients HAI de sexe masculin et féminin. En effet, il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $404,2\pm 26,95$  vs.  $409,8\pm 15,21$  pg/mL,  $n=234$ ,  $p=0,8626$ ). Cela suggère que les niveaux plasmatiques de l'IL-16 seraient indépendants du sexe chez les patients HAI. Il est tout de même possible d'observer des niveaux plasmatiques d'IL-16 légèrement plus élevés chez les femmes. Cela peut être expliqué par le fait que les femmes développent des réponses immunitaires plus fortes que les hommes. Il a été démontré, chez des patients sains, que les réponses pro-inflammatoires des femmes sont plus importantes que celles

des hommes (62). En effet, les niveaux plasmatiques de cytokines pro-inflammatoires semblent être plus élevés chez les femmes que chez les hommes (62).

Ensuite, la figure 10 démontre que les patients HAI semblent avoir des taux circulants d'IL-16 significativement plus faibles après le traitement ( $542,3 \pm 107,2$  vs.  $338,7 \pm 22,7$  pg/mL,  $n=114$ ,  $**p=0,0099$ ) et la figure 11 démontre que les patients HAI avec des taux élevés d'ALT semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 significativement plus élevés ( $393,7 \pm 14,64$  vs.  $465,1 \pm 32,94$ ,  $n=243$ ,  $*p=0,0359$ ). Ces résultats suggèrent que l'IL-16 pourrait être indicatrice de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients HAI. En effet, plus l'activité de la maladie est importante, plus il y a de dommages au sein du foie et plus les niveaux d'ALT sont élevés ( $\geq 40$  UI/L). D'après les résultats obtenus, cela semble être aussi le cas avec les niveaux circulants d'IL-16 chez les patients HAI. Aussi, la rémission, chez les patients qui répondent favorablement au traitement, est caractérisée par une normalisation des niveaux d'ALT ( $< 40$  UI/L) causée par une diminution de l'activité de la maladie. Encore une fois, d'après les résultats obtenus, cela semble être aussi le cas avec les niveaux circulants d'IL-16 chez les patients HAI. Il est possible de suggérer qu'une activité importante de l'HAI serait caractérisée par des niveaux circulants élevés d'IL-16 et qu'une réponse favorable au traitement serait caractérisée par une diminution des niveaux circulants d'IL-16. Ainsi, les cliniciens pourraient donc évaluer l'activité de la maladie et prédire la réponse au traitement à l'aide de l'IL-16 avant même que les niveaux d'ALT augmentent et que les dommages au foie deviennent trop importants. Cependant, avant d'émettre toute conclusion à ce sujet, il serait important d'évaluer le pouvoir prédictif des niveaux d'ALT de l'IL-16. Afin d'évaluer cela, nous pourrions effectuer une étude longitudinale sur des patients HAI pour lesquels nous avons de multiples prélèvements. Ainsi, nous pourrions déterminer si les niveaux d'IL-16 augmentent bien avant que les niveaux d'ALT soient trop élevés et que l'activité de la maladie soit trop importante. L'IL-16 ne semble pas seulement être liée à l'activité de l'HAI. En effet, une étude effectuée chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé a démontré que des niveaux plasmatiques élevés d'IL-16 étaient associés avec la sévérité de la maladie (63). Cependant, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, l'IL-16 jouerait plutôt un rôle régulateur que pro-inflammatoire (64). Nous ne pouvons donc pas conclure que

l'IL-16 serait une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'activité de l'HAI à cause de ces résultats contradictoires. Des études supplémentaires sont donc nécessaires.

Par la suite, la figure 12 démontre que les patients HAI traités à la prednisone seulement semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 nettement inférieurs que ceux traités à l'azathioprine seulement ( $325,8 \pm 19,52$  vs.  $411,2 \pm 24,70$  pg/mL,  $n=91$ ,  $*p=0,0304$ ). Cela peut être expliqué par le fait que la prednisone induit directement l'inhibition de l'expression gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. De son côté, l'azathioprine induirait une inhibition des cytokines pro-inflammatoires de manière indirecte en affectant la prolifération des cellules productrices de celles-ci. Il est donc possible de suggérer que l'effet de l'azathioprine sur la production de cytokines pro-inflammatoires serait observé beaucoup plus tard que la prednisone. En effet, une étude effectuée chez des patients souffrants d'érythème noueux lépreux traités à la prednisone a démontré que l'expression de cytokines pro-inflammatoires est significativement réduite après le traitement (65). De plus, une autre étude démontre que les effets de l'azathioprine sur la production de cytokines pro-inflammatoires seraient retardés puisqu'ils seraient médiés par l'intermédiaire d'IL-10 (66). Nous suggérons donc que la diminution de production d'IL-16 par l'azathioprine est moins flagrante que la prednisone pour cette raison chez les patients HAI. En se basant sur ses informations, l'effet combiné de l'azathioprine et de la prednisone induirait une diminution plus importante de la production d'IL-16. Cependant, ce n'est pas ce qui est observé. En effet, on observe plutôt que les patients HAI traités à l'azathioprine et à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-16 légèrement plus élevés que les patients HAI traités uniquement à la prednisone ou à l'azathioprine. Cela peut être expliqué par le fait que la combinaison de l'azathioprine et de la prednisone est le traitement de première ligne offert chez les patients HAI récemment diagnostiqués qui ont des niveaux d'ALT élevés. Autrement dit, plus l'activité de la maladie est importante plus cela se reflétera par des niveaux plasmatiques élevés d'IL-16 comme discuté précédemment. Cependant, avant de tirer quelconque conclusion, il serait important d'étudier avec plus de précision cette proposition à l'aide des données cliniques provenant de notre biobanque comme les ALT et la date de diagnostic. Avec ces données, nous pourrions vérifier si, suite au diagnostic, les patients ont été majoritairement traités à l'azathioprine et à la prednisone et s'ils avaient des niveaux élevés d'ALT et d'IL-16 contrairement aux patients, qui

plusieurs années après leur diagnostic, sont traités uniquement à la prednisone ou à l'azathioprine.

La figure 13 démontre que les niveaux plasmatiques d'IL-16 semblent corrélérer avec les niveaux de lymphocytes T CD4 activés chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT ( $r^2=0,2720$ ,  $n=20$ ,  $*p=0,0184$ ). Cependant, la corrélation entre les niveaux plasmatiques d'IL-16 et les niveaux de lymphocytes T CD8 activés chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT n'est pas statistiquement significative ( $r^2=0,1488$ ,  $n=20$ ,  $p=0,0930$ ). Cela suggère que les cellules T CD4 activées, productrices d'IL-2, pourraient également être liées à la production d'IL-16. Ces résultats suggèrent aussi que l'IL-16 pourrait être impliquée dans la réponse auto-immune des lymphocytes T CD4 contre le foie chez les patients HAI. Cela suggère aussi que l'IL-16 pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la maladie via son lien avec les lymphocytes T CD4, mais pas avec les lymphocytes T CD8. Cependant, nous ne pouvons rien conclure à ce sujet avec les résultats obtenus. En effet, bien que la corrélation soit significative, le coefficient  $r^2$  est très faible soit de 0,2720. C'est-à-dire que dans seulement 27,20% des cas, le lien entre les niveaux circulants d'IL-16 et de lymphocytes T CD4 activés s'explique par la régression linéaire simple. Cela peut s'expliquer par le fait que plus le  $n$  augmente, plus il y a d'hétérogénéité au sein des patients, ce qui rend difficile l'obtention d'une valeur de  $r^2$  se rapprochant de 1. Les figures 14 et 15 démontrent que niveaux plasmatiques d'IL-16 semblent corrélérer avec les niveaux circulants de  $T_{REG}$  et d'IL-2 chez les patients HAI ( $r^2=0,1658$ ,  $n=44$ ,  $**p=0,0061$  et  $r^2=0,1475$ ,  $n=302$ ,  $****p<0,0001$ , respectivement). Cela suggère donc que l'IL-16 et l'IL-2 pourraient avoir des effets synergiques sur les  $T_{REG}$  en influençant leur survie, différenciation et expansion chez les patients HAI. En effet, une étude sur des PBMCs d'individus sains, démontre que l'IL-16 est nettement synergique avec l'IL-2 (67). Cette synergie a induit une augmentation de la prolifération et de la viabilité des lymphocytes T CD4 CD25<sup>+</sup> (67). Cependant, encore une fois, il est impossible de conclure cela chez les patients HAI puisque les coefficients  $r^2$  sont trop faibles. Il serait donc important de démontrer chez les patients HAI si l'IL-16 et l'IL-2 ont des effets synergiques sur les  $T_{REG}$ . L'évaluation des effets synergiques d'IL-16 et d'IL-2 sur la prolifération des  $T_{REG}$  chez les patients HAI pourrait être effectuée *in vitro* à l'aide de tests de prolifération au CFSE. Cela nous permettrait de confirmer s'il y a réellement un lien de causalité entre les niveaux circulants d'IL-

16 et d'IL-2 et les niveaux de T<sub>REG</sub> chez les patients HAI. Bref, d'après nos résultats, l'IL-16 semble être autant liée aux cellules TCD4 activées qu'aux T<sub>REG</sub>. L'IL-16 pourrait donc influencer l'activité de l'HAI en affectant à la fois les voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires chez les patients HAI dépendant de ces niveaux.

Il a été démontré que l'IL-16 induirait sélectivement le recrutement des lymphocytes T CD4 Th1 aux sites d'inflammation (68). Cependant, une étude démontre que l'IL-16 induirait plutôt sélectivement la migration de T<sub>REG</sub> aux sites d'inflammation (68). Il était donc important d'évaluer le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 envers les cellules T CD4 chez les patients HAI. La figure 16 démontre que, *in vitro*, l'IL-16 semble favoriser préférentiellement la migration des lymphocytes T CD4 des patients HAI. De plus, la migration des cellules T CD4 corrèle de manière significative avec les taux plasmatiques d'IL-16 de ces patients ( $r^2=0,6452$ ,  $n=13$ ,  $***p=0,0009$ ). Afin d'évaluer le pouvoir chimioattractant de l'IL-16, nous avons calculé un ratio CD4/CD8 et CD4 CD25<sup>+</sup>/CD4 CD25<sup>-</sup> à différentes concentrations d'IL-16. Ainsi, plus le ratio CD4/CD8 est élevé, plus le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 semble être important envers les lymphocytes T CD4. De même pour le ratio CD4 CD25<sup>+</sup>/CD4 CD25<sup>-</sup>, plus il est élevé, plus le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 semble être important envers les T<sub>REG</sub>. Nous observons dans la figure 16 qu'à partir d'une concentration d'IL-16 de 50ng/mL, le ratio CD4/CD8 est nettement augmenté par rapport à l'absence d'IL-16. De plus, le ratio CD4/CD8 semble être similaire entre les concentrations de 50ng/mL et 500ng/mL d'IL-16. 50ng/mL semble donc être la concentration optimale d'IL-16 induisant une migration des cellules T CD4 *in vitro* chez les patients HAI. Cela concorde avec deux études qui ont démontré qu'une concentration d'IL-16 à 50ng/mL induit une migration cellulaire maximale (68-69). Nous avons ensuite observé qu'il semble y avoir une corrélation statistiquement significative entre le ratio CD4/CD8 et les niveaux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI. Cela suggère que la sensibilité des lymphocytes T CD4 à l'IL-16 augmente en fonction des niveaux circulants d'IL-16 de chacun des patients. Il est important de noter que nous n'avons pas eu de résultats concluants concernant le pouvoir chimioattractant de l'IL-16 envers les T<sub>REG</sub>. Nos résultats diffèrent avec une étude *in vitro* qui démontre que l'IL-16 induirait plutôt de manière préférentielle la migration des T<sub>REG</sub> aux sites d'inflammation chez des individus sains (68). Cette contradiction peut être expliquée par le fait que la quantité de T<sub>REG</sub> parmi les PBMCs chez les patients HAI est très faible

comparé aux individus sains. Afin de remédier à cette situation, nous pourrions isoler les lymphocytes T des PBMCs fraîchement obtenus de patients HAI à l'aide d'un kit d'isolement. De plus, juste avant les essais de chimiotaxie, nous pourrions purifier les cellules T CD4 à l'aide d'un kit d'isolement par billes magnétiques (68). Ainsi, il sera beaucoup plus facile d'évaluer la migration des quelques cellules T<sub>REG</sub> au sein d'une population de cellules T CD4 que parmi autant de PBMCs.

La figure 17 démontre que les patients atteints d'HAI avec une expression hépatique élevée d'IL-16 semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés (609,3±128,7 vs. 361±62,65 pg/mL, n=4, p=0,1158). Cependant, ce résultat n'est pas statistiquement significatif. Cela peut être expliqué par le fait que les ELISA et les qPCR ne sont pas des méthodes comparables puisque nous comparons l'expression d'ARN d'IL-16 avec sa quantité en pg/mL. De plus, l'expression d'ARN ne représente que le potentiel de sécrétion d'IL-16. Ce résultat non significatif peut aussi être expliqué par le fait que nous avons un petit n. Il faudrait donc démontrer si ce qu'on observe en périphérie représente la situation dans le foie à l'aide d'une autre méthode et avec un plus grand nombre d'échantillons. Il serait donc intéressant d'effectuer un marquage intracellulaire de l'IL-16 des lymphocytes et des hépatocytes dans le foie. Cependant, il est tout de même possible de suggérer que les patients atteints d'HAI ayant une expression hépatique élevée d'IL-16 ont tendance à avoir des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés.

Bref, les résultats obtenus soutiennent l'hypothèse que la production d'IL-16 induirait le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD4 autoréactifs et serait liée à la progression de la maladie chez les patients HAI. Cependant, ces résultats semblent contredire l'hypothèse que l'IL-16 favoriserait l'inflammation hépatique en affectant les voies pro-inflammatoires puisque les résultats démontrent aussi que l'IL-16 pourrait affecter les voies anti-inflammatoires chez les patients HAI.

## **IL-10**

L'IL-10, cytokine anti-inflammatoire, est sécrétée par les T<sub>REG</sub> et favorise la survie et les fonctions suppressives des celles-ci. Cette cytokine, liée aux lymphocytes T CD4, semble être aussi modulée chez les patients HAI. L'expression d'IL-10 par les PBMCs est augmentée de manière significative

chez les patients HAI après le traitement. Ces mêmes patients qui répondent au traitement ont des taux de T<sub>REG</sub> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) normaux après le traitement, similaires à ceux des témoins sains, comparé aux patients avant traitement et ces taux corrélerent avec l'expression de l'IL-10.

Tout d'abord, la figure 18 démontre que les niveaux plasmatiques d'IL-10 ne corrélerent pas de manière significative avec l'âge au prélèvement et les années depuis le diagnostic ( $r^2=0,009444$ ,  $n=303$ ,  $p=0,1028$  et  $r^2=0,002658$ ,  $n=262$ ,  $p=0,4059$ , respectivement). Cela suggère que les niveaux plasmatiques d'IL-10 sont indépendants de ces facteurs chez les patients HAI. De plus, il est possible d'observer que les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des niveaux plasmatiques d'IL-10 plus élevés que les patients traités uniquement à l'azathioprine ( $12,76\pm 1,302$  vs.  $9,460\pm 0,6083$  pg/mL,  $n=81$ ,  $*p=0,0465$ ). Ces résultats concordent avec une étude qui démontre qu'il y a une augmentation des taux plasmatiques d'IL-10 chez des patients traités par des glucocorticoïdes (70). Aussi, il ne semble pas y avoir de différence significative entre les niveaux plasmatiques d'IL-10 chez les patients HAI avant et après traitement ( $14,14\pm 3,157$  vs.  $11,15\pm 0,6124$  pg/mL,  $n=207$ ,  $p=0,4521$ ). De plus, les niveaux plasmatiques d'IL-10 ne semblent pas dépendre du sexe chez les patients HAI ( $11,59\pm 1,063$  vs.  $10,70\pm 0,5831$  pg/mL,  $n=221$ ,  $p=0,4731$ ). Cela suggère que les niveaux plasmatiques d'IL-10 seraient indépendants du sexe et ne pourrait pas être indicateurs de la réponse au traitement chez les patients HAI. Cependant, l'IL-10 pourrait être indicatrice de l'activité de la maladie chez les patients HAI. En effet, la figure 18 démontre que les niveaux plasmatiques de l'IL-10 semblent être légèrement plus élevés chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT que chez les patients HAI qui ont des niveaux normaux d'ALT ( $12,98\pm 1,330$  vs.  $10,43\pm 0,5618$  pg/mL,  $n=223$ ,  $p=0,0556$ ). De plus, la figure 20 démontre que les taux plasmatiques d'IL-10 corrélerent avec les taux d'ALT chez les patients HAI ( $r^2=0,08495$ ,  $n=292$ ,  $***p<0,0001$ ). Normalement, nous divisons les patients HAI en deux groupes selon leurs niveaux d'ALT (inférieur à 40 IU/L pour niveau normal d'ALT et supérieur ou égal à 40 IU/L pour niveau élevé d'ALT). Cependant, certaines études démontrent plutôt qu'une poussée de l'activité de l'HAI se caractérise par des niveaux d'ALT supérieur de 5 à 10 fois la limite supérieure normale (71). Nous nous retrouvons donc à environ 50 IU/L. De plus, certaines études considèrent que des niveaux d'ALT entre 10 à 15 IU/L sont considérés bas (72). Nous avons

donc utilisé les groupes suivants afin de mieux observer la corrélation entre les taux plasmatiques d'IL-10 et les taux d'ALT chez les patients HAI : ALT [15-50] et ALT > 50. Nous avons observé que les taux plasmatiques d'IL-10 corrélaient avec des taux d'ALT entre 15 à 50 IU/L et des taux d'ALT supérieurs à 50 IU/L chez les patients atteints d'HAI. Cette corrélation est de plus en plus significative plus les niveaux d'ALT sont élevés. C'est-à-dire que la sécrétion d'IL-10 semble augmenter plus l'inflammation dans le foie augmente. Ces résultats contredisent l'hypothèse émise que la production d'IL-10 serait liée à la rémission et à l'inversion du processus inflammatoire. Des recherches supplémentaires sont donc nécessaires pour expliquer cette corrélation. Cependant, il est tout de même important de noter que ces résultats concordent avec la littérature. En effet, des niveaux circulants élevés d'IL-10 et/ou une expression élevée d'IL-10 par les PBMCs corrélaient avec l'activité de la maladie dans plusieurs maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux disséminé, le syndrome de Sjögren, la maladie de Graves, la myasthénie grave, le psoriasis et le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (73).

Ensuite, la figure 19 démontre les patients HAI qui répondent au traitement expriment plus d'IL-10. Avant l'initiation du traitement, l'expression de l'IL-10 par les PBMCs des patients HAI est similaire à celle des témoins sains alors qu'après initiation et réponse au traitement, l'expression de l'IL-10 par les PBMCs est significativement augmentée ( $13,64 \pm 2,84$  Fold vs.  $3,36 \pm 3,1$ ,  $n=9$ ,  $*p=0,017$ ). De plus, comme démontré dans la figure 21, l'expression d'IL-10 par les PBMCs chez ces mêmes patients HAI avant et après le traitement corrélaient avec les taux de  $T_{REG}$  ( $r^2=0,6484$ ,  $n=9$ ,  $**p=0,0088$ ). Ces résultats suggèrent qu'une production accrue d'IL-10 et une augmentation des taux de  $T_{REG}$  seraient liées à une réponse favorable au traitement chez les patients HAI. Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse émise que la production d'IL-10 serait liée à la rémission et à l'inversion du processus inflammatoire. Cependant, à cause des résultats contradictoires que nous avons obtenus pour l'IL-10, il est impossible de conclure si l'IL-10 est liée à la rémission ou à l'activité de la maladie chez les patients HAI. Il est aussi important de noter qu'il y a des contradictions sur le rôle de l'IL-10 dans les maladies auto-immunes dans la littérature. Contrairement à ce qui a été mentionné précédemment, certaines études démontrent plutôt que la production d'IL-10 jouerait un rôle protecteur dans les maladies auto-immunes et que son administration pourrait entraîner une amélioration de la maladie (73). Des recherches

supplémentaires sur le rôle de l'IL-10 dans la pathogenèse de l'HAI sont donc nécessaires. Celles-ci devraient être effectuées avec un plus grand nombre de patients afin de pouvoir tirer de meilleures conclusions.

La figure 22 démontre que ces mêmes patients qui répondent au traitement ont des taux de T<sub>REG</sub> normaux après le traitement ( $5,38\pm 0,42\%$ , n=6) comparé aux patients avant traitement ( $4,06\pm 0,24\%$ , n=3, \*p=0,038). C'est-à-dire que lorsqu'un patient répond au traitement, ces niveaux de T<sub>REG</sub> semblent revenir à la normale puisqu'ils sont similaires à ceux des témoins sains ( $4,93\pm 0,55\%$ , n=5). Ces résultats suggèrent qu'un retour à la normale des niveaux de T<sub>REG</sub> serait lié à une réponse favorable au traitement chez les patients HAI. Cependant, il serait important d'effectuer la même analyse, mais avec un plus grand n avant de tirer quelque conclusion. Ces résultats concordent avec les études qui suggèrent que chez les patients HAI, il y a une diminution de la fréquence des T<sub>REG</sub> conduisant au développement d'une réponse immunitaire excessive envers le foie.

Bref, les résultats obtenus supportent l'hypothèse qu'un retour à la normale des niveaux de T<sub>REG</sub> et une production d'IL-10 seraient liés à une réponse favorable au traitement chez les patients HAI. Cependant, avant d'émettre quelque conclusion, il serait important d'effectuer les mêmes analyses sur un plus grand nombre de patients ainsi que d'évaluer le rôle de l'IL-10 dans la pathogenèse de la maladie à cause des contradictions observées dans nos résultats.

## **IL-2**

L'IL-2, une cytokine produite par les lymphocytes T CD4 et CD8 activés, induit la différenciation et la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8. Cette cytokine joue un rôle important dans la génération, la différenciation et le maintien des cellules T régulatrices. Cette cytokine, liée aux lymphocytes T CD4, semblait être aussi modulée chez les patients HAI. Comme observé précédemment, les niveaux plasmatiques d'IL-2 semblent corrélés avec les niveaux plasmatiques d'IL-16 chez les patients HAI. De plus, comme l'IL-16, les patients HAI traités à la prednisone seulement semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-2 nettement inférieurs que ceux traités à l'azathioprine seulement.

Tout d'abord, la figure 23 démontre que les niveaux plasmatiques d'IL-2 corrèlent de manière significative avec l'âge ( $r^2=0,03496$ ,  $n=302$ ,  $**p=0,0011$ ). En effet, les niveaux plasmatiques d'IL-2 diminuent avec l'âge chez les patients HAI. Cela semble concorder avec la littérature qui démontre que l'expression et la production d'IL-2 diminuent avec l'âge (74). Cependant, il est important de noter qu'il y a beaucoup d'études contradictoires à ce sujet (75). En effet, les stimuli utilisés et les techniques employées pour mesurer les cytokines ne sont pas toujours les mêmes (75). Il est tout de même possible d'observer qu'il y a une diminution de l'IL-2 avec l'âge chez les patients HAI. On observe aussi qu'il ne semble pas y avoir de corrélation entre les niveaux plasmatiques d'IL-2 et les années depuis le diagnostic ( $r^2=0,0004628$ ,  $n=286$ ,  $p=0,7172$ ). Il ne semble pas y avoir de différence entre les niveaux plasmatiques d'IL-2 chez les femmes et chez les hommes atteints d'HAI ( $7,555\pm 0,7666$  vs.  $9,045\pm 1,426$ ,  $n=69$ ,  $p=0,3549$ ). Les taux plasmatiques d'IL-2 sont donc indépendants des années depuis le diagnostic et du sexe chez les patients HAI. La figure 23 démontre aussi que les patients HAI avec des taux élevés d'ALT semblent avoir des taux plasmatiques d'IL-2 significativement plus élevés ( $7,020\pm 0,6780$  vs.  $11,92\pm 2,123$ ,  $n=57$ ,  $**p=0,0049$ ). Ces résultats suggèrent que l'IL-2 pourrait être indicatrice de l'activité de la maladie tout comme l'IL-16. Il serait donc important de faire une étude longitudinale sur des patients HAI pour lesquels nous avons de multiples prélèvements afin de déterminer le pouvoir prédictif des niveaux d'ALT de l'IL-2. L'IL-2 ne semble pas seulement être liée à l'activité de l'HAI. En effet, des études effectuées chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé et de polyarthrite rhumatoïde ont démontré une corrélation entre les niveaux plasmatiques d'IL-2 et l'activité de la maladie (76-77). Il est donc possible de suggérer qu'une activité importante de l'HAI serait caractérisée par des niveaux circulants élevés d'IL-2. Ensuite, une diminution des niveaux circulants d'IL-2 ne semble pas être liée à une réponse favorable au traitement. En effet, la figure 23 démontre que les patients HAI semblent avoir des taux circulants d'IL-2 légèrement plus faibles après le traitement ( $10,51\pm 4,292$  vs.  $7,842\pm 0,6839$ ,  $n=296$ ,  $p=0,5816$ ), mais ce résultat n'est pas significatif. Chez les enfants atteints d'HAI, une étude démontre que des niveaux inférieurs d'IL-2 pourraient indiquer une réponse incomplète au traitement (78). Aussi, des études démontrent que les patients HAI semblent avoir des niveaux plasmatiques plus faibles d'IL-2 et que l'administration d'IL-2 pourrait stimuler ou restaurer la

fonction des T<sub>REG</sub> chez les patients HAI (79). Sachant que l'IL-2 est autant une cytokine pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire, nous supposons qu'une augmentation des niveaux d'IL-2 pourrait autant être liée à la sévérité de la maladie qu'à une réponse favorable au traitement chez les patients HAI. Cette augmentation pourrait être liée à la sévérité de la maladie lorsque la production d'IL-2 par les cellules T activées autoréactives est augmentée et que les T<sub>REG</sub> ne répondent pas à l'IL-2. Cette augmentation pourrait aussi être liée à une réponse favorable en permettant aux T<sub>REG</sub> de regagner leurs fonctions. Il serait important d'effectuer des études supplémentaires afin de déterminer si l'IL-2 pourrait être utilisé comme indicateur clinique de l'évaluation de l'activité de la maladie ou de la réponse au traitement chez les patients HAI. Il est important de mentionner qu'il y a une différence significative entre les niveaux plasmatiques d'IL-2 chez les patients ayant des niveaux élevés et normaux d'ALT, mais il n'y a pas de corrélation entre les niveaux plasmatiques d'IL-2 et les niveaux d'ALT ( $r^2=0,01212$ ,  $n=293$ ,  $p=0,0598$ ). Cela signifie que les taux plasmatiques d'IL-2 et d'ALT n'évoluent pas ensemble de manière linéaire, alors que, la différence entre les moyennes des niveaux plasmatiques d'IL-2 chez les patients HAI ayant des niveaux élevés et normaux d'ALT est suffisamment importante.

Ensuite, la figure 24 démontre que les patients HAI traités uniquement à la prednisone ont des taux plasmatiques d'IL-2 significativement plus faibles que ceux qui sont traités uniquement à l'azathioprine ( $4,898\pm 0,7348$  vs.  $10,56\pm 1,658$ ,  $n=91$ ,  $**p=0,0071$ ). Cela semble concorder avec une étude qui démontre que les corticostéroïdes interfèrent avec la liaison de l'IL-2 à son récepteur, la réponse des cellules cibles à l'IL-2 et la production d'IL-2 par les cellules T et les PBMCs (80).

Bref, il est possible d'infirmer l'hypothèse que la production d'IL-2 par les cellules T activées à la suite d'une réponse favorable au traitement favoriserait plutôt la survie des T<sub>REG</sub> et permettrait à ces cellules de regagner leurs fonctions chez les patients HAI. En effet, il est impossible de conclure cela avec les résultats contradictoires obtenus. L'IL-2 pourrait autant être liée à une réponse favorable au traitement qu'à l'activité de la maladie d'après nos résultats.

## Analyse PCA

L'analyse PCA démontre que les niveaux de lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup>, T CD8 et T<sub>REG</sub> semblent expliquer le mieux la variance des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Dans le tableau V, il est possible d'observer un score de 0,8047 pour les lymphocytes T CD8 et de 0,8099 pour les lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup>. Il y a donc une relation positive entre les lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup> et T CD8 et les niveaux d'ALT (IU/L). CXCR3 est fortement exprimé par les cellules T CD4 Th1 et CD8 et joue un rôle dans la migration des cellules T CD4 Th1 et CD8 vers les sites d'inflammation de type Th1 (55). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation du trafic des lymphocytes T CD4 au sein du foie et des niveaux de lymphocytes T CD8 serait liée à une augmentation de l'activité de la maladie chez les patients HAI. Il est aussi possible d'observer un score de 0,6165 pour les lymphocytes T CD8 TEMRA et un score de 0,6245 pour les lymphocytes T CD4 effecteurs mémoires. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T mémoires seraient aussi liés à l'activité de la maladie chez les patients HAI. Il est aussi possible d'observer un score de -0,8399 pour les lymphocytes T CD4, de -0,7640 pour les lymphocytes T CD8 naïfs et de -0,592164968 pour les lymphocytes T CD4 naïfs. Il y a donc une relation négative entre les niveaux de lymphocytes T CD4, CD8 naïfs et CD4 naïfs et les niveaux d'ALT (IU/L). Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules T naïves circulent dans le sang à la recherche de l'antigène qui leur est spécifique. Ces cellules seraient donc pas impliquées dans l'activité de la maladie. La relation négative entre les lymphocytes T CD4 et les niveaux d'ALT peut s'expliquer par le fait que parmi les lymphocytes T CD4, il y a des T<sub>REG</sub>. Nous avons donc effectué la même analyse, mais avec les niveaux de T<sub>REG</sub>. Dans le tableau VI, il est possible d'observer un score de 0,8033 pour les T<sub>REG</sub>. Il y a donc une relation positive entre les niveaux de T<sub>REG</sub> et les niveaux d'ALT. En théorie, une augmentation des niveaux circulants de T<sub>REG</sub> serait liée à une diminution de l'activité de la maladie et des niveaux d'ALT. Cependant, ce n'est pas ce qui est observé ici. Cela peut être expliqué par un défaut de fonction des T<sub>REG</sub>. Si les niveaux de T<sub>REG</sub> augmentent, mais qu'il y a toujours un défaut de fonction, les T<sub>REG</sub> ne seront pas en mesure de contrôler les réponses auto-immunes des cellules T. Ces résultats suggèrent donc qu'un défaut de fonction des T<sub>REG</sub> serait lié à l'activité de la maladie chez les patients HAI. Nous observons aussi un score de 0,6174 pour les niveaux plasmatiques d'IL-16 et de 0,6683 pour les T<sub>REG</sub> CD39<sup>+</sup>. Les niveaux plasmatiques d'IL-16 et les T<sub>REG</sub> CD39<sup>+</sup> seraient liés

à une augmentation de l'activité de la maladie chez les patients HAI. Les T<sub>REG</sub> CD39<sup>+</sup> sont des cellules hautement suppressives (59). Elles seraient liées à l'activité de la maladie puisque l'expression de CD39 sur les T<sub>REG</sub> est élevée aux sites d'inflammation (81). Nous observons aussi un score de -0,4549 pour l'expression d'IL-2 et un score de 0,6958 pour les niveaux plasmatiques d'IL-2. Cela semble suggérer que les niveaux plasmatiques d'IL-2 seraient liés à une augmentation de l'activité de la maladie. Cependant, il y aurait une relation négative entre l'expression d'IL-2 et les niveaux d'ALT. Ces résultats sont contradictoires. Cela peut s'expliquer par le fait que le potentiel de sécrétion de l'IL-2 et les niveaux circulants d'IL-2 ne sont pas comparables à cause des méthodes utilisées (qPCR et ELISA). Les autres données de laboratoires dans le tableau V et VI qui n'ont pas été sujet de discussion ne semblent pas être impliquées dans la variance des niveaux d'ALT chez les patients HAI puisque leur score se rapproche de 0.

Bref, les résultats de l'analyse PCA suggèrent que le trafic de lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 sont liés à une augmentation des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Les lymphocytes T CD4 induiraient cette augmentation via l'expression de cytokines qui induisent l'expansion des lymphocytes T CD8 qui eux induisent des dommages aux hépatocytes permettant le relargage des ALT. Les résultats de l'analyse PCA suggèrent qu'un défaut de fonction des T<sub>REG</sub> est lié à l'augmentation des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Sans leurs fonctions immunosuppressives, les cellules T auto-immunes continuent d'engendrer des dommages aux hépatocytes permettant le relargage des ALT.

Afin de disposer d'un outil d'évaluation de thérapies possibles et de nouveaux biomarqueurs potentiels, il serait intéressant d'acquérir de nouvelles connaissances au sujet des mécanismes physiopathologiques de l'HAI à l'aide d'un modèle animal. Par exemple, il y a le modèle de l'hépatite induite par la concanavaline A chez la souris qui nous permettrait d'étudier les fonctions des lymphocytes T dans l'HAI (82). De plus, il y a le modèle de souris CYP2D6 qui nous permettrait d'étudier les mécanismes impliqués dans la chronicité de l'HAI (82). Finalement, il est possible d'obtenir un modèle de l'HAI chez les souris C57BL/6 en les xénoimmunisant contre des autoantigènes d'HAI humain (83). Cela induit un bris de la tolérance et une inflammation auto-immune dans le foie (83). Ce modèle a été utilisé afin d'étudier les effets bénéfiques du transfert de T<sub>REG</sub> CXCR3<sup>+</sup> ayant subi une expansion *ex vivo* (83).



## Chapitre 7 – Conclusion

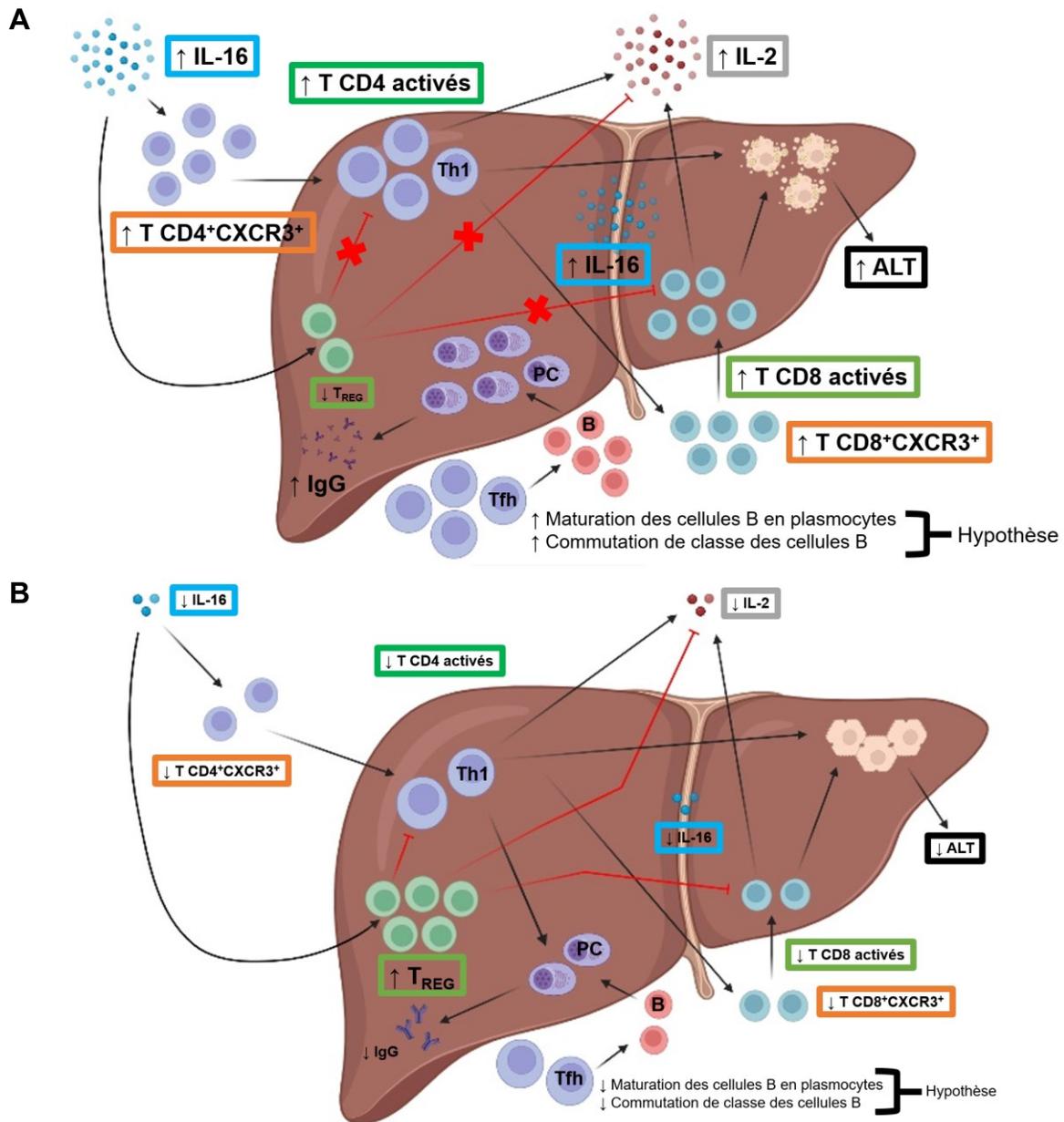
En conclusion, les niveaux d'expression d'IL-10 et circulants de T<sub>REG</sub> sont augmentés chez les patients HAI qui répondent au traitement alors que les niveaux circulants d'IL-16 sont diminués. Les patients HAI ayant une expression élevée d'IL-16 dans le foie ont des taux plasmatiques d'IL-16 plus élevés. La corrélation entre l'IL-16 et les lymphocytes T CD4 activés suggère que l'IL-16 pourrait être impliquée dans la réponse auto-immune des lymphocytes T contre le foie chez les patients HAI. La corrélation entre les niveaux circulants d'IL-16 et d'IL-2 et de T<sub>REG</sub> suggère que ces cytokines pourraient avoir des effets synergiques sur les T<sub>REG</sub> en influençant leur survie, différenciation et expansion. *In vitro*, l'IL-16 induit préférentiellement la migration cellulaire des cellules T CD4 et leur sensibilité à l'IL-16 dépend des niveaux d'IL-16 en circulation chez les patients HAI. Une analyse PCA démontre que les niveaux de lymphocytes T CD4 CXCR3<sup>+</sup>, T CD8 et T<sub>REG</sub> expliquent le mieux la variance des niveaux d'ALT chez les patients HAI. Les résultats suggèrent que l'IL-16 pourrait affecter à la fois les voies pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et ainsi influencer l'activité de l'HAI en fonction de ses niveaux. Les résultats suggèrent également que l'IL-10, l'IL-16 et des sous-populations de lymphocytes T CD4 régulateurs et effecteurs pourraient être des biomarqueurs potentiels de l'activité de la maladie et de la réponse au traitement chez les patients atteints d'HAI. Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour valider l'utilité de ces biomarqueurs dans la prédiction de la réponse au traitement et de l'activité de la maladie chez les patients atteints d'HAI.

En fonction des résultats obtenus et des données actuelles, il a été possible de mettre en place un schéma récapitulatif représentant les mécanismes proposés pour les dommages causés au foie chez les patients HAI (*Figure 25*). Dans le modèle que nous présentons chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT ( $\geq 40$ UI/L), nous proposons que des niveaux élevés d'IL-16 induiraient le recrutement (T CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>) et l'activation des lymphocytes T CD4 Th1 autoréactifs dans le foie. Ceux-ci fortifient le recrutement des lymphocytes T CD8 autoréactifs (T CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>) dans le foie. Les lymphocytes T CD4 Th1, via l'expression de cytokines, provoquent l'expansion des lymphocytes T CD8 activés, qui eux contribuent à la destruction des hépatocytes, ce qui

augmente les niveaux d'ALT. De plus, les lymphocytes T CD4 activés, via l'expression d'IL-16 et d'IL-2, contribuent à l'augmentation de l'expression hépatique d'IL-16 et à l'augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-16 et d'IL-2. Les T<sub>REG</sub>, dont les niveaux sont faibles et la fonction est altérée à cause d'une réduction de l'expression d'IL-10, ne sont pas en mesure de contrôler les réponses auto-immunes effectuées par lymphocytes T autoréactifs et de séquestrer l'IL-2 environnant produit par les cellules T activées. Les cellules T autoréactives ne sont donc pas privées d'IL-2, ce qui induit une différenciation et une prolifération accrue de celles-ci. L'activité de la maladie devient donc de plus en plus importante et elle serait caractérisée assez rapidement par une augmentation des niveaux circulants d'IL-16, d'IL-2 et des lymphocytes T CD4 effecteurs. Cependant, si l'inflammation dans le foie n'est pas contrôlée, l'activité de la maladie serait éventuellement caractérisée par des niveaux élevés d'ALT ( $\geq 40$ UI/L). Dans ce cas, l'IL-16 favoriserait l'inflammation hépatique et la progression de la maladie. Chez les patients HAI ayant des niveaux normaux d'ALT ( $< 40$ UI/L), nous supposons que des niveaux réduits d'IL-16 diminueraient le recrutement (T CD4<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>) et l'activation des lymphocytes T CD4 Th1 autoréactifs dans le foie. Il y aurait donc une réduction du recrutement (T CD8<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>) et de l'expansion des lymphocytes T CD8 autoréactifs activés dans le foie. Cela réduit les dommages hépatiques, ce qui diminue les niveaux d'ALT. Une réduction des lymphocytes T CD4 activés réduirait aussi l'expression hépatique d'IL-16 et les niveaux plasmatiques d'IL-16 et d'IL-2. Les T<sub>REG</sub>, via les effets synergiques de l'IL-16 et de l'IL-2, regagnent leurs fonctions et leur nombre. Elles sont en mesure de priver l'IL-2 environnant aux cellules T activées en le séquestrant et, via l'expression d'IL-10, de contrôler les réponses auto-immunes des lymphocytes T autoréactifs. L'activité de la maladie est donc réduite et elle serait rapidement caractérisée par une diminution des niveaux plasmatiques d'IL-16 et d'IL-2, une augmentation des niveaux circulants de T<sub>REG</sub> et une augmentation de l'expression l'IL-10 par celles-ci. Éventuellement, cela sera caractérisé par une diminution des niveaux d'ALT ( $< 40$ UI/L). Dans ce cas, l'IL-16 serait plutôt liée à la rémission et à l'inversion du processus inflammatoire.

Nous supposons aussi que chez les patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT ( $\geq 40$ UI/L), les cellules T<sub>FH</sub> induisent une augmentation de la commutation de classe des cellules B vers les IgG et de la maturation des cellules B en plasmocytes. Il y aurait donc une augmentation des niveaux

circulants d'IgG chez ces patients. Au contraire, chez les patients HAI ayant des niveaux normaux d'ALT (<40UI/L), ces phénomènes seraient moins importants ce qui diminuerait les niveaux circulants d'IgG. Cependant, il est important de noter que ce sont que des hypothèses puisque nous n'avons pas étudié les cellules B et les IgG dans ce projet.



**Abréviation :** PC; pour plasmocytes.

**Figure 25.** – Mécanismes proposés pour les dommages causés au foie chez les patients atteints d'HAI

En se basant sur les données actuelles et les résultats obtenus, un schéma récapitulatif proposant les mécanismes causant les dommages au foie chez (A) des patients HAI ayant des niveaux élevés d'ALT ( $\geq 40$ UI/L) et (B) des patients HAI ayant des niveaux normaux d'ALT ( $< 40$ UI/L) a été créé.

Finalement, j'aimerais conclure ce mémoire en discutant d'une revue qui a été publiée dans le journal *Hepatology*. Dans cette revue, les auteurs mentionnent les caractéristiques des biomarqueurs idéaux pour l'HAI. Ils doivent être non invasifs, c'est-à-dire qu'ils doivent être disponibles à partir d'une source périphérique telle que le sang (84). Ils doivent être facilement mesurables et reproductibles pour un large éventail de patients HAI (par exemple, les enfants, adultes et patients avec différents niveaux d'activité de la maladie) (84). Ils doivent être biologiquement plausibles et assez sensibles pour suivre l'activité inflammatoire histologique du foie (84). Ils doivent avoir des capacités pronostiques au moment du diagnostic, pouvoir prédire la rémission ou identifier les personnes à risque de rechute (84). Ils doivent identifier la rechute avant les signes et symptômes cliniques standards (84). Ils doivent donner un aperçu des voies de signalisation et des phénotypes immunitaires pertinents afin d'orienter les décisions thérapeutiques personnalisées et de faciliter les essais cliniques d'agents immunomodulateurs ciblés (84). Nos biomarqueurs potentiels de l'HAI rencontrent la plupart de ces caractéristiques. Cela est encourageant pour la suite de ce projet.

## Références bibliographiques

1. Judy A Owen & Al. Immunologie : le cours de Janis Kuby. 7e éd. New York (US): W.H. Freeman and Company; 2013.
2. InformedHealth.org [En ligne]. Cologne, Allemagne: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006. The innate and adaptive immune systems. [modifié le 30 juillet 2020; cité le 17 octobre 2023]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>
3. Metinko A. Neonatal Pulmonary Host Defense Mechanisms. Dans: Richard AP, William WF, Steven HA. Fetal and Neonatal Physiology [En ligne]. 3e éd. W.B. Saunders; 2004 [cité le 29 février 2024]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9654-6.50167-3>.
4. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e
5. Lendeckel U, Venz S, Wolke C. Macrophages: shapes and functions. *ChemTexts*. 2022;8(2):12. doi: 10.1007/s40828-022-00163-4.
6. Liu K. Dendritic Cells. *Encyclopedia of Cell Biology*. 2016:741–9. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.30111-0
7. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;311:17-58. doi: 10.1007/3-540-32636-7\_2.
8. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(8):557-69. doi: 10.1038/nri3254.
9. Rajendeeran A, Tenbrock K. Regulatory T cell function in autoimmune disease. *J Transl Autoimmun*. 2021;4:100130. doi: 10.1016/j.jtauto.2021.100130
10. Khalifa S, Khalifa OA. Hepatitis C and Helminthic Infections. Dans: Sanaa MK. Hepatitis C in Developing Countries [En ligne]. Academic Press; 2018 [cité le 29 février 2024]. Disponible: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803233-6.00011-4>.
11. Vyas SP, Goswami R. A Decade of Th9 Cells: Role of Th9 Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*. 2018 May 24;9:1139. doi: 10.3389/fimmu.2018.01139.

12. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells in health and disease. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jan 1;3(1):236-51. doi: 10.2741/s148.
13. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 2014;41(4):529-42. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004
14. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease [En ligne]*. 5e éd. New York: Garland Science; 2001 [cité le 17 octobre 2023]. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27162/>
15. Schenkel JM, Masopust D. Tissue-resident memory T cells. *Immunity*. 2014;41(6):886-97. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.007
16. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(6):a006957. doi: 10.1101/cshperspect.a006957
17. Nemazee D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):281-94. doi: 10.1038/nri.2017.19.
18. Lourenço EV, La Cava A. Natural regulatory T cells in autoimmunity. *Autoimmunity*. 2011;44(1):33-42. doi: 10.3109/08916931003782155
19. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63. doi: 10.1615/critrevimmunol.v32.i1.30
20. Hong S, Van Kaer L. Immune privilege: keeping an eye on natural killer T cells. *J Exp Med*. 1999;190(9):1197-200. doi: 10.1084/jem.190.9.1197
21. Lapierre P, Alvarez F. Le foie : un organe du système immunitaire? *Med Sci (Paris)*. 2007; 23(11): 985–990. doi: 10.1051/medsci/20072311985.
22. Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol*. 2005;26(10):512-7. doi: 10.1016/j.it.2005.08.005.
23. Bertolino P, McCaughan GW, Bowen DG. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol Cell Biol*. 2002;80(1):84-92. doi: 10.1046/j.0818-9641.2001.01048.x.

24. Holz LE, Warren A, Le Couteur DG, Bowen DG, Bertolino P. CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. *J Autoimmun.* 2010;34(1):15-22. doi: 10.1016/j.jaut.2009.08.005.
25. Wong YC, Tay SS, McCaughan GW, Bowen DG, Bertolino P. Immune outcomes in the liver: Is CD8 T cell fate determined by the environment? *J Hepatol.* 2015;63(4):1005-14. doi: 10.1016/j.jhep.2015.05.033.
26. Béland K, Lapierre P, Alvarez F. Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2009;15(9):1025-34. doi: 10.3748/wjg.15.1025
27. Mack CL, Adams D, Assis DN, Kerkar N, Manns MP, Mayo MJ, Vierling JM, Alsawas M, Murad MH, Czaja AJ. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology.* 2020;72(2):671-722. doi: 10.1002/hep.31065
28. Linzay CD, Sharma B, Pandit S. Autoimmune Hepatitis. Dans: StatPearls [En ligne]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cité le 27 novembre 2023]. Disponible : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459186/>
29. de Boer YS, van Gerven NM, Zwiers A, Verwer BJ, van Hoek B, van Erpecum KJ, Beuers U, van Buuren HR, Drenth JP, den Ouden JW, Verdonk RC, Koek GH, Brouwer JT, Guichelaar MM, Vrolijk JM, Kraal G, Mulder CJ, van Nieuwkerk CM, Fischer J, Berg T, Stickel F, Sarrazin C, Schramm C, Lohse AW, Weiler-Normann C, Lerch MM, Nauck M, Völzke H, Homuth G, Bloemena E, Verspaget HW, Kumar V, Zhernakova A, Wijmenga C, Franke L, Bouma G; Dutch Autoimmune Hepatitis Study Group; Lifelines Cohort Study; Study of Health in Pomerania. Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology.* 2014;147(2):443-52.e5. doi: 10.1053/j.gastro.2014.04.022.
30. Onofrio FQ, Hirschfield GM, Gulamhusein AF. A Practical Review of Primary Biliary Cholangitis for the Gastroenterologist. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* [En ligne]. 2019 [cité le 27 novembre 2023];15(3):145-154. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6495411/>

31. Chandok N, Hirschfield GM. Management of primary sclerosing cholangitis: conventions and controversies. *Can J Gastroenterol*. 2012;26(5):261-8. doi: 10.1155/2012/426430
32. Covelli C, Sacchi D, Sarcognato S, Cazzagon N, Grillo F, Baciocchi F, Fanni D, Cacciatori M, Maffei V, Guido M. Pathology of autoimmune hepatitis. *Pathologica*. 2021;113(3):185-193. doi: 10.32074/1591-951X-241
33. Krishna M. Histological Grading and Staging of Chronic Hepatitis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2021;17(4):222-226. doi: 10.1002/cld.1014
34. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, Porta G, Boberg KM, Hofer H, Bianchi FB, Shibata M, Schramm C, Eisenmann de Torres B, Galle PR, McFarlane I, Dienes HP, Lohse AW; International Autoimmune Hepatitis Group. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology*. 2008;48(1):169-76. doi: 10.1002/hep.22322.
35. Cassim S, Bilodeau M, Vincent C, Lapierre P. Novel Immunotherapies for Autoimmune Hepatitis. *Front Pediatr*. 2017;5:8. doi: 10.3389/fped.2017.00008
36. Puckett Y, Gabbar A, Bokhari AA. Prednisone. Dans: StatPearls [En Ligne]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [modifié le 19 juillet 2023; cité le 27 novembre 2023]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534809/>
37. Mohammadi O, Kassim TA. Azathioprine. Dans: StatPearls [En Ligne]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [modifié le 1er mai 2023; cité le 27 novembre 2023]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542190/>
38. D'Agostino D, Costaguta A, Álvarez F. Successful treatment of refractory autoimmune hepatitis with rituximab. *Pediatrics*. 2013;132(2):e526-30. doi: 10.1542/peds.2011-1900.
39. Burak KW, Swain MG, Santodomingo-Garzon T, Lee SS, Urbanski SJ, Aspinall AI, Coffin CS, Myers RP. Rituximab for the treatment of patients with autoimmune hepatitis who are refractory or intolerant to standard therapy. *Can J Gastroenterol*. 2013;27(5):273-80. doi: 10.1155/2013/512624.
40. Karampetsou MP, Liosis SN, Sfrikakis PP. TNF- $\alpha$  antagonists beyond approved indications: stories of success and prospects for the future. *QJM*. 2010;103(12):917-28. doi: 10.1093/qjmed/hcq152.

41. Marceau G, Yang R, Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Low-dose anti-CD3 antibody induces remission of active autoimmune hepatitis in xenoinmunized mice. *Liver Int.* 2015;35(1):275-84. doi: 10.1111/liv.12498.
42. Lapierre P, Béland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res.* 2007;149(3):107-13. doi: 10.1016/j.trsl.2006.11.010.
43. Lapierre P, Lamarre A. Regulatory T Cells in Autoimmune and Viral Chronic Hepatitis. *J Immunol Res.* 2015;2015:479703. doi: 10.1155/2015/479703
44. Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: an updated overview. *J Autoimmun.* 2021;119:102619. doi: 10.1016/j.jaut.2021.102619.
45. Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, Baron U, Olek S, Wiegand C, Lohse AW, Weiler-Normann C, Schramm C, Herkel J. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol.* 2012;57(1):125-32. doi: 10.1016/j.jhep.2012.02.029.
46. Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM. Interleukin-16. *J Leukoc Biol.* 2000;67(6):757-66. doi: 10.1002/jlb.67.6.757.
47. Wilson KC, Center DM, Cruikshank WW. The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth Factors.* 2004;22(2):97-104. doi: 10.1080/08977190410001704679.
48. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2020;217(1):e20190418. doi: 10.1084/jem.20190418
49. Spolski R, Li P, Leonard WJ. Biology and regulation of IL-2: from molecular mechanisms to human therapy. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(10):648-659. doi: 10.1038/s41577-018-0046-y.
50. Harris F, Berdugo YA, Tree T. IL-2-based approaches to Treg enhancement. *Clin Exp Immunol.* 2023;211(2):149-163. doi: 10.1093/cei/uxac105
51. Ahn HR, Baek GO, Yoon MG, Son JA, You D, Yoon JH, Cho HJ, Kim SS, Cheong JY, Eun JW. HMBS is the most suitable reference gene for RT-qPCR in human HCC tissues and blood samples. *Oncol Lett.* 2021 Nov;22(5):791. doi: 10.3892/ol.2021.13052.

52. Zhan C, Zhang Y, Ma J, Wang L, Jiang W, Shi Y, Wang Q. Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014 Apr;46(4):330-7. doi: 10.1093/abbs/gmt153.
53. Vahedi L, Ghasemi M, Yazdani J, Ranjbar S, Nouri B, Alizadeh A, Afshar P. Investigation of CCR7 Marker Expression Using Immunohistochemical Method and Its Association with Clinicopathologic Properties in Patients with Breast Cancer. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res [En ligne]*. 2018 [cité le 27 novembre 2023];12(2):103-110. Disponible : [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6141431/#:~:text=Chemokine%20receptor%207%20\(CCR7\)%20belongs,been%20observed%20in%20breast%20cancer](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6141431/#:~:text=Chemokine%20receptor%207%20(CCR7)%20belongs,been%20observed%20in%20breast%20cancer).
54. LaSalle JM, Hafler DA. The coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms on T cells during the S/G2/M stages of cell cycle. *Cell Immunol*. 1991;138(1):197-206. doi: 10.1016/0008-8749(91)90144-z.
55. Groom JR, Luster AD. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res*. 2011;317(5):620-31. doi: 10.1016/j.yexcr.2010.12.017
56. Wakiguchi H, Hasegawa S, Suzuki Y, Kudo K, Ichiyama T. Relationship between T-cell HLA-DR expression and intravenous immunoglobulin treatment response in Kawasaki disease. *Pediatr Res*. 2015;77(4):536-40. doi: 10.1038/pr.2015.12.
57. Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One*. 2011;6(7):e22560. doi: 10.1371/journal.pone.0022560
58. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, Ha C, Jacobson IM, Talal AH. CD56(+dim) and CD56(+bright) cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(2):408-16. doi: 10.1111/j.1365-2249.2004.02523.x
59. Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Díaz-Sánchez M, Lardone PJ, Guerrero JM, Carrillo-Vico A. Peripheral CD39-expressing T regulatory cells are increased and associated with relapsing-remitting multiple sclerosis in relapsing patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):2302. doi: 10.1038/s41598-019-38897-w

60. H. Vallet, T. Fali, D. Sauce. Le vieillissement du système immunitaire : du fondamental à la clinique. *La Revue de Médecine Interne*. 2019;40(2) :105-111. doi: 10.1016/j.revmed.2018.07.005
61. Ferrucci L, Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol*. 2018;15(9):505-522. doi: 10.1038/s41569-018-0064-2
62. Wegner A, Benson S, Rebernik L, et al. Sex differences in the pro-inflammatory cytokine response to endotoxin unfold in vivo but not ex vivo in healthy humans. *Innate Immunity*. 2017;23(5):432-439. doi: 10.1177/1753425917707026.
63. Lard LR, Roep BO, Verburgh CA, Zwinderman AH, Huizinga TW. Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus*. 2002;11(3):181-5. doi: 10.1191/0961203302lu176sr.
64. Blaschke S, Schulz H, Schwarz G, Blaschke V, Müller GA, Reuss-Borst M. Interleukin 16 expression in relation to disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* [En ligne]. 2001 [cité le 11 décembre 2023];28(1):12-21. Disponible: <https://www.jrheum.org/content/jrheum/28/1/12.full.pdf>
65. Negera E, Walker SL, Bobosha K, Bekele Y, Endale B, Tarekegn A, Abebe M, Aseffa A, Dockrell HM, Lockwood DN. The Effects of Prednisolone Treatment on Cytokine Expression in Patients with Erythema Nodosum Leprosum Reactions. *Front Immunol*. 2018;9:189. doi: 10.3389/fimmu.2018.00189
66. Fuss IJ, Schlaak JF, Meyer Zum Buschenfelde KH, Strober W, Neurath MF. AZATHIOPRINE CAN MODULATE IMMUNOSUPPRESSION THROUGH AN IL-10 MEDIATED MECHANISM. *J Pediatr Gastroenterol Amp Nutr* [En ligne]. 1999 [cité le 11 décembre 2023];29(4):490. Disponible: <https://doi.org/10.1097/00005176-199910000-00032>
67. Parada NA, Center DM, Kornfeld H, Rodriguez WL, Cook J, Vallen M, Cruikshank WW. Synergistic Activation of CD4+ T Cells by IL-16 and IL-2. *J Immunol* [En ligne]. 1998 [cité le 11 décembre 2023];160(5):2115-20. Disponible : <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.5.2115>

68. McFadden C, Morgan R, Rahangdale S, Green D, Yamasaki H, Center D, Cruikshank W. Preferential migration of T regulatory cells induced by IL-16. *J Immunol.* 2007;179(10):6439-45. doi: 10.4049/jimmunol.179.10.6439.
69. Rahangdale S, Morgan R, Heijens C, Ryan TC, Yamasaki H, Bentley E, Sullivan E, Center DM, Cruikshank WW. Chemokine receptor CXCR3 desensitization by IL-16/CD4 signaling is dependent on CCR5 and intact membrane cholesterol. *J Immunol.* 2006;176(4):2337-45. doi: 10.4049/jimmunol.176.4.2337.
70. Mozo L, Suárez A, Gutiérrez C. Glucocorticoids up-regulate constitutive interleukin-10 production by human monocytes. *Clin Exp Allergy.* 2004;34(3):406-12. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.01824.x.
71. Aljumah AA, Al-Ashgar H, Fallatah H, Albenmoussa A. Acute onset autoimmune hepatitis: Clinical presentation and treatment outcomes. *Ann Hepatol.* 2019 May-Jun;18(3):439-444. doi: 10.1016/j.aohep.2018.09.001.
72. Genzel D, Katz LH, Safadi R, Rozenberg A, Milgrom Y, Jacobs JM, Shafrir A. Patients with low ALT levels are at increased risk for severe COVID-19. *Front Med (Lausanne).* 2023 Sep 27;10:1231440. doi: 10.3389/fmed.2023.1231440.
73. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, et al. The Role of IL-10 in Autoimmune Pathology. Dans: *Madame Curie Bioscience Database [En ligne].* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013 [cité le 12 décembre 2023]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6234/>
74. Pahlavani MA, Richardson A. The effect of age on the expression of interleukin-2. *Mech Ageing Dev.* 1996;89(3):125-54. doi: 10.1016/0047-6374(96)01725-3.
75. Bernstein ED, Murasko DM. Effect of age on cytokine production in humans. *Age (Omaha).* 1998;21(4):137-51. doi: 10.1007/s11357-998-0024-6
76. Sedighi S, Aghaei M, Musavi S, Nomali M. Relationship between Serum Level of Interleukin-2 in Patients with Systemic Lupus Erythematosus and Disease Activity in Comparison with Control Group. *J Clin Diagn Res.* 2014;8(7):MC16-8. doi: 10.7860/JCDR/2014/7903.4602
77. Li B, Guo Q, Wang Y, Su R, Gao C, Zhao J, Li X, Wang C. Increased Serum Interleukin-2 Levels Are Associated with Abnormal Peripheral Blood Natural Killer Cell Levels in Patients with

- Active Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:6108342. doi: 10.1155/2020/6108342
78. Diestelhorst J, Junge N, Jonigk D, Schlue J, Falk CS, Manns MP, Baumann U, Jaeckel E, Taubert R. Baseline IL-2 and the AIH score can predict the response to standard therapy in paediatric autoimmune hepatitis. *Sci Rep* [En ligne]. 2018 [cité le 13 décembre 2023];8(1). Disponible: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18818-5>
79. Czaja AJ. Exploring the Pathogenic Role and Therapeutic Implications of Interleukin 2 in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci.* 2021;66(8):2493-2512. doi: 10.1007/s10620-020-06562-2.
80. Horst HJ, Flad HD. Corticosteroid-interleukin 2 interactions: inhibition of binding of interleukin 2 to interleukin 2 receptors. *Clin Exp Immunol* [En ligne]. 1987 [cité le 13 décembre 2023];68(1):156-61. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1542688/>
81. Rissiek A, Baumann I, Cuapio A, Mautner A, Kolster M, Arck PC, Dodge-Khatami A, Mittrücker HW, Koch-Nolte F, Haag F, Tolosa E. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J Autoimmun.* 2015;58:12-20. doi: 10.1016/j.jaut.2014.12.007.
82. Liu SP, Bian ZH, Zhao ZB, Wang J, Zhang W, Leung PSC, Li L, Lian ZX. Animal Models of Autoimmune Liver Diseases: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020 Apr;58(2):252-271. doi: 10.1007/s12016-020-08778-6.
83. Lapierre P, Béland K, Yang R, Alvarez F. Adoptive transfer of ex vivo expanded regulatory T cells in an autoimmune hepatitis murine model restores peripheral tolerance. *Hepatology.* 2013 Jan;57(1):217-27. doi: 10.1002/hep.26023.
84. Harrington C, Krishnan S, Mack CL, Cravedi P, Assis DN, Levitsky J. Noninvasive biomarkers for the diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology.* 2022;76(6):1862-1879. doi: 10.1002/hep.3259