

Université de Montréal

# **Pathogenèse de l'hépatite autoimmune**

Influence des gènes, du sexe, de l'âge et de l'environnement

par

Pascal Lapierre

Programme de Sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences biomédicales

Juillet, 2010

© Pascal Lapierre, 2010

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

**Pathogenèse de l'hépatite autoimmune**  
**Influence des gènes, du sexe, de l'âge et de l'environnement**

Présenté par :  
Pascal Lapierre

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Ali Ahmad, président-rapporteur  
Dr Fernando Alvarez, directeur de recherche  
Dr Marc Bilodeau, membre du jury  
Dr Alain Lamarre, examinateur externe  
Dr Christopher Rose, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'hépatite autoimmune (HAI) résulte d'une perte de tolérance du système immunitaire envers des antigènes de l'hépatocyte. Elle peut se présenter sous forme d'hépatite aiguë, parfois fulminante, ou comme une maladie chronique menant progressivement à une cirrhose hépatique. En absence de traitement, cette maladie est fatale. La pathogenèse de l'HAI et les mécanismes responsables de sa progression restent inconnus à ce jour. L'objectif global de ce projet est d'examiner les facteurs prédisposants et les mécanismes immunologiques responsables de l'apparition et de la progression de l'HAI. Pour permettre l'étude de la pathogenèse de l'HAI, nous avons développé un modèle murin expérimental d'hépatite autoimmune de type 2. Celui-ci est basé sur la xénoimmunisation de souris C57BL/6 avec les deux antigènes ciblés dans l'HAI de type 2 chez l'homme (CYP2D6 et FTCD). Par mimétisme moléculaire, le système immunitaire de ces souris réagit contre les protéines murines homologues et une HAI s'ensuit. Ce modèle expérimental présente la plupart des caractéristiques histologiques, biochimiques et sérologiques d'une HAI de type 2. Les souris développent une inflammation autoimmune chronique avec présence d'hépatite d'interface et d'infiltrations intralobulaires, un infiltrat composé majoritairement de lymphocytes T CD4+ mais aussi de lymphocytes T CD8+ et B, d'une élévation des ALT sériques, des niveaux d'immunoglobulines G circulantes augmentés ainsi que d'autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1. L'étude de l'influence du bagage génétique a permis de définir l'importance relative des gènes du CMH et des gènes non-CMH sur le développement d'une HAI. Les gènes du locus CMH sont essentiels mais insuffisants pour mener au développement d'une HAI et donc, la susceptibilité génétique à l'HAI est comme chez l'homme, multigénique. Les patients atteints d'HAI de type 2 sont généralement des jeunes filles. L'étude des influences de l'âge et du sexe dans ce modèle a permis de montrer que les souris femelles avant et au début de leur maturité sexuelle sont plus susceptibles au développement d'une HAI de type 2. De plus, les femelles ont un nombre réduit de lymphocytes T régulateurs, ce qui leur confère une susceptibilité accrue comparé aux mâles. L'ensemble de ces travaux nous a conduits à proposer un mécanisme

où le développement d'une HAI chez les femelles d'un âge particulier résulterait de l'activation de cellules T CD4<sup>+</sup> autoréactives ayant échappé aux mécanismes de tolérance centrale, via un mécanisme de mimétisme moléculaire avec un antigène exogène. En présence d'une tolérance périphérique réduite due à un faible nombre de cellules T régulatrices, les cellules T autoréactives proliféreraient et activeraient des cellules B autoréactives entraînant la sécrétion d'autoanticorps. L'activation subséquente de cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques spécifiques amènerait la lyse des hépatocytes et la relâche d'autoantigènes permettant la perpétuation de l'autoimmunité.

**Mots-clés :** Autoimmunité, hépatite, génétique, foie, tolérance, FoxP3

## Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is an autoimmune disease resulting from a loss of immunological tolerance against hepatocyte antigens. It can present itself as an acute hepatitis, sometime fulminant, or as a chronic disease leading to progressive liver cirrhosis. In absence of treatment, this disease is fatal. The pathogenesis of AIH and the mechanisms responsible for its progression remain unknown. The overall objective of this project is to examine predisposing factors and immunological mechanisms responsible for the onset and progression of HAI. To study the pathogenesis of AIH, we developed a mouse model of experimental autoimmune hepatitis type 2. This model is based on xenoimmunization of C57BL/6 wild type mice with human type 2 AIH autoantigens (CYP2D6 and FTCD). Molecular mimicry between the xenoantigens and their homologous murine proteins results in the development of an autoimmune response followed by liver inflammation. This experimental mouse model shows most histological, biochemical and serological features of human type 2 AIH. Mice develop autoimmune chronic liver inflammation characterized by the presence of interface hepatitis and intralobular inflammation, infiltrates composed predominantly of CD4<sup>+</sup> but also of CD8<sup>+</sup> T and B cells, elevated ALT serum levels, increased serum immunoglobulin G and circulating anti-LC1 and anti-LKM1 autoantibodies. Studies of the influence of genetic background on AIH susceptibility have defined the relative importance of MHC and non-MHC genes. Specific MHC haplotype are necessary but not sufficient to lead to the development of AIH and therefore, the genetic susceptibility to HAI is, as in humans, multigenic. In humans type 2 AIH is found predominantly in young women. In our experimental models, female mice before or at beginning of sexual maturity are more susceptible to AIH. Females at this age have reduced numbers of regulatory T cells, conferring an increased susceptibility compared to males. Based on these results, we propose a mechanism in which the development of AIH results from the activation, through a mechanism of molecular mimicry with an exogenous antigen, of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells that have escaped central tolerance. In presence of reduced peripheral tolerance due to low number of regulatory T cells, autoreactive T cells

proliferate and activate autoreactive B cells leading to secretion of autoantibodies. The subsequent activation of specific cytotoxic CD8+T cells results in hepatocytes lysis and autoantigens release, leading to perpetuation of autoimmunity.

**Keywords** : Autoimmunity, hepatitis, genetic, liver, tolerance, FoxP3

## Table des matières

Introduction .....	15
1. Le foie .....	16
1.1 Régénération tissulaire .....	17
1.2 Organisation structurelle du foie .....	18
1.3 Propriétés immunologiques uniques .....	20
1.2.1 Article 1 « Le foie : un organe du système immunitaire ? » (Med Sci (Paris). 2007 Nov;23(11):985-90.) .....	21
2. Hépatite autoimmune .....	40
2.1 Perspective historique .....	40
2.2 Présentation clinique .....	42
2.3 Caractéristiques histologiques .....	43
2.4 Caractéristiques biochimiques .....	45
2.5 Autoanticorps .....	46
2.6 Génétique .....	55
2.7 Pathogenèse .....	59
2.7.1 Article 2 « Pathogenesis of autoimmune hepatitis : From break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis » (Transl Res. 2007 Mar;149(3):107-13. ) ..	61
2.8 Modèles expérimentaux d'hépatite autoimmune .....	85
Objectifs de la thèse .....	90
Résultats .....	91
Développement d'un modèle d'hépatite autoimmune de type 2 .....	92
1.1 Article 3 « A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens.» (Hepatology. 2004;39(4):1066-74.) .....	93
Étude de l'influence du patrimoine génétique sur le développement de l'HAI .....	120
2.1 Article 4 « Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development. » (J Autoimmun. 2006 Mar;26(2):82-9.) .....	121
Influence de l'âge et du sexe sur le développement de l'HAI .....	148

3.1 Article 5 « Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis» (Hepatology. 2010 Mai;51(5):1789-98.) .....	149
Discussion générale.....	178
Conclusion.....	191
Bibliographie.....	i



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1. Critères pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune.</b> Critères simplifiés pour le diagnostic de l'HAI, en présence de signes cliniques d'hépatite, basés sur des paramètres sérologiques et histologiques (26). *Total de points maximum lors de l'addition pour tous les autoanticorps présents. Adapté de Hennes <i>et al. Hepatology</i> , 2008.....	46
<b>Tableau 2. Autoanticorps présents chez les patients atteints d'une hépatite autoimmune.</b> Abréviations : SMA, anticorps anti-muscles lisses; ANA, anticorps anti-noyaux; LKM1, anticorps anti-microsomes du foie et du rein de type 1; LC1, anticorps anti-cytosol du foie de type 1 et SLA, anticorps anti-antigènes solubles du foie.....	47
<b>Tableau 3. Allèles de susceptibilité présents chez les patients avec HAI.</b> .....	56
<b>Tableau 4. Similarités entre l'hépatite autoimmune de type 2 et le modèle expérimental.</b> .....	192

## Liste des figures

- Figure 1. Lobule hépatique.** Adapté de la figure *Structure of the liver's lobules* produite par le *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA). ..... 19
- Figure 2. Incidence de l'hépatite autoimmune selon l'âge et le sexe au moment du diagnostic.** Une forte prépondérance féminine est observée tant chez les patients atteints d'HAI de type 1 que de type 2. (Dr Homber (Hôpital Saint-Antoine, Paris), communication personnelle). ..... 43
- Figure 3. Histologie de l'hépatite autoimmune.** Infiltration lymphoplasmocytaire avec hépatite d'interface et nécrose en pont des lobules hépatiques (*gauche*). Transformation des hépatocytes en cellules géantes et infiltration importante du lobule hépatique (*milieu*). Formation de rosettes hépatocytaires (*droite*). Adapté de Alvarez F. *et al Clin Liver Dis.* 2006 (9). ..... 44
- Figure 4. Pathogenèse de l'hépatite autoimmune dans notre modèle expérimental.** . 193

## Liste des abréviations

ANA	Anti-noyaux « Anti-nuclear antibodies »
Anti-LC1	Anti-cytosol de foie de type 1 « anti-liver cytosol type 1 »
Anti-LKM1	Anti-microsomes de foie et de rein de type 1 «Anti-liver kidney microsome type 1»
Anti-SLA/LP	Anti-protéine soluble du foie « Anti-soluble liver protein »
CD	Cluster de différenciation « Cluster of differentiation »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CTLA-4	Antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique « Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 »
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6
FoxP3	Facteur de transcription des lymphocytes régulateurs « Forkhead Box Protein 3 »
FTCD	Formiminotransférase cyclodéaminase
GP	Glycoprotéine (LCMV)
HLA	antigène leucocytaire humain « Human leukocyte antigen »
HAI	Hépatite autoimmune
IFN- $\gamma$	Interféron gamma
Ig	Immunoglobuline
IgG	Immunoglobuline G
IL-10	Interleukine 10
IL-2	Interleukine 2
IP-10	Protéine inductible par l'interféron- $\gamma$ 10kDa «IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10kDa »
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire murine « Lymphochoriomeningitis virus »
LPS	Lipopolysaccharide

NP	Nucléoprotéine (LCMV)
Poly (I:C)	Polynucléotide Inosine-Cytosine
RIP	Promoteur de l'insuline de rat « Rat insulin promoter »
SMA	Anti-muscle lisse « Smooth-muscle antibodies »
TCR	Récepteur des cellules T « T-cell receptor »
TGF- $\beta$	Facteur de croissance transformant $\beta$ «Transforming growth factor- $\beta$ »
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$ « Tumor necrosis factor $\alpha$ »
tRNP(ser/sec)	Ribonucléoprotéine associée à l'ARNt suppresseur de l'UGA
TTR	Transthyréline
VHC	Virus de l'hépatite C

*« A mouse is an animal that, if killed in sufficiently many and creative ways,  
will generate a PhD »  
Unknown*

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon mentor, le Dr Fernando Alvarez avec qui j'ai eu le privilège de travailler depuis maintenant près de 15 ans. Sa passion contagieuse pour la recherche, ses encouragements dans les moments difficiles, sa patience et sa disponibilité, malgré un horaire plus que chargé, ne sont que quelques unes des choses dont je me souviendrai le plus. Dr Alvarez m'a énormément appris sur la science et sur la recherche mais aussi sur la valeur du travail et sur nos responsabilités, en tant qu'enseignants envers les étudiants et les stagiaires. Si j'ai pu accomplir ce que j'ai accompli ces 15 dernières années, c'est grâce à lui et je l'en remercie énormément. La rédaction de cette thèse marque une étape charnière; l'oiseau quitte le nid, mais en quittant le professeur que fut Dr Alvarez, je garde un ami.

Merci Fernando

\*\*\*\*

Je voudrais aussi remercier le Dr Hugo Soudeyns, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer ces dernières années. Pour la confiance qu'il m'a portée, son appui et ses conseils, je l'en remercie énormément. Je remercie aussi le Dr Claude Roy pour son support et ses précieux conseils depuis plusieurs années. Vous m'avez toujours appuyé et pour cela je vous en suis très reconnaissant.

\*\*\*\*

Je voudrais également remercier tous les membres passés et présents du laboratoire qui durant ces années m'ont permis, par leurs idées et réflexions, d'avancer dans mon projet. Merci aussi à vous tous pour l'ambiance amicale que vous avez su créer et qui a rendu mes journées au laboratoire si agréables. Merci aussi pour votre aide dans ces

moments où on ne sait pas comment on va y arriver, je n'aurais pas pu réaliser tout ce travail sans votre aide. Merci Catherine Habel, Roland Yang, Ugur Halac, Caroline Martin, Fernando Alvarez Jr, Chantal Piché, Gabriel Marceau, Réginald Renous, Denise Herzog, Idriss Djilali-Saiah, Susanna Vitozzi et Oumnia Hajoui.

\*\*\*\*

Enfin, je voudrais remercier ma famille et mes parents qui ont toujours été présents pour moi durant ces années. Pour leurs encouragements et leur appui je les remercie. Merci à Kathie qui a été à mes côtés, au laboratoire et dans la vie, durant toutes ces années. Tes encouragements, ta confiance, ton aide précieuse et tes conseils ont rendu tout ceci possible. Merci pour ta patience durant ces longues soirées de travail. Tu as toujours été là dans les moments difficiles et cette thèse je te la dédie, elle ne serait pas ce qu'elle est si tu n'avais pas été là, et je ne serais pas non plus celui que je suis maintenant, alors merci Kathie. Merci à Christophe et Florence qui égayent ma vie et me font oublier les tracas du travail. Merci pour votre patience et votre compréhension.

Merci

## **Avant-propos**

L'autoimmunité est une énigme fascinante; comprendre comment le système immunitaire peut se dérégler au point de rejeter ses propres organes comme s'ils étaient un organisme étranger, c'est comprendre comment ce système infiniment complexe fonctionne. Les travaux de cette thèse tenteront de jeter un peu de lumière sur un aspect de cette énigme : la pathogenèse de l'hépatite autoimmune de type 2 (HAI de type 2). Cette maladie autoimmune mortelle où le foie est attaqué par le système immunitaire est connue depuis longtemps, mais les mécanismes qui sous-tendent son développement restent obscurs.

Qu'est-ce qui peut déclencher cette maladie? Pourquoi certaines familles sont plus atteintes par les maladies autoimmunes, y compris l'HAI? Pourquoi les femmes sont-elles plus touchées par cette maladie? Pourquoi certains autoantigènes hépatiques sont-ils systématiquement ciblés par le système immunitaire lors d'une HAI? Ce sont ces problématiques que ce travail de doctorat a tâché d'adresser.

En développant un modèle expérimental d'HAI de type 2, nous avons tenté de comprendre les facteurs déclenchant cette maladie, ceux pouvant influencer sa susceptibilité ainsi que les mécanismes intimes impliqués dans son développement. Ces travaux pourraient ainsi permettre une meilleure connaissance de cette pathologie complexe, mais aussi un transfert de connaissance vers les patients qui pourrait influencer leur prise en charge ainsi que le développement d'outils diagnostiques et de nouvelles immunothérapies spécifiques.



## **Introduction**

La pathogenèse de l'hépatite autoimmune (HAI) est complexe et résulterait de la convergence de facteurs propres au foie, de mécanismes de tolérance immunitaire (centrale et périphérique), de facteurs de l'hôte et de l'environnement. Dans cette introduction, nous tenterons de résumer certaines caractéristiques physiologiques propres au foie telle sa formidable capacité de régénération. Cette dernière est un facteur peu évoqué dans la pathogenèse de l'HAI mais qui pourrait potentiellement avoir des répercussions sur le cours de la maladie. Nous étudierons aussi les propriétés immunologiques uniques au foie, qui pourraient s'avérer fondamentales dans le développement d'une HAI.

Nous ferons ensuite une revue des premiers travaux qui ont tenté de décrire cette pathologie. Nous discuterons de la présentation clinique et de l'histologie hépatique qui la caractérisent et la distinguent d'autres pathologies autoimmunes. Nous discuterons de la réponse B autoimmune présente chez tous les patients et qui, comme nous le verrons plus loin, pourrait jouer un rôle important dans le bris de tolérance immunitaire et le développement de la maladie.

Nous réviserons aussi ce qui est connu de l'influence de la génétique de l'hôte sur le développement et le cours de cette maladie. Nous verrons que tant les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) que certains autres hors de ce complexe pourraient être à l'origine d'une susceptibilité à l'autoimmunité et à l'HAI. Nous discuterons ensuite de ce qui est connu de la pathogenèse de la maladie pour clore finalement par une revue des différents modèles expérimentaux d'HAI qui ont été développés.

## 1. Le foie

Le foie est l'organe le plus volumineux du corps humain pesant entre 1200 et 1500g. Il est irrigué à la fois par les systèmes veineux et artériel. Il reçoit le sang veineux provenant de la rate et des intestins via la veine porte et reçoit, via l'artère hépatique, la circulation artérielle provenant du tronc cœliaque. Situé à l'interface entre l'intestin et le reste de l'organisme, il régule l'apport en énergie et en nutriments pour tout l'organisme. Cette localisation entre l'intestin, peuplé de microorganismes pouvant absorber une multitude d'antigènes alimentaires, et le reste de l'organisme a mené au développement de plusieurs mécanismes immunitaires spécifiques au foie.

Le foie a aussi une fonction de détoxification très importante pour l'organisme, responsabilité qu'il partage avec les reins, en charge de l'élimination des molécules hydrosolubles. Le foie détoxifie l'organisme via trois voies : la sécrétion via la bile, la transformation et la sécrétion dans la circulation sanguine et le catabolisme. Ces mécanismes s'appliquent tant aux molécules endogènes (métabolisme des hormones, désamination des acides aminés en urée, désamination oxydative libérant les groupements d'ammoniac des protéines alimentaires) qu'exogènes (médicaments, alcool). Cette détoxification peut avoir lieu via la conjugaison et la prise en charge par le glutathion pour son élimination ou via la métabolisation par les cytochromes P450.

Le foie a aussi une fonction de synthèse et de stockage. Il est, entre autres, responsable de la synthèse de l'albumine, de facteurs de coagulation, de lipides (cholestérol) et de glucides. Il est aussi en charge du stockage de plusieurs molécules nécessaires à l'organisme telles que le fer, le cuivre, le zinc, les vitamines (A et B) et le glycogène. En présence d'une atteinte hépatique grave (insuffisance hépatique), plusieurs fonctions nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme se voient altérées.

## 1.1 Régénération tissulaire

Dans la mythologie grecque, la légende de Prométhée raconte qu'après qu'il eût volé le secret du feu et l'eût transmis aux hommes, Zeus condamna Prométhée à être enchaîné au mont Caucase et à voir son foie dévoré chaque jour par un des aigles de Zeus et cela, pour l'éternité. Cette fable laisse croire que déjà à cette époque, les Grecs avaient découvert la capacité unique du foie de se régénérer.

En effet, le foie a la capacité étonnante de se régénérer, que ce soit après une hépatectomie partielle ou suite à une hépatite fulminante entraînant la destruction d'une grande partie du parenchyme hépatique. Par exemple, la résection de 70% du foie chez un rat entraîne sa complète régénération en seulement 5 à 7 jours (1).

Cette régénération du foie emploierait des mécanismes différents que ceux à l'œuvre lors du développement embryonnaire. En effet, Otu *et al.* ont démontré que les facteurs de transcription exprimés lors du développement embryonnaire hépatique ne sont pas exprimés lors de la régénération tissulaire du foie (2). Les facteurs de transcription utilisés lors de la régénération seraient plutôt ceux associés à la prolifération cellulaire. Ceci suggère donc que la régénération cellulaire serait le résultat d'une « hyperplasie » des hépatocytes plutôt que celui de l'enclenchement d'un programme développemental.

Cette observation est tout à fait compatible avec une des hypothèses avancées quant à la pathogenèse de l'hépatite C, qui propose que la régénération constante du parenchyme hépatique et que la prolifération élevée des hépatocytes entraîneraient un raccourcissement accéléré des télomères. Ceci résulterait en une sénescence des hépatocytes et en une perte de leur fonction, en une réponse fibrotique exagérée suite à l'atteinte hépatique et en un risque accru d'hépatocarcinome (3).

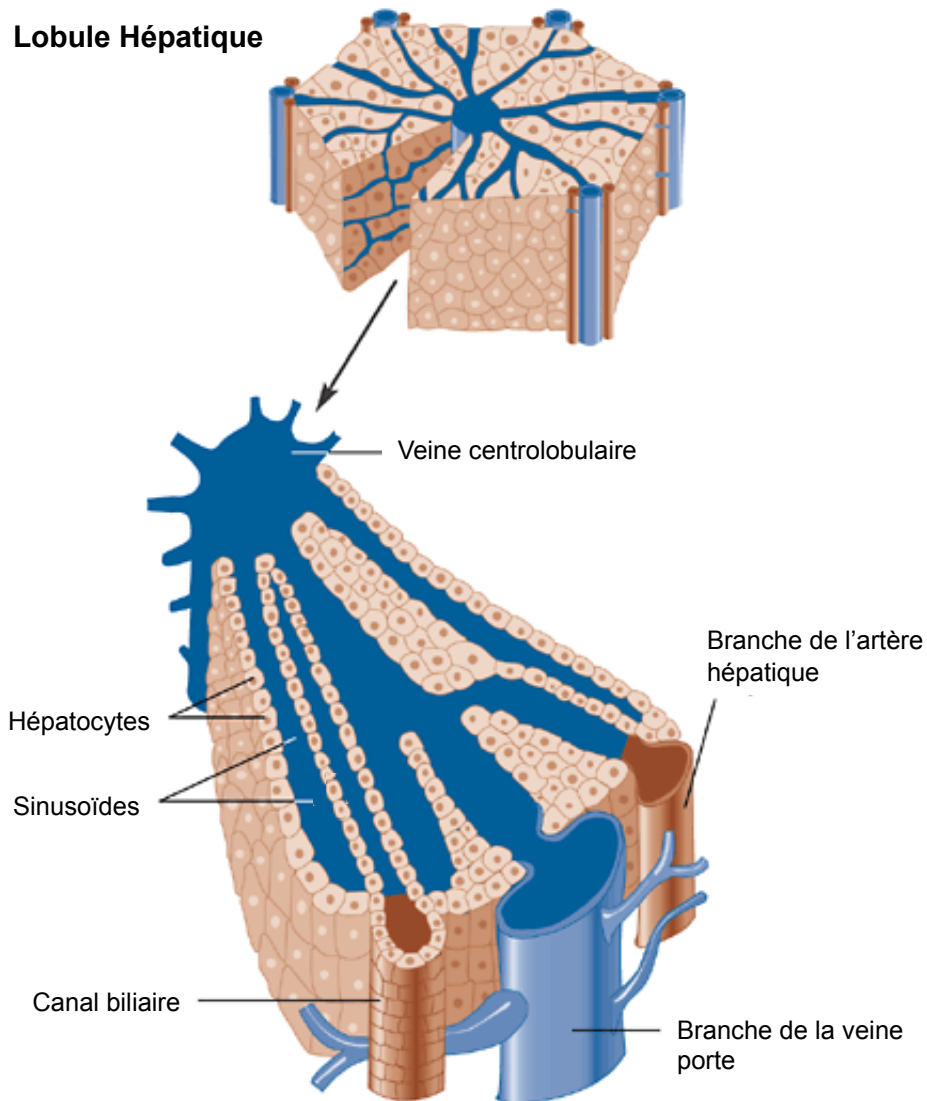
Ce phénomène de régénération du foie pourrait être impliqué dans la pathogenèse de l'HAI. Il a été montré que les niveaux de TGF- $\beta_1$  plasmatique corrélaient avec l'activité de la maladie chez les patients atteints d'HAI (4). Ce TGF- $\beta_1$  proviendrait du foie et serait sécrété par les hépatocytes (4) ou par les cellules non-parenchymateuses (5), selon les

rapports. L'expression du TGF- $\beta_{(1,2 \text{ et } 3)}$  par le foie a aussi été observée lors d'hépatectomies partielles chez le rat (6) et aurait pour rôle la régulation autocrine de la prolifération des hépatocytes lors de la régénération tissulaire. Cependant, le TGF- $\beta_1$  aurait aussi un rôle clé dans la fibrose hépatique (7). Sous l'influence du TGF- $\beta_1$ , les cellules de Ito adopteraient un phénotype de myofibroblastes et sécrèteraient des composantes de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et le collagène (8). Le TGF- $\beta_1$  aurait aussi des effets inhibiteurs sur les enzymes pouvant dégrader la matrice extracellulaire telles que les élastases, les collagénases et les protéinases (8). La régénération continue du foie, présente lors d'une atteinte chronique d'origine autoimmune pourrait par conséquent résulter en des niveaux élevés de TGF- $\beta$  et entraîner l'initiation d'un processus fibrotique qui, à long terme, amènerait le développement d'une cirrhose. La capacité régénératrice exceptionnelle du foie permettrait donc sa survie à court terme suite à l'attaque continue de cellules cytotoxiques, mais mènerait éventuellement à un risque élevé de développement d'un hépatocarcinome.

## 1.2 Organisation structurale du foie

Le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique (**Figure 1**). Les échanges du foie avec le reste de l'organisme se font à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique) se terminant par un réseau capillaire irriguant le parenchyme hépatique. La majorité des cellules du foie sont des hépatocytes (80%) mais on y trouve aussi plusieurs autres types cellulaires: cellules des canaux biliaires, cellules endothéliales, cellules de Kupffer (macrophage), cellules de Ito (ou cellules étoilés (*stellate cells*)), cellules dendritiques, lymphocytes et cellules ovales (cellules pluripotentes impliquées dans la régénération tissulaire hépatique). Les lobules hépatiques sont des groupements de cellules hépatiques, de forme polyédrique, dont l'agencement est déterminé par la disposition des vaisseaux et des voies biliaires intrahépatiques (**Figure 1**). Les

lobules sont séparés les uns des autres par des travées de tissu conjonctif, auxquelles on donne le nom d'espace porte où cheminent des vaisseaux et des canaux biliaires intrahépatiques.



**Figure 1. Lobule hépatique.** Adapté de la figure *Structure of the liver's lobules* produite par le *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA)*.

### **1.3 Propriétés immunologiques uniques**

Le foie possède des particularités immunologiques uniques qui le distinguent des autres organes non-lymphoïdes. Situé à l'interface entre les circulations intestinale et systémique, il a dû développer des mécanismes immunitaires particuliers pour protéger l'organisme contre les pathogènes tout en maintenant un état tolérogénique envers les antigènes inoffensifs provenant de la nourriture et de la flore intestinale.

**1.2.1 Article 1 « Le foie : un organe du système immunitaire ? » (Med Sci (Paris). 2007 Nov;23(11):985-90.)**

Cet article décrit les différents mécanismes immunitaires spécifiques au foie et sa composition très particulière en cellules du système immunitaire. Il discute des conséquences de ces mécanismes immunologiques distinctifs et de l'impact des sous-populations cellulaires présentes sur les phénomènes de tolérance orale, la transplantation hépatique, de développement d'autoimmunité hépatique et des liens possibles avec le développement d'infections hépatiques chroniques.

**Contribution des différents auteurs**

PL : Rédaction de l'article

FA : Supervision et rédaction de l'article

## LE FOIE : UN ORGANE DU SYSTEME IMMUNITAIRE ?

### *THE LIVER: AN ORGAN OF THE IMMUNE SYSTEM?*

Pascal Lapierre, Fernando Alvarez.

#### Correspondance :

Service et unité de recherche en gastroentérologie, hépatologie et nutrition,  
CHU Sainte-Justine, 3175, Côte-Sainte-Catherine, Montréal (Québec) H3T 1C5.  
Tél.: (514) 345-4626, Fax :(514) 345-4999.

#### **Abréviations :**

HAI, Hépatite autoimmune; NK, cellule tueuse naturelle; NKT, cellule T tueuse naturelle;  
iNKT, cellule T tueuse naturelle à chaînes invariables; CPA, cellules présentatrices  
d'antigènes; HLA antigène leucocytaire humain; LPS, lipopolysaccharides; poly (I:C),  
polyriboinosinique-polyribocytidylique.



## **RÉSUMÉ**

Constamment exposé aux antigènes alimentaires et aux produits de la flore intestinale, le foie déploie des mécanismes de tolérance immune tout en maintenant sa capacité à élaborer une réponse efficace en cas d'infection. Par exemple, le foie a la propriété surprenante de pouvoir recruter et de pouvoir activer spécifiquement les lymphocytes T naïfs. Cependant, cette activation, sous certaines conditions, est inefficace et mène à l'élimination des lymphocytes T. Ce mécanisme expliquerait le phénomène de tolérance orale et le maintien sans immunosuppression d'allogreffes hépatiques. Une meilleure connaissance de ces propriétés tolérogéniques uniques nous permettra de mieux comprendre à la fois le processus de l'autoimmunité hépatique et l'installation d'hépatites virales chroniques.

## **ABSTRACT**

The liver stands in a unique position between the gastrointestinal tract and systemic venous system. Its constant exposure to food antigens, bacterial products and potential pathogens through the mesenteric circulation, requires the liver to maintain tolerogenic capabilities while preserving the means to mount effective immune responses. The liver has the unique ability amongst solid organs, to activate naïve CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in an antigen-specific manner. However, this activation can be inefficient and lead to apoptosis. This phenomenon is believed to be involved in both, the development of oral tolerance and the induction of tolerance in liver allografts. The liver is the target of both autoimmune diseases and of chronic viral infections and its unique tolerogenic environment has frequently been suggested as a factor in the development of these diseases. A better grasp of the liver's unique immunological processes would lead to a better understanding of immune tolerance mechanisms and their role in the development of autoimmune diseases and chronic viral infections.

### **Le foie, un organe aux propriétés immunologiques paradoxales**

Le foie est un organe connu pour ses fonctions métaboliques de synthèse, de stockage et de détoxification. Cependant, au cours des récentes années, son rôle dans la régulation de la réponse immunitaire a fait l'objet d'une attention particulière. Situé entre le système veineux gastrointestinal et systémique, le foie reçoit 75% de son apport sanguin de l'intestin et de la rate via la veine porte. De ce fait, il est continuellement exposé aux antigènes alimentaires, à ceux provenant de la flore intestinale, ainsi qu'à d'éventuels microorganismes pathogènes. De plus, les lymphocytes provenant de la rate doivent traverser les sinusoides hépatiques pour atteindre la circulation systémique. Le foie doit donc être le siège de mécanismes immunitaires complexes qui ont pour finalité de permettre le maintien d'un état de tolérance immunitaire envers les antigènes intestinaux tout en étant capable de déployer une réponse efficace contre les agresseurs pathogènes. Le foie est aussi un organe important pour le maintien de l'homéostasie systémique des lymphocytes T, régulant leur apoptose et en permettant l'élimination des cellules activées devenues inutiles à l'issue d'une réaction immune.

### **Architecture et composition cellulaire du foie**

Le foie est principalement constitué d'hépatocytes : 60% de sa population cellulaire. Il est également composé de cellules endothéliales, cellules de Kupffer (macrophages), cellules de l'épithélium biliaire (cholangiocytes), cellules étoilées (ou de Ito), cellules dendritiques et lymphocytes intrahépatiques. De la surface totale des hépatocytes, une proportion de 70% est exposée au flux sanguin des sinusoides. Leur membrane forme des microvillosités qui traversent les pores fenestrés des cellules endothéliales de la paroi des sinusoides [1]. Les pores fenestrés des cellules endothéliales permettent des échanges entre la circulation hépatique et l'espace de Disse et constituent des structures clé dans l'interaction des hépatocytes avec les cellules du système immunitaire (Figure 1).

La composition lymphocytaire du foie est très particulière (Figure 2). Les cellules NKT, présentes en grand nombre, ont la faculté de sécréter des cytokines de type Th1 et Th2 et ainsi d'orienter la réponse immune subséquente [2]. Récemment, deux sous-populations, les NKT CD4-CD8- et les NKT CD4+, ont respectivement été identifiées comme les cellules de la sécrétion de cytokines Th1 et Th2 [3]. Le foie compte aussi une population de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) résidentes. Il s'agit des cellules de Kupffer, macrophages dérivés de monocytes originaires de la moelle osseuse qui résident dans l'espace sinusoïdal vasculaire (Figure 1). Lors d'une infection, elles orchestrent les premières phases de la réponse immune par l'intermédiaire de la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 qui déclenchent l'expansion et la différenciation des NK, cellules cytotoxiques sécrétant l'IFN- $\gamma$ . Dans l'espace porte, loge une population de cellules dendritiques hépatiques. Peu nombreuses et généralement immatures, ces cellules d'origine myéloïde sont aptes à phagocyter et à apprêter divers antigènes [4]. La sécrétion constitutive d'IL-10 et de TGF- $\beta$  par les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoïdales créent un microenvironnement rendant les cellules dendritiques tolérogéniques [4]. L'architecture et la composition cellulaire particulière du foie, ainsi que les chimiokines et les cytokines qui y sont sécrétées, contribuent à faire du foie un milieu tolérogénique unique.

### **Tolérance hépatique**

Chez certains mammifères, la greffe de foie peut être tolérée sans immunosuppression [5, 6]. Chez l'homme, l'immunosuppression est requise pour éviter le rejet, quoiqu'une discordance entre l'antigène leucocytaire humain (HLA) du donneur et du receveur n'affecte pas significativement l'évolution de la greffe [7]. Autre observation surprenante : la greffe simultanée d'un foie et d'un rein provenant d'un même donneur améliore les chances de maintien du rein greffé comparé à la greffe d'un rein seul [8]. La probabilité de survie d'un foie greffé au même moment qu'un autre organe, quant à elle, reste équivalente à celle d'un foie greffé seul. Le foie influencerait donc le système immunitaire du receveur et atténuerait la réponse immune dirigée contre d'autres greffons.

L'irradiation d'un foie avant sa greffe chez le rat à une dose qui détruit tous les lymphocytes résidents mais qui épargne les hépatocytes, entraîne son rejet; en revanche un foie non irradié survit indéfiniment sans immunosuppression chez ces animaux [9]. Ce constat suggère que la tolérance observée serait médiée par les lymphocytes hépatiques. Ces allogreffes stables sont souvent accompagnées de microchimérisme [10]. Le microchimérisme survient lors de la dissémination et la survie dans l'organisme du receveur de cellules (lymphocytes) du donneur. Une étude récente montre que lors d'un microchimérisme stable, les clones T cytotoxiques de l'hôte, qui cause le rejet, sont éliminés de l'organisme [11]. Un microchimérisme permanent est essentiel à l'acceptation du greffon. En effet, il serait à la source du maintien à long terme d'une tolérance envers le greffon car sa disparition entraîne la réapparition des lymphocytes T qui conduisent au rejet [11].

La sécrétion de chimiokines et de cytokines par les cellules hépatiques a souvent été envisagée comme un des mécanismes favorisant la tolérance hépatique [12, 13]. Les cellules dendritiques hépatiques et les cellules NK et NKT ont la capacité de sécréter l'IL-10, cytokine immunosuppressive [14, 15]. Cependant, les cellules NK et NKT sécrètent aussi plusieurs cytokines proinflammatoires (tel l'IFN- $\gamma$ ). Ce paradoxe est évident chez la souris non-obese diabetic (NOD) et la souris déficiente en CD1d. Le transfert de cellules NKT à des souris NOD, dotée d'un nombre réduit de ce type de cellules, prévient l'apparition d'une encéphalomyélite autoimmune [16]. La souris déficiente en CD1d, donc incapable d'activer les cellules NKT, manifeste une plus grande susceptibilité aux infections à *Mycobacterium tuberculosis* et à *Borrelia burgdorferi* [17, 18]. Les cellules NKT jouent donc un rôle important tant dans l'installation de la tolérance immunitaire et la prévention de manifestations autoimmunes que dans la réponse aux infections.

L'administration orale d'antigènes entraîne une tolérance immunitaire systémique pour ceux-ci. Ce processus, appelé tolérance orale, dépend du lien, via la veine porte, entre

l'intestin et le foie. Une déviation chirurgicale du flux sanguin de la veine porte vers la veine cave inférieure empêche le déclenchement de la tolérance orale [19]. Ce mécanisme est essentiel, car les antigènes alimentaires et ceux provenant de la flore intestinale sont des protéines du non soi et comportent donc le potentiel d'activer le système immunitaire. Les cellules NK1.1+ (NK et NKT) hépatiques seraient nécessaires pour l'induction d'une tolérance orale; l'injection d'anticorps déplétant anti-NK1.1 prévient l'induction de tolérance orale de se produire et l'injection de cellules NK1.1+ hépatique d'animaux tolérisés transfère cette tolérance immunitaire [20]. Récemment, dans un modèle expérimental de tolérance orale au nickel, Nowak, et al. ont révélé l'existence d'un mécanisme par lequel les cellules iNKT participent au processus d'apparition d'une tolérance orale [21]. Les cellules B exposées au nickel seraient plus sensibles à l'apoptose et les cellules iNKT, exprimant FasL, provoqueraient l'apoptose de ces cellules qui pourraient ensuite être phagocytées par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques devenues tolérogéniques au nickel donneraient naissance à une population de cellules T régulatrices spécifiques. Cette démonstration a permis de concilier plusieurs observations faites précédemment. En effet, on ne pouvait susciter une tolérance au nickel chez les souris  $J\alpha 18^{-/-}$  chez lesquelles il y a absence de cellules iNKT et le transfert de cellules B provenant de souris ayant reçu du nickel permettait de transférer la tolérance à des souris de type sauvage et non aux souris  $J\alpha 18^{-/-}$ .

### **Le foie, cimetière ou champ d'exécution ?**

L'activation de cellules T par un super-antigène, un peptide soluble spécifique au récepteur T, ou par un anticorps anti-CD3 entraîne leur disparition des organes lymphoïdes. Pour étudier ce phénomène, Huang, et al. ont injecté un peptide de l'antigène grand T de SV40 à des souris transgéniques exprimant un récepteur T spécifique à cet antigène lorsqu'il est présenté par le CMH de classe I. Après cette injection, ils ont observé des cellules CD8+ en apoptose dans le foie [22]. Ainsi est apparue l'hypothèse selon laquelle le foie serait un « cimetière » où les cellules CD8+ activées, chez lesquelles l'apoptose aurait

déjà commencé, seraient captées pour y être éliminées. Cette hypothèse fut ensuite infirmée devant l'observation, chez des souris déficientes en Fas, d'une captation normale de cellules CD8<sup>+</sup> activées dans le foie. L'apoptose n'est donc pas une condition préalable pour qu'il y ait capture des lymphocytes T activés. L'hypothèse actuelle veut que le foie soit plutôt un « champ d'exécution » où des mécanismes hépatiques spécifiques provoqueraient l'apoptose de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> activés.

Cette capture des lymphocytes CD8<sup>+</sup> serait dépendante du TLR-4 (Toll-Like receptor 4), un membre de la famille des récepteurs de type Toll [23]. Les lipopolysaccharides bactériens (LPS) provenant de la flore intestinale, le ligand naturel du TLR-4, l'activerait et provoquerait l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 dans les sinusoides hépatiques. Ces molécules d'adhésions, généralement exprimées aux sites d'inflammations, recruteraient les cellules CD8<sup>+</sup> activées. La liaison de FasL, à la surface des CD8<sup>+</sup> activées, à Fas exprimée sur les cellules de Kupffer déclencherait la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les cellules de Kupffer, entraînant l'apoptose des cellules T CD8<sup>+</sup> [24]. Ce mécanisme essentiel pour l'élimination des cellules T activées à la suite d'une réponse immune, serait aussi en jeu dans le processus de la tolérance immunitaire. En effet, les souris vivant en milieu stérile, où l'absence de LPS hépatique diminue l'expression d'ICAM-1, et les souris déficientes en TLR-4 manifestent une tolérance orale réduite.

### **Activation intrahépatique de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

Le foie, en l'absence d'inflammation, dispose de la faculté de recruter et d'activer, de façon antigène spécifique, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs : il s'agit d'une caractéristique unique parmi les organes non lymphoïdes [25]. À la suite d'un transfert de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs (spécifiques pour H-2Kb) à des souris dont les hépatocytes expriment H-2Kb, on observe une rapide séquestration et une activation par le foie des cellules injectées. Cette activation entraînerait une capacité effectrice réduite et une durée de vie diminuée,

attribuable à un manque de signaux de survie. Cette élimination de clones CD8+ naïfs spécifiques à des antigènes présentés par les cellules hépatiques, a été suggérée comme étant un mécanisme important dans le processus de la tolérance hépatique : tolérance orale aussi bien que tolérance d'allogreffe [26].

Cette capacité qu'a le foie d'activer les cellules CD8+ naïves supposerait l'existence d'un contact direct entre les lymphocytes et les hépatocytes. Or, une telle interaction entre un lymphocyte naïf et une cellule du parenchyme va à l'encontre des principes établis en immunologie, qui décrètent que les cellules endothéliales forment une barrière efficace prévenant l'accès des cellules naïves aux tissus environnant [27]. Récemment, il a été montré que les lymphocytes T CD8+ naïfs circulants peuvent, par des prolongements cytoplasmiques, traverser les pores des cellules endothéliales et faire contact avec les microvillosités des hépatocytes dans l'espace de Disse [1]. Malgré un état de base plutôt tolérogénique, l'activation intrahépatique de lymphocytes CD8+ dirigés contre des antigènes étrangers peut être efficace [28]. L'absence d'activation des lymphocytes T CD8+ par le foie ne peut donc pas, à elle seule, expliquer la capacité de certains microorganismes pathogènes, tels le virus de l'hépatite C, d'échapper au système immunitaire.

La nécessité du soutien des lymphocytes T CD4+ dans l'activation primaire de lymphocytes T CD8+ naïfs est variable : elle dépend de l'antigène; elle peut être requise pour la différenciation en cellules T CD8+ mémoires voire pour leur survie. Les lymphocytes T CD8+ sont préférentiellement retenus dans le foie, contrairement aux lymphocytes T CD4+. En effet, le faible nombre de cellules CD4+ décelées dans le foie (Figure 2) laisse croire que cet organe n'aurait pas la capacité de recruter ni d'activer les lymphocytes T CD4+ malgré la présence d'antigènes solubles et de CMH de classe II sur les cellules endothéliales des sinusoides [29]. Cette constatation a mené à la formulation d'une hypothèse pour tenter de concilier les différentes observations concernant l'activation

intrahépatique des lymphocytes T CD8+ en l'absence d'aide des CD4+ [13]. En situation physiologique, les cellules endothéliales activeraient les lymphocytes T CD8+ naïfs mais l'absence d'aide des CD4+ entraînerait leur mort à cause du manque de signaux de survie, tel l'IL-2 (Figure 3c) [30]. Lors d'une infection, l'exposition des cellules endothéliales des sinusoides à des agents viraux ou bactériens entraînerait une activation primaire efficace des lymphocytes T CD8+, indépendante de l'aide des lymphocytes T CD4+, permettant ainsi la survie de ces cellules activées (Figure 3b).

### **Réponse immunitaire efficace et autoimmunité**

Le transfert de lymphocytes T naïfs, spécifiques à un antigène exprimé exclusivement par les hépatocytes, n'entraîne pas une hépatite [31]. Un signal supplémentaire est donc nécessaire pour susciter une réponse immunitaire contre les cellules hépatiques. Récemment, Lang, et al. ont montré le rôle majeur des récepteurs de type Toll dans le mécanisme de réponse immunitaire contre le foie [32]. Le TLR3, qui reconnaît les motifs poly (I:C) des ARN viraux à double brins, serait essentiel au processus qui conduit à une réponse contre le foie. L'activation du système immunitaire, via la liaison du poly (I:C) au TLR3, déclencherait la sécrétion d'IFN- $\alpha$  et de TNF- $\alpha$  [32]. Ces cytokines entraîneraient l'expression hépatique de la chimiokine CXCL9 intermédiaire obligée de l'infiltration du foie par les lymphocytes T CD8+ [32]. Ainsi, la position anatomique du foie et sa constante exposition aux produits de la flore intestinale aurait permis l'émergence d'un mécanisme où un motif viral (poly I:C) permettrait de 'briser' la tolérance hépatique et entraînerait une réponse immunitaire efficace tandis qu'un motif bactérien, tel le LPS, induirait une activation inefficace et une tolérance immunitaire.

L'équipe de notre laboratoire et celles d'autres groupes de recherche, ont montré que l'activation en périphérie de lymphocytes T dirigés contre des antigènes hépatiques provoque une hépatite auto-immune [31, 33, 34] mais que l'activation intrahépatique de ces mêmes cellules ne déclenche pas un processus similaire (Figure 3) [31]. L'acquisition



d'une autoimmunité pourrait donc résulter soit d'une activation périphérique de lymphocytes T spécifiques à des antigènes hépatiques soit de l'activation hépatique de lymphocytes T naïfs en présence de motifs viraux pro-inflammatoires.

En conclusion, le foie s'avère un organe exerçant un rôle central dans l'homéostasie du système immunitaire et, de plus, doté de propriétés tolérogéniques uniques. À terme, la mise au point d'immunothérapies précises ciblant les mécanismes de l'homéostasie immunitaire hépatique permettront la reconstitution d'une tolérance immunitaire ou, l'induction d'une réponse immune efficace pour les patients atteints de maladies autoimmunes hépatiques ou d'infections chroniques par les virus B et C de l'hépatite.

**REMERCIEMENTS**

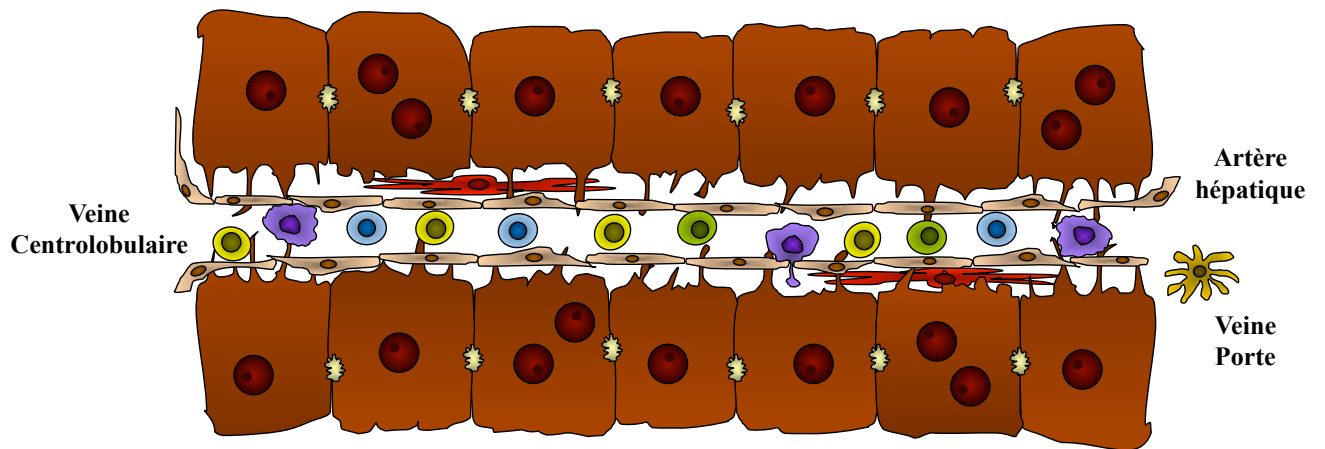
Les auteurs remercient Dr Claude C. Roy, MD pour ses commentaires et ses précieux conseils lors de la rédaction du manuscrit. M. Pascal Lapierre bénéficie d'une bourse de formation du Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ).

## RÉFÉRENCES

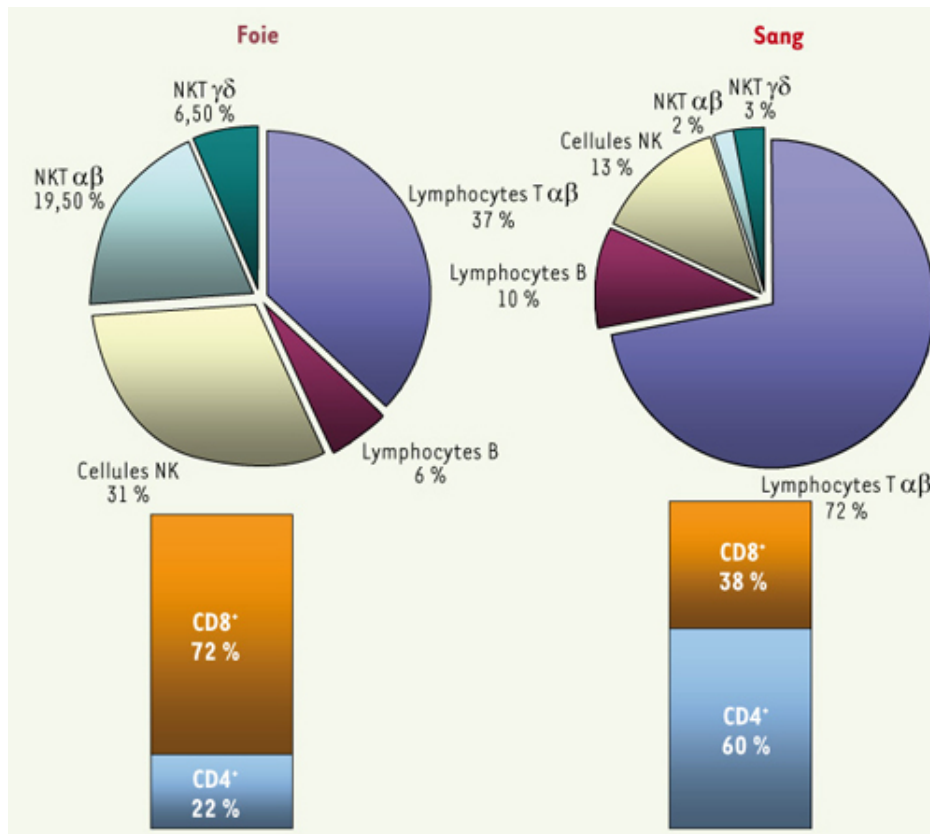
1. Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, et al. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2006; 44: 1182-90.
2. Doherty DG, Norris S, Madrigal-Estebas L, et al. The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and CD3+CD56+ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns. *J Immunol* 1999; 163: 2314-21.
3. Thedrez A, de Lalla C, Allain S, et al. CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells. *Blood* 2007.
4. Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003; 52: 307-14.
5. Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969; 223: 472-6.
6. Houssin D, Gigou M, Franco D, et al. Specific transplantation tolerance induced by spontaneously tolerated liver allograft in inbred strains of rats. *Transplantation* 1980; 29: 418-9.
7. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, et al. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999; 1: 334-42.
8. Rasmussen A, Davies HF, Jamieson NV, et al. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 1995; 59: 919-21.
9. Sun J, McCaughan GW, Gallagher ND, et al. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 1995; 60: 233-6.
10. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, et al. Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 1992; 340: 876-7.
11. Bonilla WV, Geuking MB, Aichele P, et al. Microchimerism maintains deletion of the donor cell-specific CD8+ T cell repertoire. *J Clin Invest* 2006; 116: 156-62.

12. Lapierre P, Beland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007; 149: 107-13.
13. Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, et al. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* 2006; 213: 101-18.
14. Goddard S, Youster J, Morgan E, et al. Interleukin-10 secretion differentiates dendritic cells from human liver and skin. *Am J Pathol* 2004; 164: 511-9.
15. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 1379-88.
16. Mars LT, Laloux V, Goude K, et al. Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2002; 168: 6007-11.
17. Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, et al. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1999; 189: 1973-80.
18. Kumar H, Belperron A, Barthold SW, et al. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 2000; 165: 4797-801.
19. Yang R, Liu Q, Grosfeld JL, et al. Intestinal venous drainage through the liver is a prerequisite for oral tolerance induction. *J Pediatr Surg* 1994; 29: 1145-8.
20. Trop S, Samsonov D, Gotsman I, et al. Liver-associated lymphocytes expressing NK1.1 are essential for oral immune tolerance induction in a murine model. *Hepatology* 1999; 29: 746-55.
21. Nowak M, Kopp F, Roelofs-Haarhuis K, et al. Oral nickel tolerance: Fas ligand-expressing invariant NK T cells promote tolerance induction by eliciting apoptotic death of antigen-carrying, effete B cells. *J Immunol* 2006; 176: 4581-9.
22. Huang L, Soldevila G, Leeker M, et al. The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1994; 1: 741-9.
23. John B, Crispe IN. TLR-4 regulates CD8+ T cell trapping in the liver. *J Immunol* 2005; 175: 1643-50.

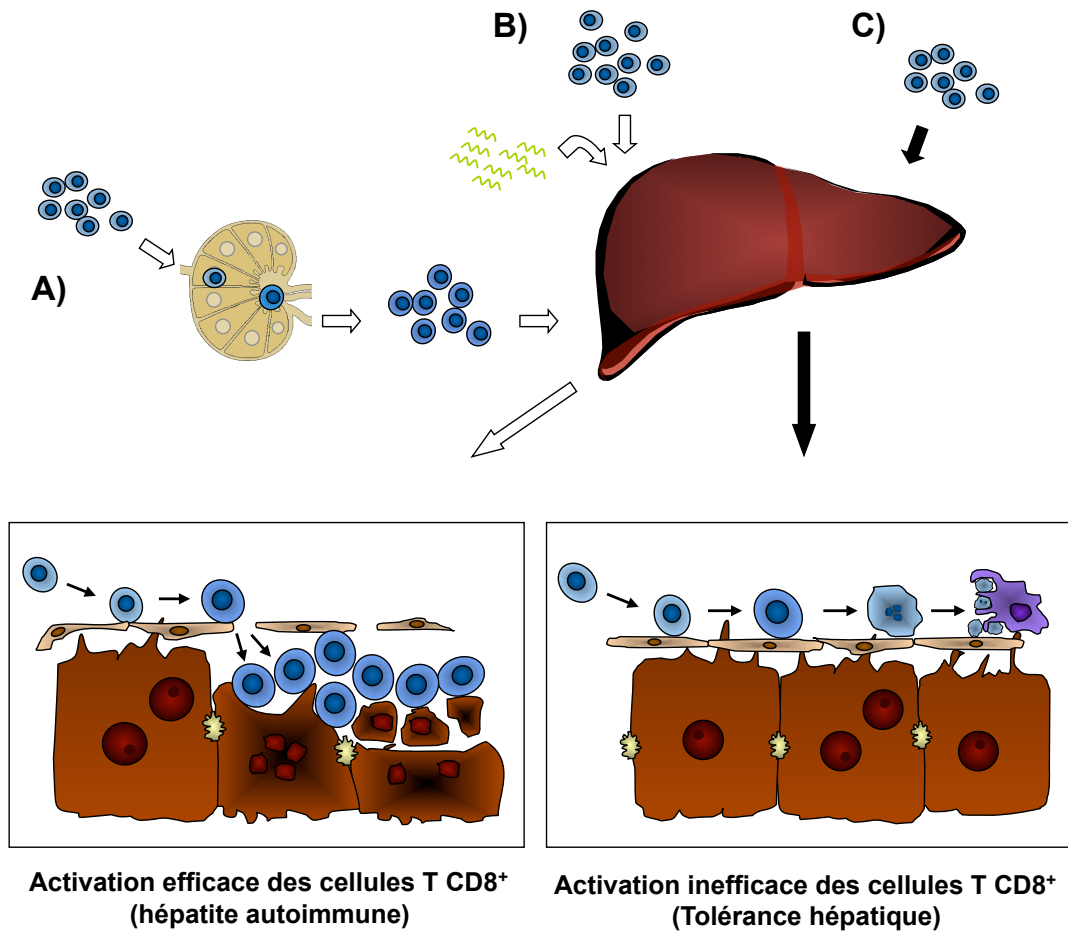
24. Murray DA, Crispe IN. TNF-alpha controls intrahepatic T cell apoptosis and peripheral T cell numbers. *J Immunol* 2004; 173: 2402-9.
25. Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, et al. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol* 2001; 166: 5430-8.
26. Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol* 2005; 26: 512-7.
27. Mackay CR, Marston WL, Dudler L. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 1990; 171: 801-17.
28. Wuensch SA, Pierce RH, Crispe IN. Local intrahepatic CD8+ T cell activation by a non-self-antigen results in full functional differentiation. *J Immunol* 2006; 177: 1689-97.
29. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999; 163: 3202-10.
30. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, et al. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol* 1999; 11: 1225-38.
31. Bowen DG, Zen M, Holz L, et al. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004; 114: 701-12.
32. Lang KS, Georgiev P, Recher M, et al. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 2456-63.
33. Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, et al. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2002; 169: 4889-96.
34. Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, et al. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004; 39: 1066-74.



**FIGURE 1. Sinusoïdes hépatiques.** Les sinusoides hépatiques sont des capillaires étroits délimités par des cellules endothéliales fenestrées reliant l'artère hépatique et la veine porte à la veine centrolobulaire. L'espace entre la membrane sinusoidale des hépatocytes et les cellules endothéliales est appelé espace de Disse. Les hépatocytes, leurs prolongements cytoplasmiques, sont en contact avec l'espace de Disse, ainsi qu'avec la lumière des sinusoides par l'intermédiaires des pores fenestrés des cellules endothéliales. Le faible flux sanguin et le diamètre réduit des sinusoides permettent aux lymphocytes T (bleu), aux cellules NK (jaune) et aux NKT (vert) d'interagir avec l'épithélium vasculaire, les hépatocytes et les cellules de Kupffer (violet). Ces cellules de Kupffer sont aussi en contact avec les antigènes, les toxines et les microorganismes provenant de l'intestin, permettant ainsi leur élimination. Les cellules de Ito (rouge), responsables du stockage de la vitamine A et de la synthèse de collagène, sont présentes dans l'espace de Disse.



**FIGURE 2. Population lymphoïde présente dans le foie et dans le sang.** Le foie humain comporte environ  $10^{10}$  lymphocytes des systèmes immunitaires inné et acquis. Cette population lymphocytaire est très différente de celle retrouvée en dans le sang périphérique. Parmi les lymphocytes  $CD3^+$  hépatiques, le ratio  $CD4^+/CD8^+$  est l'inverse de celui du sang périphérique. La majorité des cellules NKT  $\alpha\beta$  exprime un répertoire restreint de chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  qui reconnaissent des antigènes non-peptidiques présentés par la molécule CD1d. Ces cellules sont appelées iNKT (pour *invariable natural killer T cell*). Les cellules NK, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  et les cellules iNKT  $\alpha\beta$  représentent près de 60% des lymphocytes hépatiques, comparativement à 18% à la périphérie. Ceci suggère que le foie serait un lieu de rencontre initial d'antigènes où le système immunitaire inné, ou adaptatif de faible diversité, aurait un rôle important.



**FIGURE 3. Mécanismes physiologiques et pathologiques de l'immunité hépatique.** **A)** Lorsque des lymphocytes T autoréactifs CD8<sup>+</sup> naïfs, spécifiques à des antigènes hépatiques, sont activés dans les nodules lymphatiques périphériques, cette activation est efficace et provoque une hépatite autoimmune. **B)** Après une exposition à des motifs viraux entraînant une activation du système immunitaire inné, comme, par exemple, la liaison du poly (I:C) avec les TLR3 des cellules endothéliales, les cellules endothéliales des sinusoides sont aptes à activer les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques à des antigènes hépatiques. Cette activation, indépendante de l'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, permet la survie des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et l'élimination de cellules infectées ou le développement d'une hépatite autoimmune. **C)** En situation physiologique, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs spécifiques à des antigènes hépatiques reconnaissent les antigènes présentés par les cellules endothéliales des sinusoides, via le CMH I, ou par les hépatocytes eux-mêmes. L'expression de molécules de co-stimulations par les cellules endothéliales (CD80 et CD86) permet ensuite l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mais l'absence de signaux de



survie (IL-2, par exemple) entraîne leur mort par apoptose. Ce mécanisme de délétion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> serait central dans le développement de la tolérance hépatique

## 2. Hépatite autoimmune

L'hépatite autoimmune (HAI) est une maladie d'étiologie inconnue où l'infiltration du foie par des lymphocytes autoréactifs mène à la destruction progressive du parenchyme hépatique (9). En absence de traitement, elle progresse vers la cirrhose et le temps de survie médian est alors de 3.3 ans (10). Les différentes observations cliniques et l'étude de la pathogenèse de l'HAI ont amené les chercheurs à émettre l'hypothèse que cette maladie, comme la majorité des maladies autoimmunes, serait multifactorielle.

L'HAI se classe en deux types selon les autoanticorps présent dans le sérum du patient (11). L'HAI de type 1 est définie par la présence d'autoanticorps anti-muscles lisses (SMA pour *smooth muscle antibody*) et/ou anti-nucléaire (ANA pour *anti-nuclear antibody*). Le type 2 est quant à lui défini par la présence d'autoanticorps dirigés contre le cytochrome P450 2D6 (LKM1 pour *anti-liver-kidney microsome type 1 antibody*) et/ou contre la formiminotransférase-cyclodéaminase (LC1 pour *liver-cytosol type 1 antibody*).

### 2.1 Perspective historique

Avant les années 40, le développement d'une cirrhose suite à une hépatite chronique était généralement attribué à une toxine tel l'alcool, à une infection provenant des voies biliaires, à la déposition dans le parenchyme d'un pigment (notamment le fer) ou d'une substance amyloïde, à un désordre nutritionnel ou à ce qui était référé à l'époque comme étant une « *healed acute yellow atrophy* » (12). C'est durant la deuxième guerre mondiale que les cliniciens firent l'observation lors des nombreuses épidémies d'hépatite virale parmi les soldats et les civils, que ces infections ne résultaient pas seulement en la guérison ou la mort (13). L'observation de cas d'hépatites virales prolongées amena l'utilisation du terme « hépatite chronique » pour décrire ce phénomène (13), un terme jusque là erronément synonyme de cirrhose (14). Ceci conduisit à l'emploi des termes « hépatite chronique active » lorsqu'il y avait présence de symptôme(s) tandis qu'« hépatite chronique inactive » était utilisé lorsqu'il y avait absence de symptômes malgré un bilan hépatique perturbé.

En septembre 1950, Dr Jan Gösta Waldenström (1906-1966) décrit, au premier congrès de la société allemande des désordres digestifs et métaboliques tenu depuis la deuxième guerre mondiale, une nouvelle forme d'hépatite chronique majoritairement présente chez des jeunes femmes (15). Ces hépatites étaient caractérisées par une cirrhose, une infiltration plasmocytaire du foie et une hypergammaglobulinémie. Ces cas ont ensuite été décrits en détail par le groupe du Dr Henry Kunkel (16) en 1958. On fit donc référence à ces patientes durant plusieurs années comme les *Kunkel-Waldenström girls*. L'arrivée des biopsies par aiguille permit la classification d'hépatite chronique active ou inactive selon des critères histologiques, et non plus seulement par la présence de symptômes (17). Cette maladie complexe, présentant un portrait clinique souvent très varié, amena l'utilisation de près de quarante termes différents à travers le monde tels que *chronic liver disease in young women, cirrhosis in young females, plasma cell hepatitis, malignant hepatitis, autoclastic hepatitis, follicular hepatitis, Waldenström's hepatitis, active juvenile cirrhosis*, « cirroses dysprotéïniques d'origine inconnue chez la femme », progressive hypergammaglobulinämische hepatitis ou *Bearn-Kunkel-Slater syndrome* pour définir ce qui allait s'avérer être l'hépatite autoimmune.

Dans un papier qui allait s'avérer être déterminant pour l'étude de la pathogénèse et la classification de l'HAI, Dr Ian Mackay décrit l'« hépatite lupoïde » chez 7 patientes présentant une hépatite chronique avec hypergammaglobulinémie (18). Huit ans auparavant, les cellules lupus érythémateux (*LE cells*) furent décrites chez les patients atteints de lupus érythémateux et furent associées au « facteur antinucléaire » qui s'avéra être les autoanticorps anti-noyaux (ANA) (19). L'identification chez les 7 patientes du Dr Mackay de cellules LE et de ce « facteur antinucléaire » l'amena à décrire l'HAI comme une manifestation possible du lupus érythémateux, d'où l'utilisation du terme « hépatite lupoïde ».

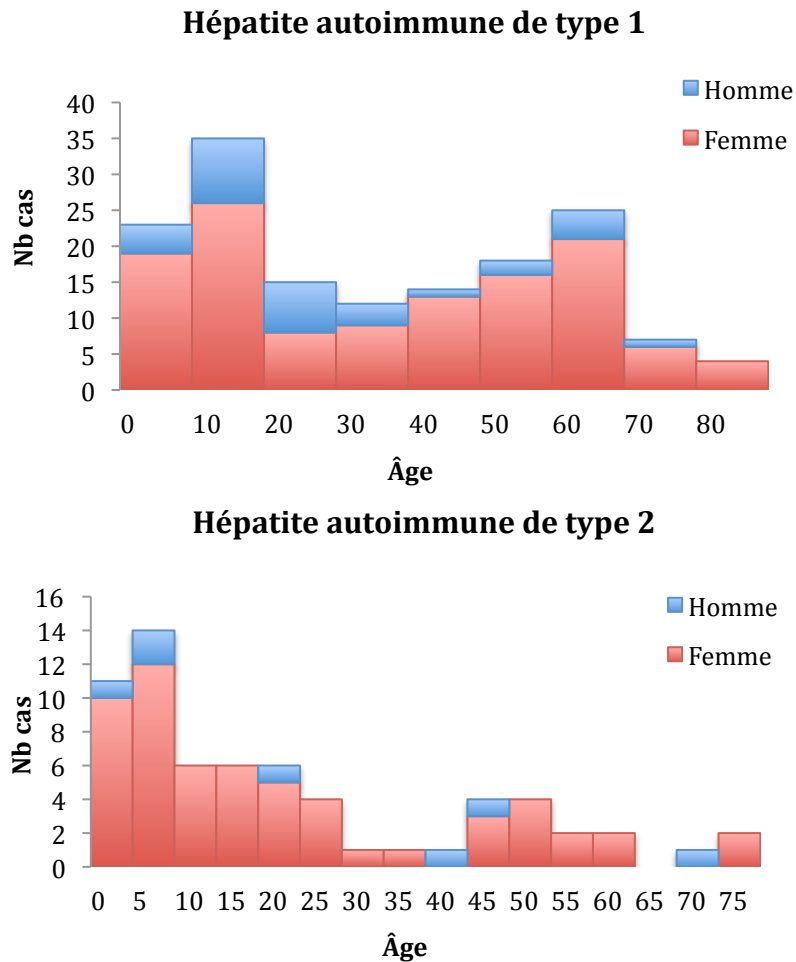
L'utilisation de ce terme permit la définition d'une forme d'hépatite chronique active comme étant une maladie autoimmune et ceci orienta la recherche sur les origines de cette pathologie pour les décennies à venir. Éventuellement, le Dr Mackay réalisa que le

lupus érythémateux et l'HAI étaient deux pathologies autoimmunes distinctes, et le terme « hépatite autoimmune » fut alors préféré à celui d' « hépatite lupoïde » (20).

## 2.2 Présentation clinique

L'hépatite autoimmune est une pathologie principalement pédiatrique : 40% des cas d'hépatite autoimmune de type 1 et près de 80% des cas de type 2 sont diagnostiqués avant l'âge de 18 ans (21, 22), certains cas ayant été diagnostiqués dès l'âge de 6 mois. Le pic majeur d'incidence de l'HAI se situe à l'âge prépubertaire, l'âge moyen de déclenchement étant de 10 ans pour l'HAI de type 1 et de 6.5 ans pour le type 2 (21, 22) (**Figure 2**). Comme dans plusieurs maladies autoimmunes, une forte prépondérance féminine a été observée chez les patients : en effet, de 75 à 80% des patients atteints d'HAI de type 1 sont de sexe féminin et cette proportion atteint 90% pour les patients atteints d'HAI de type 2 (9) (**Figure 2**).

L'hépatite autoimmune peut se présenter cliniquement par un syndrome d'hépatite aiguë ou, plus rarement (<5%), par une hépatite fulminante ou sous fulminante (21-24). L'HAI se présente fréquemment sous forme d'une hépatite chronique, avec les signes cliniques qui y sont associés tels une hépatomégalie, une splénomégalie, la présence d'un angiome stellaire ou d'un érythème palmaire (22, 25). Chez 10 à 15 % des patients, c'est la découverte fortuite d'une hépatomégalie ou d'un bilan hépatique perturbé (augmentation des transaminases) qui mène au diagnostic d'une hépatite autoimmune (9). Chez une minorité de patients, c'est une maladie autoimmune extrahépatique accompagnée de symptômes inhabituels pour cette maladie qui mène au diagnostic d'HAI. Chez la population d'âge pédiatrique, c'est généralement sous forme d'un syndrome d'hépatite aiguë que l'HAI se présente cliniquement (9).

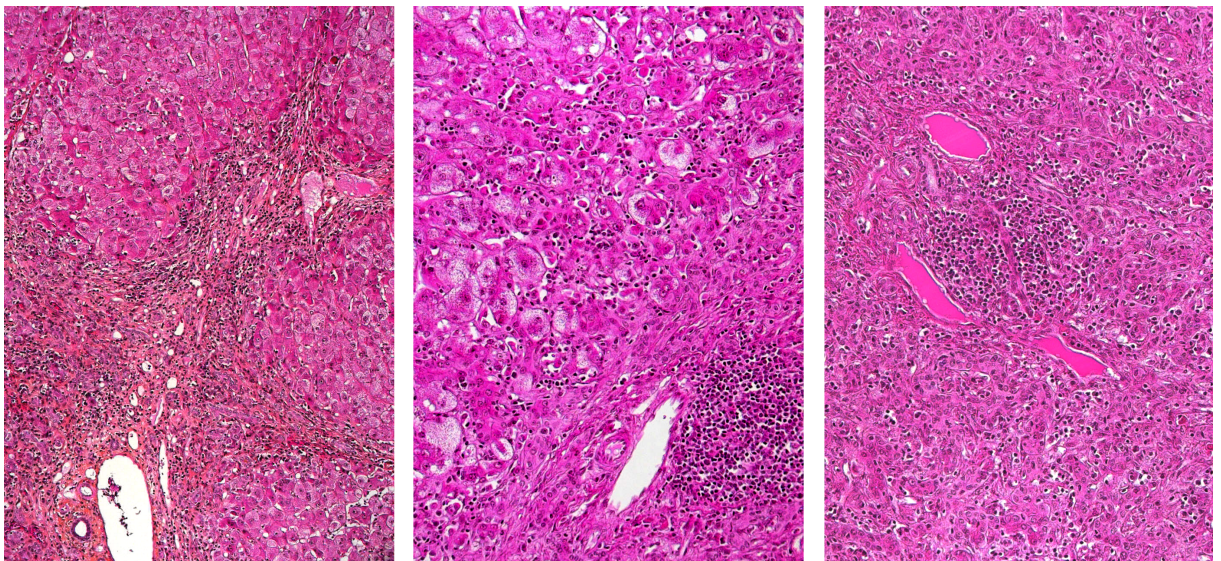


**Figure 2. Incidence de l'hépatite autoimmune selon l'âge et le sexe au moment du diagnostic.** Une forte prépondérance féminine est observée tant chez les patients atteints d'HAI de type 1 que de type 2. (Dr Homber (Hôpital Saint-Antoine, Paris), communication personnelle).

### 2.3 Caractéristiques histologiques

L'histologie du foie lors d'une hépatite autoimmune est très typique, au point où la présence d'un infiltrat lymphoplasmocytaire au niveau des espaces portes soit un des critères majeurs lors du diagnostic de la maladie (**Tableau 1**) (26). L'infiltrat

lymphoplasmocytaire est constitué majoritairement de lymphocytes T CD4+, mais aussi de lymphocytes T CD8+, de lymphocytes B et de plasmocytes (9). L'envahissement du lobule hépatique par les lymphocytes produit des lésions appelées hépatites d'interface (**Figure 3**). Une nécrose périportale en pont ainsi que la présence d'hépatocytes en rosettes sont également des trouvailles fréquentes de l'histologie des patients avec HAI (**Figure 3**). L'HAI est une maladie d'évolution fluctuante et ceci se reflète dans l'histologie, où les niveaux d'inflammations portale, périportale et lobulaire peuvent varier grandement (9). Ceci pourrait expliquer que chez près de 10 à 40% des biopsies de patients avec HAI, il n'y ait absence ou présence que d'une très légère inflammation (21, 22, 27).



**Figure 3. Histologie de l'hépatite autoimmune.** Infiltration lymphoplasmocytaire avec hépatite d'interface et nécrose en pont des lobules hépatiques (*gauche*). Transformation des hépatocytes en cellules géantes et infiltration importante du lobule hépatique (*milieu*). Formation de rosettes hépatocytaires (*droite*). Adapté de Alvarez F. *et al* Clin Liver Dis. 2006 (9).

Une des caractéristiques histologiques de l'HAI est la présence, chez 10 à 20% des patients, d'hépatocytes multinucléés (cellules géantes) (**Figure 3**) (22). Des lésions au niveau des canaux biliaires sont observées dans 30% des cas d'HAI, et ceci en absence de cholangite sclérosante (28).

## 2.4 Caractéristiques biochimiques

L'alanine aminotransférase (ALT) est une enzyme présente dans les cellules de plusieurs organes mais est très abondante au foie (dans les hépatocytes). Lors d'une atteinte hépatique avec lyse d'hépatocytes, cette enzyme est relâchée dans la circulation sanguine. Lors d'une HAI, les niveaux sériques d'ALT varient entre 1.5 et 50 fois la valeur normale (9), le cours fluctuant de l'HAI étant responsable de cette grande variation. Les niveaux de gamma-glutamyl transférase et de phosphatase alcaline, quant à eux, sont généralement à des niveaux normaux ou peu élevés (27). Une des caractéristiques de l'HAI est la présence de niveaux élevés d'immunoglobulines G (IgG) circulantes et de niveaux normaux d'IgM et d'IgA (9). Cette accumulation d'IgG serait due à une activation et à une prolifération non antigène spécifique de lymphocytes B (9) et est l'une des caractéristiques biochimiques de l'HAI (**Tableau 1**). Les niveaux les plus élevés sont retrouvés chez les patients atteints d'HAI de type 1, avec une moyenne de près de 30 g/L, alors que chez les patients avec une HAI de type 2, les taux moyen sont de 20 g/L (9).

Paramètre	Valeur	Points
ANA ou SMA	≥1:40	1
ANA ou SMA ou LKM1 ou SLA	≥1:80 ≥1:40 +	2*
IgG	> Limite supérieure	1
	> 1.1 fois la limite supérieure	2
Histologie hépatique (avec évidence d'hépatite)	Compatible avec une HAI	1
	Typique d'une HAI	2
Absence d'hépatite virale	Oui	2
		≥6: HAI probable
		≥7: HAI

**Tableau 1. Critères pour le diagnostic de l'hépatite autoimmune.** Critères simplifiés pour le diagnostic de l'HAI, en présence de signes cliniques d'hépatite, basés sur des paramètres sérologiques et histologiques (26). \*Total de points maximum lors de l'addition pour tous les autoanticorps présents. Adapté de Hennes *et al. Hepatology*, 2008.

## 2.5 Autoanticorps

La présence d'autoanticorps circulants est l'une des caractéristiques de l'HAI et l'un des critères principaux de son diagnostic (**Tableau 1**) (26). Ils ne sont cependant pas pathogéniques, contrairement aux autoanticorps de certaines autres maladies autoimmunes telles que le lupus érythémateux ou l'arthrite rhumatoïde. En effet, ils ne médient pas



directement la cytolysé hépatique, un phénomène que l'on croit dû à l'action des lymphocytes T cytotoxiques.

Comme discuté précédemment, c'est le type d'autoanticorps circulants chez les patients atteints d'HAI qui a mené à la classification de celle-ci en deux types (**Tableau 2**) (11), soit l'HAI de type 1 définie par la présence d'autoanticorps anti-muscle lisses (SMA pour *smooth muscle antibody*) et/ou anti-nucléaire (ANA pour *anti-nuclear antibody*) et le type 2, caractérisé par la présence d'autoanticorps anti-LKM1 (*anti-Liver-kidney microsome type 1 antibody*) et/ou anti-LC1 (*Liver-cytosol type 1 antibody*). L'anticorps anti-SLA (*soluble liver antigen*) est quant à lui présent tant dans l'HAI de type 1 que dans celle de type 2.

Autoanticorps	Antigène	HAI de type 1	HAI de type 2
SMA	Filaments d'actines	+	-
ANA	Antigènes nucléaires variés	+	+/-
LKM1	P450 2D6 (CYP2D6)	-	+
LC1	Formiminotransférase-cyclodéaminase (FTCD)	-	+
SLA	tRNP <sup>(Ser)<sub>sec</sub></sup>	+	+

**Tableau 2. Autoanticorps présents chez les patients atteints d'une hépatite autoimmune.** Abréviations : SMA, anticorps anti-muscles lisses; ANA, anticorps anti-noyaux; LKM1, anticorps anti-microsomes du foie et du rein de type 1; LC1, anticorps anti-cytosol du foie de type 1 et SLA, anticorps anti-antigènes solubles du foie.

### 2.5.1 Anticorps anti-nucléaires (ANA)

Les autoanticorps anti-nucléaires ou ANA (*anti-nuclear antibody*) ont été décrits pour la première fois en 1954 (29), peu de temps après la découverte des cellules « lupus érythémateuses » (*LE cells*) par Hargraves *et al.* en 1948 (19). Ce facteur sérique relié à la présence de ces cellules lupoïdes fut subséquemment nommé « facteur antinucléaire », puis finalement « anticorps anti-nucléaires » ou ANA. C'est la présence de ces anticorps anti-nucléaires et de cellules LE chez une patiente atteinte d'hépatite chronique active (nom donné à l'HAI à cette époque) qui a mené à l'utilisation du terme « hépatite lupoïde » pour désigner l'atteinte des patients avec HAI (30).

Ces anticorps ANA ne ciblent pas une seule protéine, mais un ensemble de structures présentes au noyau incluant les centromères, les histones, les ADN doubles brins, la chromatine et les complexes ribonucléoprotéiques (31). Il n'existe pas de patron caractéristique associé aux patients atteints d'HAI, mais une réactivité homogène anti-chromatine est la réponse la plus fréquemment observée par immunofluorescence chez ces patients (31).

Les anticorps ANA sont les seuls autoanticorps présents chez environ 15% des patients atteints d'HAI de type 1 mais sont présents en combinaison avec des autoanticorps anti-SMA chez environ 60% des patients (31). Les titres d'ANA chez les patients avec une HAI varient de 1:10 à 1:100 000 (9).

Les anticorps anti-nucléaires sont les autoanticorps les moins spécifiques présents chez les patients HAI puisqu'ils peuvent être également présents chez des patients atteints d'autres maladies autoimmunes du foie telles la cirrhose biliaire primitive ou la cholangite sclérosante primitive, et d'hépatites telles les hépatites virales chroniques, les hépatites toxiques, les stéatohépatites non alcooliques et les hépatites alcooliques (31). Ils peuvent aussi être présents dans plusieurs autres maladies autoimmunes telles le lupus érythémateux (95 à 100% des patients), la sclérodermie (60 à 80% des patients) et le syndrome de Sjögren (40 à 70% des patients) (32).

### 2.5.2 Anticorps anti-muscles lisses (SMA)

Les autoanticorps anti-muscles lisses (SMA) furent décrits pour la première fois chez des patients avec maladies du foie en 1965 par le groupe de Johnson *et al.* (33). Ces autoanticorps doivent leur nom au patron caractéristique présent en immunofluorescence où ils marquent les fibres de muscles lisses présentes sur des coupes d'estomacs de rats (33). En 1976, Gabbiani *et al.* ont identifié l'actine filamentaire (F) comme étant la cible majeure des autoanticorps anti-muscles lisses. Cependant, suite au développement de tests diagnostiques utilisant de l'actine F purifiée, il s'est avéré que cette protéine n'était pas entièrement responsable de la réactivité en immunofluorescence observée contre les filaments d'actines (34).

Les autoanticorps anti-muscles lisses, observés dans d'autres pathologies, ne seraient pas uniquement dus à des autoanticorps ciblant les polymères d'actine mais aussi à d'autres protéines intimement associées à ces filaments, telles que la tubuline, la vimentine, la desmine et la squelettine (31). Pour permettre leur distinction, le *international autoimmune hepatitis group* proposa en 2004 que le terme « anti-microfilaments » soit utilisé pour décrire les autoanticorps présents chez les patients ayant une HAI (35). Les autoanticorps SMA sont retrouvés chez les patients atteints d'HAI à des titres variant de 1 :10 à 1 :500 000, en association ou non avec des autoanticorps ANA (9).

### 2.5.3 Autoanticorps anti-LKM1

Parmi les autoanticorps présents lors d'HAI, les autoanticorps anti-LKM1 sont ceux qui ont été le mieux caractérisés. Les anticorps anti-LKM1 ont été décrits pour la première fois en association avec l'HAI par l'équipe du Dr Deborah Doniach (36, 37) en 1973, et c'est cette dernière qui utilisa pour la première fois le terme *anti-liver kidney microsomal antibodies (LKM1)* (38). Ce terme fait référence aux organes où cet antigène est exprimé (foie et reins) et, indirectement, à sa localisation subcellulaire. En effet, les microsomes ne sont pas des organelles mais sont plutôt des vésicules produites lorsqu'il y a fragmentation

des membranes lors de la préparation par centrifugation différentielle de sous-fractions cellulaires. Le patron en immunofluorescence de cet autoanticorps est très caractéristique; il marque spécifiquement les tubules proximaux des reins de rats et fortement le cytoplasme des hépatocytes, tout en ne marquant pas les cellules pariétales des coupes d'estomacs de rats (35). Cette propriété des anti-LKM1 a permis de les différencier des autoanticorps AMA (*anti-mitochondrial antibody*) présents chez les patients atteints de cirrhose biliaire primitive, une autre maladie autoimmune ciblant le foie. En effet, bien que tous deux donnent un patron d'immunofluorescence similaire sur coupes de foie et de reins de rats, les autoanticorps AMA marquent les cellules pariétales de la paroi de l'estomac (35).

En 1987, Homberg *et al.* ont proposé que les patients avec des autoanticorps anti-LKM1 formaient un nouveau type d'HAI, l'HAI de type 2 (39). En 1988, Alvarez *et al.* ont identifié la cible des autoanticorps anti-LKM1 comme étant une protéine du réticulum endoplasmique, le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) (**Tableau 2**) (40). Indépendamment, deux autres équipes ont également identifié le CYP2D6 comme étant la cible de ces autoanticorps (41, 42). Le cytochrome P450 2D6 est une enzyme exprimée majoritairement au foie et est responsable de la métabolisation de xénobiotiques. Le CYP2D6 est responsable de la métabolisation de près de 25% des médicaments et est polymorphique dans la population (43).

Cette découverte majeure a été la première description d'une protéine exprimée presque exclusivement au foie comme étant la cible d'autoanticorps dans l'HAI. Jusqu'alors, les cibles des autoanticorps (ANA, SMA) étaient plutôt des structures cellulaires ubiquitaires, et il paraissait peu probable que le ciblage de ces structures soit en lien direct avec l'étiologie de l'HAI, une maladie autoimmune spécifique à un organe.

Plusieurs groupes se sont donc vivement intéressés au CYP2D6 dans l'HAI de type 2 afin d'élucider la pathogenèse de cette maladie complexe. Certains ont postulé que le cytochrome P450 2D6 pouvait être retrouvé sur la membrane plasmique des hépatocytes et que par conséquent une réactivité B contre cette protéine chez les patients atteints d'HAI de type 2 pourrait participer directement à la pathogenèse de la maladie (44). Cependant, le

CYP2D6 étant une protéine ancrée sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique, une localisation à la surface plasmique de l'hépatocyte supposerait une modification du peptide signal à l'extrémité N-terminale de la protéine pour entraîner sa localisation du côté luminal du réticulum endoplasmique. Une localisation à la surface serait alors possible via un bourgeonnement du réticulum endoplasmique et une fusion avec la membrane plasmique. Cependant, aucune modification de la séquence du CYP2D6 n'a été retrouvée chez les patients atteints d'HAI de type 2 et plusieurs études n'ont pu retrouver de CYP2D6 à la surface plasmique (45, 46). La technique de fractionnement cellulaire utilisée dans les études qui proposent une localisation sur la surface des hépatocytes pourrait être à l'origine de l'identification du CYP2D6 sur la membrane plasmique étant donné le risque élevé de contamination lors de fractionnements sous-cellulaires par des fragments de membranes du réticulum endoplasmique.

Étant donné le polymorphisme du CYP2D6, on s'est rapidement intéressé au génotype des patients atteints d'HAI de type 2, qu'ils soient d'âge adulte ou pédiatrique (47, 48). Un allèle présent chez 10% de la population entraîne une activité CYP2D6 fortement réduite et un phénotype de « métaboliseur faible ». Un allèle particulier chez les patients avec une HAI de type 2 pourrait prédisposer ceux-ci à développer une autoréactivité envers le CYP2D6. Cependant, les patients étudiés atteints d'HAI de type 2 étudiés portaient tous l'allèle fonctionnel présent chez 90% de la population, et n'avaient par conséquent pas d'allèle particulier pouvant les prédisposer au développement d'une HAI.

Les épitopes ciblés par les autoanticorps anti-LKM1 sur le CYP2D6 ont été décrits en détails (49-52). Cette caractérisation exhaustive de l'antigénicité B a mené à l'identification des épitopes majeurs ciblés par les autoanticorps des patients et permis le développement de nouveaux tests diagnostics permettant la détection d'autoanticorps anti-LKM1 chez les patient atteint d'HAI de type 2 (53).

Quoique l'on considère les autoanticorps anti-LKM1 comme des marqueurs de l'HAI de type 2, ils peuvent tout de même être présents chez 5% à 10% des patients

chroniquement infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) (54-56). Notre équipe a récemment démontré qu'un mimétisme moléculaire entre les protéines NS3 et NS5a du VHC et le CYP2D6 serait responsable du développement d'autoanticorps anti-LKM1 chez ces patients (57).

#### **2.5.4 Anticorps anti-liver cytosol type 1 (LC1)**

Un nouvel autoanticorps a été identifié en 1988 par Martini *et al.* par immunoprécipitation à partir du sérum de 21 patients avec une hépatite autoimmune de type 2 (58). Cet autoanticorps reconnaissait une protéine soluble du cytosol du foie. Cet autoanticorps était spécifique à l'organe et fut appelé autoanticorps *anti-liver cytosol type 1* ou anti-LC1. Aucun autre autoanticorps n'a été trouvé dans les sérums des 21 patients chez qui cet autoanticorps a été détecté, tandis que chez les 14 autres patients de cette étude, des autoanticorps anti-LKM1 ont été détectés (58). Dans cette étude initiale, aucun anti-LC1 n'a été retrouvé dans les sérums de 100 patients avec HAI de type 1, de 100 patients avec cirrhose biliaire primitive, de 157 patients avec hépatite toxique et de tous les sérums de patients testés avec maladie hépatique autre ou chez des individus sains (58). Ces autoanticorps anti-LC1 ont donc été considérés comme les seconds marqueurs sériques, après l'anti-LKM1, de l'hépatite autoimmune de type 2. On retrouve les autoanticorps anti-LC1 chez 30% des patients avec hépatite autoimmune de type 2, en association ou non avec des anti-LKM1 (58). Chez près de 10% des patients avec hépatite autoimmune de type 2, les anti-LC1 sont les seuls et uniques marqueurs sériques (58).

Par immunofluorescence les anticorps anti-LC1 donnent un marquage caractéristique colorant de façon diffuse le cytoplasme des hépatocytes et reconnaissent par Western Blot une protéine de la fraction cytosolique du foie humain de 62kDa. Chez le rat, les anti-LC1 reconnaissent une protéine de 58 kDa (59). Il a été identifié par filtration sur gel que la protéine ciblée forme des complexes multimériques sous forme de tétramères (59).

Une corrélation entre les titres d'anti-LC1 et l'activité de la maladie chez les patients atteints d'HAI de type 2 a été observée : c'était la première fois qu'on trouvait une telle corrélation dans cette maladie (60). Cette observation a amené l'hypothèse que les autoanticorps anti-LC1 pouvaient être reliés à la pathogenèse de l'HAI de type 2, une conclusion surprenante étant donné que les autoanticorps présents chez les patients étaient généralement jusque là considérés comme un épiphénomène (60).

En 1999, notre équipe a identifié la cible des anticorps anti-LC1 comme étant la formiminotransférase-cyclodéaminase (FTCD) (61). Cette enzyme multimérique de 541 acides aminés et de 62 kDa est exprimée majoritairement par les hépatocytes et est impliquée dans le métabolisme de l'histidine (61). Elle est présente dans le cytoplasme des hépatocytes et peut s'associer avec l'appareil de Golgi de façon réversible (62). Cette localisation subcellulaire correspond à celle observée par immunofluorescence avec des anti-LC1 sur des coupes de foies (58, 59). Cette découverte a permis, entre autres, le développement de tests sérologiques spécifiques facilitant le diagnostic de l'HAI de type 2 et ce, surtout chez les patients ayant comme seuls marqueurs sériques les autoanticorps anti-LC1 (53). Ce nouveau test sérologique basé sur un ELISA spécifique et sensible, avec la FTCD recombinante purifiée, a permis de retrouver des autoanticorps anti-LC1 chez près de 71% des patients testés atteints d'HAI de type 2 (53), montrant bien l'importance de la réactivité anti-FTCD chez les patients atteints d'HAI de type 2.

Par prédiction bioinformatique d'antigénicité basée sur l'accessibilité des acides aminés et sur la flexibilité de la chaîne ainsi que l'hydrophobicité / hydrophilicité des acides aminés, la région carboxy-terminale de la FTCD a été identifiée comme étant une région de forte antigénicité (63). La caractérisation par notre équipe de la réactivité B envers la FTCD chez des patients atteints d'HAI de type 2, en utilisant des peptides et des protéines recombinantes tronquées couvrant l'entièreté de la FTCD, a permis d'établir que les épitopes linéaires ciblés par les anti-LC1 sont exclusivement trouvés parmi les 146 derniers acides aminés de la FTCD (63). Plusieurs épitopes conformationnels, dirigés contre des séquences discontinues de la FTCD ont aussi été retrouvés et ciblaient plusieurs

régions de la FTCD (63). Deux types de réactivité ont été retrouvées chez les patients avec anti-LC1 : 69% des patients possédaient des anticorps ciblant deux épitopes linéaires aux positions 428-434 (NTPEEKD) et 440-447 (LQEGLRRA), tandis que les autres patients réagissaient tous contre un épitope conformationnel discontinu situé entre les acides aminés 395 et 528 (63). Cette étude a permis de conclure que chez les patients avec HAI de type 2, la réactivité B envers la FTCD était polyclonale et déterminée par l'antigène (*antigen-driven*).

### 2.5.5 Anticorps anti-soluble liver antigen (SLA)

Les autoanticorps anti-SLA ont été décrits chez des patients atteints d'HAI par le groupe de Manns *et al.* en 1987. Ces autoanticorps ciblent des composantes de surnageants d'homogénats de foies et de reins (64). En 1993, des autoanticorps *anti-liver pancreas* (anti-LP) ont été décrits par le groupe de Berg *et al.* comme reconnaissant une protéine retrouvée dans les surnageants d'homogénats de foies et de pancréas (65). En 2000, le groupe de Lohse *et al.* a découvert que l'antigène ciblé par les autoanticorps anti-SLA et anti-LP était la ribonucléoprotéine tRNP<sup>(Ser)<sup>sec</sup></sup> (66). La réalisation que ces 2 autoanticorps reconnaissaient la même protéine a conduit à l'utilisation de la dénomination commune anti-SLA/LP, mais celle-ci a graduellement cédé la place au nom « anti-SLA » comme désignation des autoanticorps ciblant la ribonucléoprotéine tRNP<sup>(Ser)<sup>sec</sup></sup> (26).

Les anticorps anti-SLA ont été décrits comme étant spécifiques à l'HAI (**Tableau 2**) (67). Malgré qu'ils ne soient pas spécifiques aux types 1 ou 2, ils peuvent cependant être utiles lors du diagnostic, surtout en absence d'autre marqueur (ANA, SMA, LKM1, LC1) (**Tableau 1**) (68). Cependant, tout comme les anticorps anti-LC1 (69) et LKM1 (70), les autoanticorps anti-SLA peuvent être retrouvés chez environ 10% des patients chroniquement infectés par le VHC (71).



## 2.6 Génétique

L'hépatite autoimmune ne suit pas un modèle mendélien de transmission génétique et par conséquent, un locus génétique unique n'a pu être associé au développement de la maladie. Cependant, il est généralement admis qu'un ou plusieurs gènes, agissant seuls ou de concert, peuvent réduire ou augmenter les risques de développer une HAI.

### 2.6.1 Gènes du complexe majeur d'histocompatibilité

La plus forte association trouvée entre des gènes et l'hépatite autoimmune a été localisée dans le locus du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), présent sur le chromosome 6 chez l'homme. Cette région de 3.6Mb contient près de 140 gènes impliqués dans la réponse immune incluant les gènes des CMH de classe I et II, les gènes impliqués dans la présentation antigénique (*Transporter Associated with antigen Processing (TAP)*, tapasine, etc.), les gènes du complément ainsi que plusieurs cytokines.

Plusieurs allèles de susceptibilité ont été identifiés dans diverses populations (**Tableau 3**). En Amérique du Nord et en Europe, HLA-A1-B8, HLA-DRB1\*0301 (DR3) et HLA-DRB1\*0401 (DR4) ont été associés à une susceptibilité à l'HAI (72, 73). Dans une étude de déséquilibre de liaison réalisée par notre équipe chez des familles de patients avec HAI de type 1 et 2, nous avons trouvé que par rapport à leur frères et sœurs non atteints, HLA-DRB1\*0301 (DR3) et DRB1\*1301 (DR13) étaient préférentiellement transmis aux patients atteints d'une HAI de type 1, tandis que HLA-DQB1\*0201 était préférentiellement transmis aux enfants atteints d'HAI de type 2 (74). Une autre étude a proposé que HLA-DR13 pourrait être un facteur de risque en absence des allèles HLA-DR3 ou HLA-DR4, mais la taille de la population étudiée n'a pas permis d'atteindre des conclusions statistiquement significatives (75).

Gènes	Population	HAI	Déséquilibre de liaison	Références
<b>Gènes MHC</b>				
HLA-A1-B8	Amérique du nord, Europe	Type 1	Oui	Manns <i>et al.</i> , <i>Gastroenterology</i> , 1994; Doherty <i>et al.</i> , <i>Hepatology</i> , 1994
HLA-DRB1*0301	Amérique du nord, Grande-Bretagne, Espagne, Argentine	Type 1 et 2	Oui	Manns <i>et al.</i> , <i>Gastroenterology</i> , 1994; Doherty <i>et al.</i> , <i>Hepatology</i> , 1994; Czaja <i>et al.</i> , <i>Am J Gastroenterol</i> , 1999
HLA-DRB1*0401	Amérique du nord, Europe	Type 1	-	Manns <i>et al.</i> , <i>Gastroenterology</i> , 1994; Doherty <i>et al.</i> , <i>Hepatology</i> , 1994
HLA-DRB1*0404	Mexique	Type 1	-	Vasquez-Garcia <i>et al.</i> , <i>J hepatol</i> , 1998
HLA-DRB1*0405	Argentine, Japon		-	Pando M, Larriba <i>et al.</i> <i>Hepatology</i> , 1999; Seki <i>et al.</i> , <i>Gastroenterology</i> , 1992
HLA-DRB1*1301	Amérique du nord, Europe, Brésil, Argentine	Type 1	Oui	Djilali-Saiah <i>et al.</i> , <i>J hepatol</i> , 2004; Fainboim <i>et al.</i> , <i>Hum Immunol</i> , 1994
HLA-DRB1-07	Allemagne, Brésil, Grande-Bretagne	Type 2	Oui	Jurado <i>et al.</i> <i>J hepatol</i> , 2002; Bittencourt <i>et al.</i> , <i>Am J Gastroenterol</i> , 1999
HLA-DRB3*01	Brésil			Czaja <i>et al.</i> , <i>J Hepatol</i> , 2002; Jurado <i>et al.</i> , <i>J hepatol</i> , 1997
HLA-DQB1*0201	Amérique du nord, Europe	Type 2	Oui	Djilali-Saiah <i>et al.</i> , <i>J hepatol</i> , 2004
HLA-DQB1*0603	Amérique du nord, Europe	Type 2	Oui	Djilali-Saiah <i>et al.</i> , <i>J hepatol</i> , 2004
<b>Gènes non-MHC</b>				
IgA	Europe	Type 1		De la Concha <i>et al.</i> , <i>J immunol</i> , 2002; Vorechovski <i>et al.</i> , <i>Am J Hum Genet</i> , 1999
C4A	Europe, Amérique du nord	Type 1 et 2	Oui	Vergani <i>et al.</i> , <i>Lancet</i> , 1985; Scully <i>et al.</i> , <i>Gastroenterology</i> , 1993
CTLA4	Amérique du nord, Europe	Type 1	Oui	Agarwal <i>et al.</i> <i>Hepatology</i> , 2000
Fas	Japon, Amérique du nord	Type 1	-	Hiraide <i>et al.</i> , <i>Am J Gastroenterol</i> , 2005
Récepteur Vitamine D	Allemagne	Type 1 et 2	-	Vogel <i>et al.</i> , <i>Hepatology</i> , 2002
TNFA*2	Amérique du nord, Grande-Bretagne	Type 1	Oui	Cookson <i>et al.</i> , <i>Hepatology</i> , 1999; Czaja <i>et al.</i> <i>Gastroenterology</i> , 1999

**Tableau 3. Allèles de susceptibilité présents chez les patients avec HAI.**

D'autres allèles HLA ont été décrits en association avec l'HAI dans d'autres populations. Chez les mexicains métis, HLA-DRB1\*0404 est prédominant chez les patients adultes avec HAI (76). Au Japon et en Argentine, HLA-DRB1\*0405 a été associé à l'HAI (77, 78) tandis qu'au Brésil, c'est HLA-DRB1\*1301 et DRB3\*01 qui y sont associés (77, 79, 80). Dans l'HAI de type 2, on a trouvé une association avec HLA-DRB1\*07 dans les populations allemande, brésilienne et britannique tandis que l'allèle HLA-DRB1\*03 a été identifié comme facteur de risque chez les patients espagnols (81-83). Ces différences d'allèles de susceptibilité entre les différents groupes ethniques pourraient être expliquées

par l'hypothèse du « motif commun », qui propose que de multiples allèles du HLA de classe II pourraient coder pour des motifs similaires (84).

Ces associations d'allèles du HLA de classe II et de la susceptibilité à l'HAI pourraient être directement reliées à la pathogenèse de la maladie. Par exemple, on a trouvé que chez 94% des patients atteints d'une HAI de type 1, les allèles de susceptibilité codaient pour les motifs LLEQKR ou LLEQRR aux positions 67 à 72 de la molécules du HLA de classe II (73, 85). En revanche, HLA-DB1\*1501, qui est associé à un risque réduit de développer une HAI de type 1, code pour le motif ILEQAR à ces mêmes positions (73, 85). La substitution d'une lysine par une arginine ou une alanine en position 71, modifiant à la fois la polarité et la charge de l'acide aminé, pourrait causer une modification de l'orientation et/ou de la liaison de peptides à l'intérieur de la molécule CMH de classe II. Ces modifications pourraient influencer la présentation d'autoantigènes aux récepteurs T et ainsi modifier le développement de la maladie.

Lors d'une étude sur l'influence des allèles HLA et la réponse humorale chez des patients atteints d'HAI, notre équipe a décrit la forte influence que les allèles de classe II pouvaient avoir sur la réponse B autoimmune des patients (86). En effet, HLA-DRB1\*03 s'est avéré fortement associé aux patients atteints d'HAI de type 2 ayant des autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1, tandis que l'allèle HLA-DRB1\*07 s'est avéré prédominant chez les patients atteints d'HAI de type 2 dont les anti-LKM1 étaient les seuls marqueurs sérologiques (86). De plus, les patients avec l'allèle HLA-DRB1\*07 développent des anti-LKM1 contre un répertoire plus restreint d'autoépitopes comparativement aux patients possédant l'allèle HLA-DRB1\*03 (86).

### **2.6.2 Gènes hors du complexe majeur d'histocompatibilité**

D'autres gènes situés à l'intérieur du locus HLA ont aussi été trouvés en association avec une susceptibilité à l'HAI, tels que les gènes de l'IgA et du facteur 4A du complément (C4a) (**Tableau 3**) (22). Une déficience en IgA est fréquente chez les patients atteints

d'HAI. Cette déficience est génétiquement liée au locus du CMH, en particulier aux allèles HLA de susceptibilité tels que HLA-DR1 et HLA-DR7 (87, 88). De plus, on trouve de faibles niveaux de C4a chez 69% des enfants atteints d'HAI (89). Cette déficience pourrait être reliée à la pathogenèse de la maladie : en effet, plusieurs délétions ont été décrites dans le gène du C4a chez les patients développant la maladie à un jeune âge (90). Il est cependant difficile d'isoler l'effet de ce gène du complément sur l'HAI, ce gène étant en fort déséquilibre de liaison avec l'haplotype de susceptibilité HLA A1-B8-DR3-DQ2 (91).

Plusieurs gènes hors du locus CMH ont également été liés à l'HAI par l'étude de polymorphismes nucléotidique (SNP). Ces gènes codent pour des protéines pouvant influencer les systèmes immunitaires inné et/ou adaptatif, comme c'est notamment le cas dans la maladie de Basedow (92), dans la sclérose en plaques (93) ou dans la maladie cœliaque (94) où des polymorphismes du gène CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocytes antigen 4*) ont été trouvés chez des patients adultes et pédiatriques atteints d'une HAI de type 1 (95, 96). Un déséquilibre de liaison pour ce gène a également été constaté chez des enfants atteints par rapport aux frères et sœurs non atteints (96). En effet, on observe une transmission accrue des allèles (AT)<sub>8</sub> et (A) de l'exon 1 du gène de CTLA-4 provenant des parents hétérozygotes à leur enfant atteint d'une HAI de type 1 (87,5% et 83,5%) comparativement aux enfants non atteints (50,0% pour les deux,  $p = 0.009$  et  $0.02$ ) (96). En revanche, aucune différence dans la transmission de ces allèles n'a été observée entre les patients atteints d'une HAI de type 2 et leurs fratries non atteintes (96).

Un polymorphisme dans le promoteur du gène FAS (position -670) a aussi été trouvé en association avec une susceptibilité au développement d'une HAI (97) et à sa progression, conduisant à une maladie plus agressive avec développement précoce d'une cirrhose (98).

Une association entre des polymorphismes dans le gène du récepteur de la vitamine D et le développement d'une cirrhose biliaire primitive et d'une HAI, deux maladies autoimmunes du foie, a aussi été trouvée (99). Le récepteur de la vitamine D aurait un rôle dans plusieurs fonctions du système immunitaire telles l'activation des macrophages et des

monocytes, l'inhibition spécifique des fonctions effectrices des cellules CD4<sup>+</sup> Th1 et l'inhibition de la différenciation des cellules dendritiques (100-102). Par conséquent, des polymorphismes dans le récepteur de la vitamine D pourraient modifier la réponse immunitaire envers un autoantigène et potentiellement influencer le développement d'une maladie autoimmune. Il a aussi été trouvé que des polymorphismes dans le gène du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) peuvent conférer une susceptibilité à l'HAI et influencer le cours de la maladie. Une substitution de G à A à la position -308 pourrait influencer la transcription du gène résultant en des taux circulants constitutifs et induits plus élevés (103, 104). Les patients atteints d'HAI possédant ce polymorphisme sont sujets à un développement précoce de la maladie, sont moins susceptibles d'entrer en rémission et plus enclins à développer une cirrhose du foie (104).

Des mutations dans le gène AIRE (*autoimmune regulator*), responsable du développement du syndrome de polyendocrinopathie autoimmune (APECED), peuvent aussi conduire à une HAI dans 10% à 20% des cas (105). Le gène AIRE est un facteur de transcription impliqué dans la sélection négative thymique des lymphocytes T autoréactifs. Ainsi, des mutations qui portent atteinte à cette fonction peuvent provoquer de multiples manifestations autoimmunes en augmentant le nombre de cellules T autoréactives. Cependant, les études sur les mutations connues dans le gène AIRE de patients atteints de maladies autoimmunes du foie ont montré que les mutations dans ce gène ne jouent probablement pas un rôle majeur dans la pathogenèse de l'HAI (92, 106).

## 2.7 Pathogenèse

La pathogenèse de l'hépatite autoimmune est complexe. Toutefois, l'hypothèse généralement acceptée est qu'un individu susceptible, en raison de son bagage génétique, de son sexe et de son âge, pourra développer la maladie suite à une exposition à un élément environnemental déclencheur.

La prochaine section traitera en détail du rôle de diverses composantes du système immunitaire qui seraient impliquées dans les différentes étapes menant au développement d'une HAI. Nous discuterons du rôle des molécules d'adhésion qui pourraient être impliquées dans les étapes les plus précoces lors du recrutement des cellules T activées par le foie. Par la suite, nous discuterons du rôle des chimiokines dans ces étapes d'initiation et de perpétuation de cette inflammation. Finalement, nous ferons le point sur ce qui est connu des différentes étapes menant à l'apoptose des hépatocytes et à l'HAI.

**2.7.1 Article 2 « Pathogenesis of autoimmune hepatitis : From break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis » (Transl Res. 2007 Mar;149(3):107-13. )**

Cet article résume nos connaissances actuelles sur la pathogenèse et l'étiologie de l'HAI. Il sera donc question des origines possibles du bris de tolérance immunitaire, des mécanismes pouvant être responsable des étapes initiales du développement de l'inflammation hépatique et de ceux pouvant être responsables de l'apoptose des hépatocytes et donc, de l'expression clinique de la maladie.

**Contribution des différents auteurs**

PL : Rédaction de l'article

KB : Rédaction de l'article

FA : Supervision et rédaction de l'article

**PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE HEPATITIS: FROM BREAK OF  
TOLERANCE TO IMMUNE-MEDIATED HEPATOCYTE APOPTOSIS**

**Authors:** Pascal Lapierre, Kathie Béland and Fernando Alvarez.

**Affiliation:** Service de gastroentérologie, hépatologie et nutrition, Hôpital Sainte-Justine,  
3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

**Abbreviations:** AIH, autoimmune hepatitis; SMA, anti-Smooth Muscle Antibodies; ANA, Anti-Nuclear Antibodies; LKM1, anti-Liver Kidney Microsome type 1; CYP2D6, cytochrome P450 2D6; LC1, liver cytosol type 1; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; NP, Nucleoprotein; LSEC, liver sinusoidal endothelial cells; VAP-1, vascular adhesion protein; PNAd, peripheral lymph node addressin; IP-10, IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10kDa; SLE, systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis;

**Correspondence to:** Fernando Alvarez, M.D.

Service de gastroentérologie

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) Canada H3T 1C5

Tél.:(514) 345-4626, Fax :(514) 345-4999



**ABSTRACT**

Understanding the pathogenesis and progression of autoimmune hepatitis at the molecular level could prove essential in developing new preventive and therapeutic strategies. Recently developed murine models have enabled the identification of various mechanisms involved in the development and perpetuation of this autoimmune disorder. Studies on these models have shown that a peripheral break of tolerance against liver-expressed antigens is sufficient to induce an autoimmune liver disease and this, without prior liver damage. Recent data have also shown that the liver selectively recruits, and induce the apoptosis of activated CD8<sup>+</sup> T cells following an immune response. This process of T-cell trapping involves the expression of specific chemokines and adhesion molecules and these molecules are believed to play an important role in the initiation and perpetuation of autoimmune hepatitis. Hepatocyte apoptosis, induced by autoreactive T cells, follows specific pathways that could be targeted by new therapeutic agents. Basic research on the break of immune tolerance against liver antigens would be beneficial for patients with autoimmune hepatitis, as well as those suffering from other chronic inflammatory liver diseases, such as primary biliary cirrhosis and graft-vs.-host diseases.

Autoimmune hepatitis (AIH) is a disease of unknown aetiology, entailing progressive destruction of the hepatic parenchyma (1-3). Even with treatment, progression to cirrhosis and endstage liver disease may occur in 10-20% of cases and liver transplantation may be necessary (2, 3). The peak incidence of this disease occurs in the first two decades of life (4-7). AIH follows a chronic but fluctuating course and is associated with a female preponderance, marked hypergammaglobulinemia, circulating autoantibodies, low levels of complement factor 4 and prevalence of HLA B8-DRB1\*1301 and DQB1\*0201 haplotypes (1-3, 8). Frequently, other autoimmune disorders are also found in patients with autoimmune hepatitis and in first degree relatives (4-7). Associated autoimmune disorders are of B and T lymphocyte origin, and other anomalies of the immune system such as low levels of circulating immunoglobulin A are not unusual (1, 3).

Different subgroups of AIH can be distinguished according to the autoantibody found in patients' serum (1-7). Type 1 AIH is characterized by the presence of anti-Smooth Muscle Antibodies (SMA). Anti-Nuclear Antibodies (ANA), which recognize a variety of antigens, are found in 70% of type 1 AIH patients' serum, but are rarely the only marker in children (2, 4-6). Type 2 AIH is defined by the detection of Liver-Kidney Microsomal antibody type 1 (LKM1) (2, 4-6). This autoantibody is directed against the cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) (9-11). In 30% of patients with type 2 AIH an autoantibody against a liver cytosolic protein of 58 kD is also found and in 10% of patients it can be the only serological marker (12-14). The antigen recognized by the LC1 antibody is the formiminotransferase-cyclodeaminase (FTCD) (14). Analysis of lymphocytes isolated from the liver of AIH patients revealed that most expressed a CD4+ Th1 phenotype (15). Therefore, the disease is believed to be mediated by CD4+ T cells recognizing specific-liver self antigens.

It is known that autoimmune manifestations and autoimmune diseases can be induced by viral infections in humans and experimental animals (16-18). An infection can

break the immune tolerance to self-antigens through several pathways: 1) modification or release of sequestered cellular proteins by viruses, 2) activation of resting T cells by inducing the release of a variety of cytokines, 3) polyclonal activation of lymphocytes, 4) cross-reactivity between foreign antigens and self-proteins (molecular mimicry). Molecular mimicry is a mechanism by which viruses, bacteria or other pathogens share cross-reactive linear or conformational epitopes with self-proteins. The infection induces the activation of lymphocytes that recognize an antigenic determinant of the pathogen, as well as a self-determinant in a given MHC context.

In view of the shortcomings of experimental AIH models studied so far, new murine models of autoimmune hepatitis were developed based on the hypothesis that a molecular mimicry could be used to break tolerance against a liver antigen and produce an autoimmune hepatitis. The first model developed is based on a transgenic mouse that express the LCMV-Nucleoprotein (NP) in hepatocytes, which is then immunized with a plasmid expressing LCMV-NP, between the age of 6 and 8 weeks. Five months after the DNA vaccination these mice develop an autoimmune hepatitis (19).

Molecular mimicry has already been proposed as a possible initiating mechanism for autoimmune hepatitis in humans but it has never been proven (9, 11). Several difficulties are encountered when trying to confirm such an hypothesis; the fact that the disease can continue after the triggering agent has been eliminated has severely limited our ability to identify the culprit (20). Nevertheless, a molecular similarity was found between the CYP2D6 main antigenic site (LKM1 main epitope) and a protein of the Herpes Simplex Virus (9), and between the main epitope of FTCD and a protein of the Human Herpes Virus type 6 (21). To study molecular mimicry as a triggering mechanism in autoimmune hepatitis, a new model of AIH was developed. This model involves the immunization of wild type C57BL/6 mice with a plasmid coding for human CYP2D6 and FTCD, the autoantigens identified in human type 2 AIH (22). Using human autoantigens, immune tolerance against murine hepatic antigens can be broken and an autoimmune hepatitis can be triggered in naive, non-transgenic mice (22). These data confirm that a molecular

mimicry between a foreign and self-antigen can initiate an autoimmune hepatitis. This model also shows striking similarities with human autoimmune hepatitis (*Table 1*). This enables the use of this model for studies of predisposing and pathogenic factors which influence AIH progression. Recently, using the type 2 AIH murine model, it was shown that the genetic background (both MHC and non-MHC), as in humans, plays a major role in the development of AIH (23).

The main conclusion of these related experiments is that a peripheral break of immune tolerance against liver-expressed antigens, in a genetically susceptible individual, is sufficient to induce an autoimmune liver disease without prior liver damage. This contrasts with the observations made by Lang *et al.* who postulated that the 'inflammatory status' of the target organ, due to prior damage, is a decisive factor in the development of autoimmunity (24). The answer to these differences and to how this peripheral break of tolerance can lead to an autoimmune liver disease may lie in the expression profile of specific adhesion molecules and chemokines in the liver.

### **Adhesion molecules and T-cell liver entrapment**

A unique property of the liver is the trapping of activated CD8<sup>+</sup> T cells and subsequently, inducing their apoptosis (25-27). The unique organization of the liver parenchyma is likely to be involved in the retention of lymphocytes; the slow blood flow and narrow diameter of sinusoids, which lack tight junctions, allow lymphocytes to interact intimately with liver cells (25, 27). Furthermore, at the cellular level, liver sinusoidal endothelial cells (LSEC) express adhesion molecules such as ICAM-1, VCAM-1 and vascular adhesion protein (VAP-1) that retain activated lymphocytes in the liver. Recently, ICAM-1 expression was also found on cytoplasmic extensions of hepatocytes in the lumen of sinusoids, readily accessible to lymphocytes (28).

The profile of chemokines and adhesion molecules expressed by lymphocytes, dictated mainly by their activation status, is critical for proper cell homing. Naive T cells

express CD62L (L-selectin) that binds to peripheral lymph node addressin (PNAd). This expression allows naive lymphocytes to migrate to lymph nodes and encounters antigens for activation. Activated lymphocytes increase their expression of adhesion molecules, such as LFA-1, and are then more likely to be trapped by the liver since LSEC express high levels of ICAM-1. The adhesion and eventual recognition of liver antigens by lymphocytes would lead to their trans-endothelial migration in the liver.

T cell retention mechanism, by the liver, differs for CD8+, CD4+ cells and for antigen and non-antigen specific interaction with liver cells. Activated CD8+ T cell can be retained by the liver either through VCAM-1/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1-integrin or ICAM-1/LFA-1 interaction(29). ICAM-1-mediated trapping requires recognition of antigens presented by endothelial and/or parenchymal cells, whereas the retention of CD8+ T cells through VCAM-1 does not. Therefore, the liver can passively and actively retain activated CD8+ T cells through two independent mechanisms (29).

Recently, Bertolino *et al.* reported that naive CD8+ T cell can be retained in the liver through ICAM-1/LFA-1 interaction and antigen recognition (30). These naive T cells are thought to be subsequently activated within the liver and undergo apoptosis, a pathway that may explain the unusual ability of the liver to induce tolerance. ICAM-1 and VCAM-1-mediated trapping is responsible for about 90% of lymphocyte retention while the remaining 10% is thought to be VAP-1 mediated (29). CD4+ T cells can also be trapped by the liver through similar mechanisms. Th1 cells are thought to be retained by VCAM-1/ $\alpha$ 4 $\beta$ 1-integrin interaction while Th2 cells are retained through VAP-1 binding (31). Furthermore, these adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1 and VAP-1) are known to be over-expressed in liver inflammation (31-33).

Our hypothesis is that a similar sequence of events would exist in murine models of autoimmune hepatitis. Autoreactive cells, activated in the periphery, would be naturally trapped by the liver harboring ICAM-1 and VCAM-1 adhesion molecules. Once in the liver

parenchyma, activated T cell would recognize a MHC-autoantigen complex and then initiate an inflammatory process. This inflammatory response would induce local over-expression of adhesion molecules, such as VAP-1. To study this hypothesis, immunohistochemistry and western blotting were performed on liver from the autoimmune hepatitis mouse model. An increase of VAP-1 expression within the liver was detected in mice with chronic autoimmune hepatitis (34). Further studies will be necessary to dissect the early events in the development of autoimmune hepatitis, such as the progression from normal to inflamed liver, in the absence of prior liver damage (*Figure 1*).

### **Chemokines**

Chemokines are 8-12 kDa molecules that have the ability to attract specific cells to a particular site in an organism. They are divided into four groups depending on the relative position of conserved cysteine residues: C, CC, CXC and CXXXC. Chemokines are important for recruitment, retention and modulation of immune cells and are thought to be involved in many autoimmune diseases (*Table 2*) (35-45).

In transgenic mice expressing the glycoprotein (GP) of LCMV in  $\beta$ -cells of the pancreas, the induction of type 1 diabetes by LCMV infection is prevented by the blocking of IFN- $\gamma$  Inducible Protein 10kDa (IP-10) (46). IP-10 is also increased in tissues from patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus (SLE) and is involved in the progression of these diseases (47-49).

In liver diseases, various chemokines are over-expressed suggesting a possible role in their development and progression (50, 51). Several studies on hepatitis C infection (HCV) have reported links between chronic liver injury and chemokines expression. A correlation was found between aminotransferase (ALT) serum levels and both CXCR3 and RANTES expression levels in HCV chronic infection (52). CXCL12, that binds to CXCR4+ activated T cells, is thought to be involved in the progression of liver fibrosis (53). Lymphocytes expressing CXCR6 were found in association with both CXCL16+ bile

duct cells in portal tracts and CXCL16<sup>+</sup> hepatocytes at the site of interface hepatitis (54). Interestingly, in experimental T-cell-mediated hepatitis triggered by concanavalin A, CCR5 has been found to play an important role in disease development (55, 56). In our murine model of autoimmune hepatitis, an increase of liver IP-10 and the presence of CXCR3<sup>+</sup> liver-infiltrating lymphocytes have been observed by immunohistochemistry (*Figure 2*). Further studies are needed to characterize the influence of chemokine/chemokine receptor interactions in the pathogenesis of autoimmune hepatitis.

It has been proposed that the effect mediated by chemokines in an inflammatory response is the consequence of a “symphony” and not only a simple duo of chemokine/chemokine receptor (57, 58). Therefore, it is likely that several chemokines may be involved in the pathogenesis of autoimmune hepatitis and these chemokine/chemokine receptor interactions could represent interesting therapeutic targets.

### **Immune-mediated hepatocyte apoptosis**

In autoimmune hepatitis, autoreactive CD8<sup>+</sup> T-cells would recognize a MHC-autoantigen complex on either, Kupffer cells, LSEC or hepatocytes. This recognition would trigger their cytotoxic effect, mainly on hepatocytes, thus creating liver injury. Autoreactive cells would induce hepatocyte apoptosis throughout the liver parenchyma, mainly in area of interface hepatitis as observed in humans (59) and murine models (*Figure 3*). Apoptosis can be triggered via intrinsic and extrinsic pathways through death receptors expressed at the cell surface. These receptors can induce apoptosis through two intracellular cascades (Type 1 and 2 cells). The pathway used differs according to the cell type undergoing apoptosis. Hepatocytes are known to be type 2 cells, since they require mitochondrial amplification to undergo extrinsic-induced apoptosis (60).

In the liver, cell-to-cell cytotoxic effect of CD8<sup>+</sup> T cells can be mediated through either Fas/FasL (61-63), perforin/granzyme pathway (64), TNF receptors (65) and TRAIL receptors (66). The induction of apoptosis through these pathways has been shown in T

cell/hepatocyte interaction during infection clearance. Liver injury can also result from a bystander effect induced by local IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  secretion by activated T cell (67). This non-specific damage can result in autoantigens unmasking, normally hidden from the immune system, thus amplifying the inflammation and immune-mediated liver damage. These different pathways of apoptosis are likely to be involved in autoimmune hepatitis and must be thoroughly investigated as they are the end-result of the autoreactive response and mediators of the pathological effect.

## **CONCLUSIONS**

Understanding the basic pathogenic mechanisms responsible for the initiation and progression of autoimmune hepatitis is essential if new and specific therapies are to be developed. Murine models are excellent tools to dissect the role of various players involved in the development and perpetuation of this autoimmune pathology. Recent evidence on the involvement of adhesion molecules and chemokines in the pathogenesis of autoimmune hepatitis highlights the importance of these molecules and may represent potential therapeutic targets. Since the liver is unique in its mechanisms of lymphocytes retention and recruitment, identification of these pathways could lead to the development of new, liver-specific, anti-inflammatory therapy.



**ACKNOWLEDGMENT**

Pascal Lapierre is supported through a doctoral training award from the Fonds de la recherche en santé du Québec.

**REFERENCES**

1. Johnson PJ, McFarlane IG. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993;18(4):998-1005.
2. Alvarez F. Autoimmune hepatitis. In: Suchy F SR, Baliestreri W, editor. *Liver disease in childhood*; 2001.
3. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006;354(1):54-66.
4. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7(6):1333-9.
5. Maggiore G, Bernard O, Homberg JC, Hadchouel M, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children. *J Pediatr* 1986;108(3):399-404.
6. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17(4):376-81.
7. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25(3):541-7.
8. Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol* 2004;40(6):904-9.
9. Gueguen M, Boniface O, Bernard O, Clerc F, Cartwright T, Alvarez F. Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimmun* 1991;4(4):607-15.
10. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993;23(5):1105-11.

11. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *J Clin Invest* 1989;83(3):1066-72.
12. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8(6):1662-6.
13. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Martini E, Soulier E, Laperche S, et al. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16(4):892-8.
14. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116(3):643-9.
15. Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, et al. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticolonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996;24(6):1416-21.
16. Lunardi C, Tiso M, Borgato L, Nanni L, Millo R, De Sandre G, et al. Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol* 1998;28(3):936-48.
17. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80(5):695-705.
18. Marceau G, Lapierre P, Beland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 Autoantibodies in Chronic Hepatitis C Infection: A Case of Molecular Mimicry? *Hepatology* 2005;42(3):In press.
19. Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, Alvarez F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2002;169(9):4889-96.

20. von Herrath MG, Evans CF, Horwitz MS, Oldstone MB. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system. *Immunol Rev* 1996;152:111-43.
21. Lapierre P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33(7):1869-78.
22. Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004;39(4):1066-74.
23. Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: The influence of genetic background in disease development. *J Autoimmun* 2006;26(2):82-9.
24. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 2005;11(2):138-45.
25. Kuniyasu Y, Marfani SM, Inayat IB, Sheikh SZ, Mehal WZ. Kupffer cells required for high affinity peptide-induced deletion, not retention, of activated CD8<sup>+</sup> T cells by mouse liver. *Hepatology* 2004;39(4):1017-27.
26. Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol* 2005;26(10):512-7.
27. Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8<sup>+</sup> T cells by the normal liver. *J Immunol* 1999;163(6):3202-10.
28. Warren A, Le Couteur DG, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2006;44(5):1182-90.
29. John B, Crispe IN. Passive and active mechanisms trap activated CD8<sup>+</sup> T cells in the liver. *J Immunol* 2004;172(9):5222-9.

30. Bertolino P, Schrage A, Bowen DG, Klugewitz K, Ghani S, Eulenburg K, et al. Early intrahepatic antigen-specific retention of naive CD8<sup>+</sup> T cells is predominantly ICAM-1/LFA-1 dependent in mice. *Hepatology* 2005;42(5):1063-71.
31. Bonder CS, Norman MU, Swain MG, Zbytnuik LD, Yamanouchi J, Santamaria P, et al. Rules of recruitment for Th1 and Th2 lymphocytes in inflamed liver: a role for alpha-4 integrin and vascular adhesion protein-1. *Immunity* 2005;23(2):153-63.
32. Edwards S, Lalor PF, Nash GB, Rainger GE, Adams DH. Lymphocyte traffic through sinusoidal endothelial cells is regulated by hepatocytes. *Hepatology* 2005;41(3):451-9.
33. Lalor PF, Edwards S, McNab G, Salmi M, Jalkanen S, Adams DH. Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol* 2002;169(2):983-92.
34. Beland K, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Characterization of lymphocyte-mediated hepatocyte injury mechanisms in a murine model of autoimmune hepatitis. *Can J Gastroenterol* 2005;19(C):R.0820.
35. Godessart N, Kunkel SL. Chemokines in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 2001;13(6):670-5.
36. Eksteen B, Grant AJ, Miles A, Curbishley SM, Lalor PF, Hubscher SG, et al. Hepatic endothelial CCL25 mediates the recruitment of CCR9<sup>+</sup> gut-homing lymphocytes to the liver in primary sclerosing cholangitis. *J Exp Med* 2004;200(11):1511-7.
37. Patel DD, Zachariah JP, Whichard LP. CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium. *Clin Immunol* 2001;98(1):39-45.
38. Ashhab Y, Dominguez O, Sospedra M, Roura-Mir C, Lucas-Martin A, Pujol-Borrell R. A one-tube polymerase chain reaction protocol demonstrates CC chemokine overexpression in Graves' disease glands. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(8):2873-82.
39. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *J Immunol* 2000;165(6):3423-9.

40. Dubois-Laforgue D, Hendel H, Caillat-Zucman S, Zagury JF, Winkler C, Boitard C, et al. A common stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the early onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50(5):1211-3.
41. Cuello C, Palladinetti P, Tedla N, Di Girolamo N, Lloyd AR, McCluskey PJ, et al. Chemokine expression and leucocyte infiltration in Sjogren's syndrome. *Br J Rheumatol* 1998;37(7):779-83.
42. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, et al. Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol* 2001;115(1-2):192-8.
43. Qu P, Ji RC, Kato S. Expression of CCL21 and 5'-Nase on pancreatic lymphatics in nonobese diabetic mice. *Pancreas* 2005;31(2):148-55.
44. Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, et al. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;173(3):1620-7.
45. Kaneko H, Ogasawara H, Naito T, Akimoto H, Lee S, Hishikawa T, et al. Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1999;26(3):568-73.
46. Christen U, McGavern DB, Luster AD, von Herrath MG, Oldstone MB. Among CXCR3 chemokines, IFN-gamma-inducible protein of 10 kDa (CXC chemokine ligand (CXCL) 10) but not monokine induced by IFN-gamma (CXCL9) imprints a pattern for the subsequent development of autoimmune disease. *J Immunol* 2003;171(12):6838-45.
47. Boven LA, Montagne L, Nottet HS, De Groot CJ. Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol* 2000;122(2):257-63.

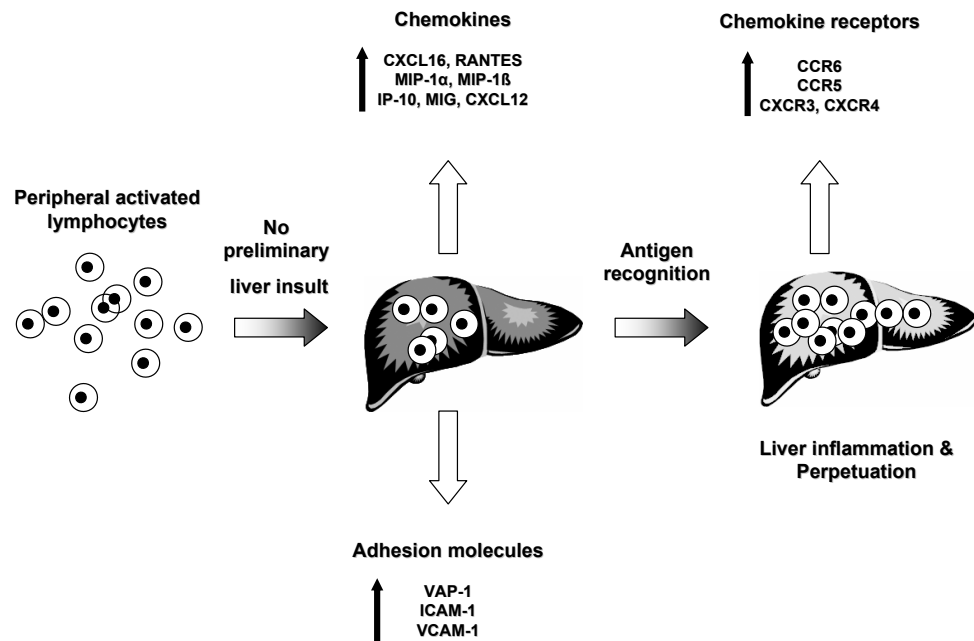
48. Simpson J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 2000;108(1-2):192-200.
49. Narumi S, Takeuchi T, Kobayashi Y, Konishi K. Serum levels of ifn-inducible PROTEIN-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 2000;12(10):1561-5.
50. Weninger W, von Andrian UH. Chemokine regulation of naive T cell traffic in health and disease. *Semin Immunol* 2003;15(5):257-70.
51. Grant AJ, Goddard S, Ahmed-Choudhury J, Reynolds G, Jackson DG, Briskin M, et al. Hepatic expression of secondary lymphoid chemokine (CCL21) promotes the development of portal-associated lymphoid tissue in chronic inflammatory liver disease. *Am J Pathol* 2002;160(4):1445-55.
52. Leroy V, Vigan I, Mosnier JF, Dufeu-Duchesne T, Pernollet M, Zarski JP, et al. Phenotypic and functional characterization of intrahepatic T lymphocytes during chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38(4):829-41.
53. Wald O, Pappo O, Safadi R, Dagan-Berger M, Beider K, Wald H, et al. Involvement of the CXCL12/CXCR4 pathway in the advanced liver disease that is associated with hepatitis C virus or hepatitis B virus. *Eur J Immunol* 2004;34(4):1164-74.
54. Heydtmann M, Lalor PF, Eksteen JA, Hubscher SG, Briskin M, Adams DH. CXC chemokine ligand 16 promotes integrin-mediated adhesion of liver-infiltrating lymphocytes to cholangiocytes and hepatocytes within the inflamed human liver. *J Immunol* 2005;174(2):1055-62.
55. Ajuebor MN, Aspinall AI, Zhou F, Le T, Yang Y, Urbanski SJ, et al. Lack of chemokine receptor CCR5 promotes murine fulminant liver failure by preventing the apoptosis of activated CD1d-restricted NKT cells. *J Immunol* 2005;174(12):8027-37.
56. Moreno C, Gustot T, Nicaise C, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, et al. CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* 2005;42(4):854-62.

57. Sato T, Thorlacius H, Johnston B, Staton TL, Xiang W, Littman DR, et al. Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8<sup>+</sup> lymphocytes to inflamed liver. *J Immunol* 2005;174(1):277-83.
58. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2(2):108-15.
59. Masuichi H, Seki S, Kitada T, Kawada N, Sakaguchi H, Nakatani K, et al. Significant role of apoptosis in type-1 autoimmune hepatitis. *Osaka City Med J* 1999;45(1):61-79.
60. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 1998;17(6):1675-87.
61. Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, et al. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 1995;182(5):1223-30.
62. Schlosser SF, Azzaroli F, Dao T, Hingorani R, Nicholas Crispe I, Boyer JL. Induction of murine hepatocyte death by membrane-bound CD95 (Fas/APO-1)-ligand: characterization of an in vitro system. *Hepatology* 2000;32(4 Pt 1):779-85.
63. Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G. Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-dependent but not perforin-dependent pathways cause injury in livers infected with an adenovirus construct in mice. *Hepatology* 2000;31(3):665-73.
64. Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, et al. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001;167(10):5928-34.
65. Abougergi MS, Gidner SJ, Spady DK, Miller BC, Thiele DL. Fas and TNFR1, but not cytolytic granule-dependent mechanisms, mediate clearance of murine liver adenoviral infection. *Hepatology* 2005;41(1):97-105.
66. Zender L, Hutker S, Mundt B, Waltemathe M, Klein C, Trautwein C, et al. NFkappaB-mediated upregulation of bcl-xl restrains TRAIL-mediated apoptosis in murine viral hepatitis. *Hepatology* 2005;41(2):280-8.

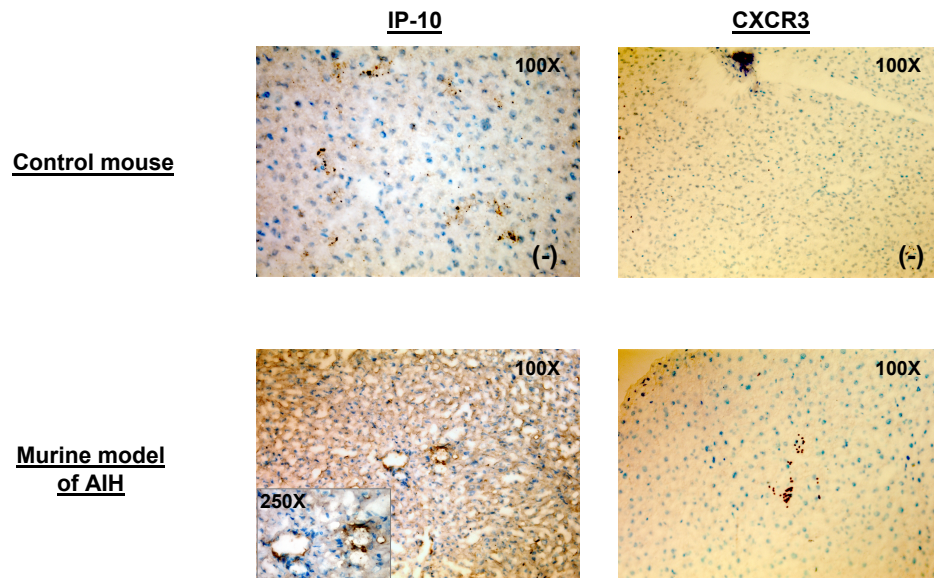


67. Bowen DG, Warren A, Davis T, Hoffmann MW, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B, et al. Cytokine-dependent bystander hepatitis due to intrahepatic murine CD8 T-cell activation by bone marrow-derived cells. *Gastroenterology* 2002;123(4):1252-64.

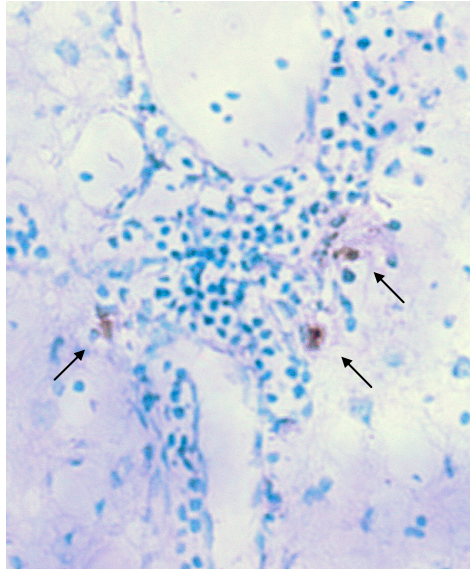
## FIGURE LEGENDS



**FIGURE 1. Proposed mechanism of peripherally-activated lymphocyte migration & liver inflammation.** Autoreactive T cells activated in the periphery are naturally trapped by the liver harboring ICAM-1, VCAM-1 and VAP-1 adhesion molecules. Once in the liver parenchyma, activated T cells recognize a MHC-autoantigen complex and initiate an inflammatory process. This inflammatory process would induce hepatic over-expression of adhesion molecules and chemokines, attracting more activated lymphocytes bearing specific chemokine receptors. Thus, this process amplifies and perpetuates the inflammatory response.



**FIGURE 2. Increased IP-10 and CXCR3 expression in murine models of autoimmune hepatitis.** Immunohistochemistry studies show that IP-10 expression is increased in the liver of mice developing an autoimmune hepatitis, when compared to liver of normal mice. CXCR3-bearing lymphocytes are present in the liver parenchyma of mice with autoimmune hepatitis.



**FIGURE 3. Hepatocyte apoptosis in experimental autoimmune hepatitis.** TUNEL assay on liver sections of mice with autoimmune hepatitis show hepatocyte apoptosis (arrows) in the interface area between portal tract and parenchyma.

**TABLE LEGENDS**

<b>Human autoimmune hepatitis</b>	<b>Animal model</b>
<b>Clinical</b>	
Female preponderance	?
Age	?
<b>Laboratory</b>	
Elevated ALT/AST	Yes
IgG above normal	Yes
Autoantibodies (LKM1/LC1)	Yes
CD4+ T cells predominance (Th1)	Yes
Specific CD8+ T cells	Yes
<b>Histology</b>	
Lymphoplasmocytic liver infiltrate	Yes
Interface hepatitis	Yes
Intralobular hepatitis	Yes
Fibrosis	?
<b>Genetic susceptibility</b>	
MHC genes	Yes
Non-MHC genes	Yes

**TABLE 1. Similarities between human type 2 autoimmune hepatitis and murine model.**

<b>Chemokines</b>	<b>Chemokine receptors</b>	<b>Cells harboring receptor</b>	<b>Autoimmune diseases</b>
CCL21, CCL19	CCR7	Naive cells	(Type 1 diabetes <sup>43</sup> )
CCL25	CCR9	Activated T cells	Primary Sclerosing Cholangitis <sup>36</sup>
IP-10 (CXCL10) MIG (CXCL9)	CXCR3	Activated T cells (Th1), NKT	Type 1 diabetes <sup>46</sup> , RA <sup>37</sup> , SLE <sup>49</sup> , MS <sup>42</sup>
CCL3, CCL4, CCL5, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES	CCR5	NKT, Activated CD4+ (Th1) & CD8+ T cells, macrophages, dendritic cells	Graves' disease <sup>38</sup> , MS <sup>47,48</sup> , RA <sup>37</sup> , SLE <sup>45</sup> , Sjögren's syndrome <sup>41</sup>
CXCL12	CXCR4	Naive and activated CD4+, CD8+ T cells (Th2)	RA <sup>39</sup> , Type 1 diabetes <sup>40</sup>
CXCL16	CXCR6	Naive CD8+, NKT, Activated CD4 and CD8+ T cells (Th1)	(MS <sup>44</sup> )

**TABLE 2. Important chemokines and chemokine receptors involved in autoimmune diseases.** Rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), multiple sclerosis (MS).

## 2.8 Modèles expérimentaux d'hépatite autoimmune

Les travaux faits sur des patients atteints de maladies autoimmunes nous ont fourni beaucoup d'informations sur leur prévalence, leurs caractéristiques cliniques, biochimiques et histologiques, leur réponse au traitement ainsi que leur pronostic. Cependant, des études pour identifier les processus pathologiques fondamentaux qui sous-tendent ces maladies se sont avérées difficiles à réaliser avec uniquement des échantillons provenant de patients. Les difficultés pour obtenir un nombre suffisant de patients, l'environnement non contrôlé et la variabilité interindividuelle se sont avérés être des obstacles insurmontables dans l'élucidation de la pathogenèse de ces maladies. Les modèles expérimentaux de maladies autoimmunes se sont avérés être d'un grand secours pour surmonter ces limitations. Il n'existe aucun modèle d'hépatite autoimmune spontanée naturel, cette pathologie n'ayant été décrite que chez l'homme. De grands efforts ont donc été déployés depuis plusieurs années pour tenter de développer un modèle expérimental d'HAI qui serait fidèle à la pathologie humaine.

Plusieurs modèles animaux de maladies autoimmunes (sclérose en plaques, thyroïdite autoimmune, arthrite rhumatoïde) ont été développés en immunisant des animaux avec des protéines antigéniques (protéine basique de la myéline, thyroglobuline, protéine de la paroi cellulaire de mycobactéries). Comme modèle d'HAI, l'injection de surnageant d'homogénat de foie de souris C57BL/6 centrifugé à 100 000 g (S-100) a été bien décrit (107, 108). L'hépatite autoimmune est déclenchée par vaccination intrapéritonéale de S-100 syngénique dans de l'adjuvant complet de Freund à des souris C57BL/6 mâles (108). La souche de souris utilisée influence la susceptibilité à l'HAI, les souris BALB/c et C3H étant moins susceptibles que les C57BL6 de développer la maladie (108).

Les souris atteintes d'une HAI ont des infiltrats inflammatoires périvasculaires et une nécrose des hépatocytes. Dans ce modèle, une déficience de la signalisation par le TGF- $\beta$  chez les lymphocytes T (souris transgéniques exprimant un variant dominant négatif du récepteurs du TGF- $\beta$  type II sous le contrôle du promoteur du CD2 humain) augmente la susceptibilité à l'HAI (109). Les avantages de ce modèle sont: 1) la reproductibilité, 2) la possibilité d'utiliser des animaux syngéniques, 3) la pluralité des connaissances applicable à

ce modèle provenant d'autres modèles de maladies autoimmunes qui lui sont applicables. Ce modèle a néanmoins plusieurs faiblesses: 1) l'hépatite subaiguë se résout spontanément quelques semaines après l'injection, 2) l'absence de fibrose portale, 3) une réaction inflammatoire similaire a été trouvée chez des souris injectées seulement avec l'adjuvant sans le S-100 (110), suggérant donc que l'autoimmunité observée ne serait pas spécifique à l'antigène.

Les souris transgéniques exprimant l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) spécifiquement dans le foie développent une forme chronique d'hépatite (111). Toutefois, comme dans le modèle mentionné précédemment, ces souris ne développent pas de fibrose des espaces portes. L'IFN- $\gamma$  est connu pour jouer un rôle dans les lésions hépatiques médiées par les lymphocytes T telles que celle observée chez les souris traitées avec de la concanavaline A (112). Cette dernière est une lectine végétale mitogène et une activatrice polyclonale de la prolifération des cellules T qui entraîne une hépatite aiguë lorsqu'elle est injectée à des souris (107). La sécrétion constante d'IFN- $\gamma$  dans le foie de souris transgéniques pourrait donc être responsable de l'apoptose et de la nécrose persistantes des hépatocytes. Ainsi, il y aurait donc une certaine similitude entre l'inflammation hépatique des souris transgéniques exprimant de l'IFN- $\gamma$  et l'hépatite autoimmune présente chez l'homme. Cependant, même si ces modèles montrent la capacité d'une cytokine particulière ou de lymphocytes T à déclencher une inflammation hépatique, ils ne sont que de peu d'aide à une meilleure compréhension de la maladie multifactorielle qu'est l'hépatite autoimmune.

Les souris déficientes pour la cytokine immunomodulatrice TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$  1 -/-) sur fond génétique BALB/c développent une nécrose et une inflammation hépatique (113). Celles-ci sont moins prononcées chez les souris TGF- $\beta$  1 -/- avec un fond génétique différent (113). Dans ce modèle, l'IFN- $\gamma$  est nécessaire à la pathogenèse de l'inflammation hépatique (113). Ce modèle expérimental démontre bien l'importance du patrimoine génétique et des cytokines immunomodulatrices dans le développement d'une nécrose hépatique secondaire à l'inflammation. Toutefois, les souris BALB/c-TGF- $\beta$ -/- montrent également une inflammation du cœur et des poumons, comme celle présente chez les TGF-



$\beta 1^{-/-}$  avec d'autres fonds génétiques (ex: 129/CF-1-TGF- $\beta 1^{-/-}$ )(113). En outre, les souris 129/CF-1-TGF- $\beta 1^{-/-}$  développent également une inflammation hépatique, mais avec peu ou pas de nécrose (113). L'absence d'une cytokine anti-inflammatoire comme le TGF- $\beta$  permet donc le développement d'une inflammation de plusieurs organes qui, dans contexte génétique favorable, cible préférentiellement le foie. Au total, ces résultats montrent que la souris BALB/c-TGF- $\beta 1^{-/-}$  est un modèle intéressant d'autoimmunité systémique, mais qu'il comporte de sérieuses limitations pour l'étude de la pathogenèse de l'HAI.

Un modèle de souris transgéniques (ALB1) exprimant l'épitope principal du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) provenant de la glycoprotéine 33 (GP33) a été produit et utilisé pour étudier la tolérance périphérique envers des cellules T CD8+ dirigées contre un antigène peptidique hépatique restreint par le CMH I au foie (114). Chez ces souris, l'expression de la GP33 est sous le contrôle du promoteur de l'albumine, ce qui permet l'expression de cet épitope dominant dans le foie (114). Cependant, ce promoteur entraîne l'expression de la GP33 au thymus ce qui provoque la délétion clonale de plus de 90% des cellules T spécifiques à la GP33 (114). Par conséquent, les souris ALB1 ne développent pas d'hépatite autoimmune suite à une infection au LCMV permettant l'activation des clones GP33 présents (114). Une augmentation significative mais transitoire des transaminases (ALT) a été obtenue en transférant des cellules T cytotoxiques (CTL) spécifiques à la GP33 à des souris ALB1 croisées avec des souris transgéniques 107.5 (ALB1-107.5), le tout suivi d'une infection avec LCMV (114). Les souris transgénique 107.5, qui expriment des niveaux élevés de l'antigène de surface de l'hépatite B dans le foie, possèdent une sensibilité accrue des hépatocytes aux cytokines inflammatoires (115). Le fait que la GP33 soit exprimée dans le thymus entraîne donc une forte sélection négative envers les clones spécifiques à la GP33, ce qui constitue la faiblesse majeure de ce modèle. De plus, le transfert de CTL spécifiques à la GP33 et une forte stimulation (LCMV), le tout à des souris particulièrement sensibles (ALB1-107.5), ont été nécessaires pour observer une forme passagère d'hépatite. Ce modèle est utile pour étudier

la tolérance immunitaire centrale et l'ignorance immunologique dans le foie, mais comporte des limites importantes pour un modèle expérimental d'hépatite autoimmune.

Tel que discuté dans la section 2.7 portant sur la pathogenèse de l'HAI (116), il est connu que les manifestations et les maladies autoimmunes peuvent être induites par des infections virales chez les humains et les animaux de laboratoire (117, 118). Ces infections peuvent briser la tolérance immunitaire envers un autoantigène par plusieurs voies, notamment via une réactivité croisée entre des antigènes du virus et un autoantigène. Ce mécanisme de mimétisme moléculaire est possible lorsqu'un virus, une bactérie ou un autre pathogène partagent des épitopes linéaires ou conformationnels avec un autoantigène. L'infection induit l'activation de lymphocytes T reconnaissant un antigène de l'agent pathogène et dans un contexte CMH donné un antigène du soi. Ce mécanisme a souvent été proposée pour le déclenchement de l'HAI chez l'homme mais n'a jamais pu être démontré (41, 51). Cependant, il est très difficile de confirmer une telle hypothèse puisque la maladie autoimmune peut se déclarer longtemps après que l'agent déclencheur ait été éliminé, ce qui limite considérablement notre capacité à identifier le coupable (119).

Compte tenu des limites des modèles d'HAI disponibles, notre équipe a développé un modèle murin d'hépatite autoimmune basé sur l'hypothèse qu'un mimétisme moléculaire pouvait être utilisé pour briser la tolérance contre un antigène du foie, et pouvait ultimement mener au développement d'une hépatite autoimmune. Ce modèle est basé sur une souris transgénique exprimant la nucléoprotéine (NP) du LCMV sous le contrôle d'un promoteur tronqué de la transthyréine (TTR) permettant ainsi l'expression spécifique du transgène dans les hépatocytes (120). Contrairement au promoteur de l'albumine qui induit une délétion des clones autoréactifs chez la souris ALB1 (114), le promoteur TTR prévient l'expression de la NP dans le thymus et prévient également par conséquent la délétion des clones spécifiques à la NP (120).

Pour déclencher une HAI, les souris TTR-NP sont vaccinées avec les plasmides pCMV-CTLA4-NP et pVr-IL12 par injections intramusculaires dans les tibialis antérieurs. Le plasmide pCMV-CTLA4-NP permet la production d'une protéine NP fusionnée au

signal sécrétoire de CTLA-4, conduisant de ce fait à la sécrétion de la protéine de fusion CTLA-4-NP et à sa captation par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (120). L'IL-12, une cytokine produite par les CPA qui stimule les réponses B et T et qui conduit les cellules CD4+ à une différenciation vers un phénotype Th1, est utilisée à titre d'« adjuvant » lors des vaccinations (121-123). Suite à l'immunisation, on observe chez les souris une réponse B de type IgG2 indicatrice d'une réponse immune de type Th1. De quatre à cinq mois après la vaccination par ADN, les animaux développent une hépatite autoimmune avec une infiltration par des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques à la NP lymphocytaire des régions périportales et lobulaires du foie ainsi qu'une cytolysse des hépatocytes entraînant une élévation marquée des ALT (120).

Étant donné nos connaissances sur la réponse immune contre le LCMV (épitopes B et T, etc.), ce modèle a l'avantage de permettre l'étude du bris de tolérance et du développement de lésion hépatique dans un contexte immunitaire bien défini. Cependant, malgré cet avantage, l'utilisation d'une souris transgénique et d'une protéine virale comme cible de la réponse autoimmune rend ce modèle peu approprié pour l'étude de facteurs de prédispositions ou du développement de l'HAI telle que présente chez l'homme.

## Objectifs de la thèse

L'objectif général de ce travail était d'étudier la pathogenèse de l'hépatite autoimmune dans un modèle expérimental d'HAI, et plus particulièrement l'influence du patrimoine génétique, de l'âge et du sexe sur le développement de la maladie

**1) Développement d'un modèle d'hépatite autoimmune de type 2.** En utilisant les connaissances acquises avec notre modèle précédent (120) et celles des autoantigènes humains CYP2D6 et FTCD ciblés dans l'HAI de type 2, l'objectif premier de ce travail a été de mettre au point un modèle expérimental d'HAI possédant les caractéristiques cliniques, histologiques et de laboratoire d'une HAI de type 2.

**2) Étude de l'influence du patrimoine génétique sur le développement de l'HAI.** Le second volet de mes travaux a été d'étudier l'influence du bagage génétique, soit des gènes du CMH et hors du CMH, sur le développement d'une HAI dans notre modèle expérimental d'HAI de type 2.

**3) Étude de l'influence de l'âge et du sexe sur le développement d'une hépatite autoimmune de type 2.** L'âge et le sexe ayant une forte influence sur le développement de l'HAI pour des raisons inconnues jusqu'à maintenant, l'étude de ce phénomène pourrait avoir des répercussions importantes sur la prévention et la prise en charge des patients. Le troisième volet de mes travaux a donc porté sur les mécanismes fondamentaux qui sous-tendent ce phénomène.

## Résultats

## **Développement d'un modèle d'hépatite autoimmune de type 2**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude de la pathogenèse de l'hépatite autoimmune progresse lentement, en partie dû à l'absence de modèles expérimentaux fidèles à la pathologie humaine, au faible nombre de patients et à la rareté du matériel biologique. Nous avons donc entrepris de développer un modèle expérimental d'HAI de type 2. Ce modèle d'AIH a été basé sur une vaccination avec un plasmide codant pour les régions antigéniques du CYP2D6 et de la FTCD (formiminotransférase-cyclodéaminase) humain, les deux autoantigènes ciblés dans l'HAI de type 2 chez l'homme (61, 124). Cette étude avait 2 buts, soit dans un premier temps de vérifier l'hypothèse selon laquelle un mimétisme moléculaire pouvait donner naissance à une HAI et dans un deuxième temps, développer un modèle d'HAI de type 2 présentant un maximum de similarités avec la pathologie humaine pour permettre l'étude de facteurs de susceptibilité.

En effet, les modèles précédents d'HAI ayant utilisé un mécanisme d'identité moléculaire plutôt qu'un réel mimétisme (120, 125), la preuve n'a jamais été faite qu'un mimétisme moléculaire entre un antigène étranger et un autoantigène hépatique pouvait déclencher une hépatite autoimmune.

**1.1 Article 3 « A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoinmunization with human antigens.» (Hepatology. 2004;39(4):1066-74.)**

**Contribution des différents auteurs**

PL : Conception du projet, réalisation des expérimentations et rédaction de l'article

IDS : Contribua à la rédaction de l'article

SV : Réalisa certaines des expériences

FA : Conception et supervision du projet et rédaction de l'article

**A MURINE MODEL OF TYPE 2 AUTOIMMUNE HEPATITIS:  
XENOIMMUNIZATION WITH HUMAN ANTIGENS.**

**Authors:** Pascal Lapierre, Idriss Djilali-Saiah, Susana Vitozzi, Fernando Alvarez

**Affiliations:** Service de gastroentérologie et nutrition, Hôpital Sainte-Justine,  
3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

**Running title:** A murine model of type 2 autoimmune hepatitis.

**Keywords:** Chronic Hepatitis, Immunology, Molecular mimicry.

**Correspondence to:** Fernando Alvarez, M.D.

Service de gastroentérologie

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) Canada H3T 1C5

Tél.:(514) 345-4626, Fax :(514) 345-4999

**Abbreviations:** AIH, autoimmune hepatitis; LC1, liver cytosol type 1; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; LKM1, anti-liver kidney microsome type 1;

**Grant support:** This work was supported by the Canadian institutes of health research grant (MT 15659) to F.A.



**ABSTRACT**

Autoimmune hepatitis is characterized by an immune-mediated injury of the hepatic parenchyma of unknown pathogenesis. Type 2 Autoimmune hepatitis is identified by the presence of anti-Liver-kidney microsomes type 1(anti-LKM1) and anti-Liver cytosol type 1(anti-LC1) autoantibodies. The present study shows that a murine model of Autoimmune hepatitis can be generated by DNA immunization against type 2 Autoimmune hepatitis self-antigens (P450 2D6 and formiminotransferase-cyclodeaminase). A pCMV plasmid containing the N-terminal region of mouse CTLA-4 and the antigenic region of human CYP2D6 (672 bp to 1377 bp) and human formiminotransferase-cyclodeaminase (1232 bp to 1668 bp) was used for DNA immunization of C57BL/6 female mice. Immunized mice showed elevated levels of Alanine Aminotransferase, with peaks at 4 and 7 months post-injection. Periportal, portal and intralobular liver inflammatory infiltrate was observed at histology. Mainly CD4+ lymphocytes, but also CD8+ and B lymphocytes were found in the liver. Cytotoxic specific T-cells were found in both the liver and spleen of these animals. Mice developed anti-LKM1 and anti-LC1 antibodies of IgG2 subclass, against specific mouse autoantigens. The ALT levels correlated with both the presence of anti-LKM1/anti-LC1 antibodies and the presence of liver necroinflammation. In conclusion, in mice, DNA immunization against human autoantigens breaks tolerance and induces an autoimmune liver disease. Molecular mimicry between foreign and self antigens explains the liver injury. This model of autoimmune hepatitis resembles human type 2 autoimmune hepatitis and will be helpful for the study of its pathogenesis.

## INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) is a disorder of unknown aetiology characterized by an immune-mediated injury that gradually destroys the hepatic parenchyma. Circulating autoantibodies are present in most patient's sera, and they are considered as specific markers of the disease(1). Two types of AIH are recognized, according to the autoantibody found in patients' sera : type 1 AIH is characterized by the presence of anti-smooth muscle (SMA) and/or anti-nuclear antibodies (ANA), while type 2 AIH shows anti-liver kidney microsomal type 1 (LKM1) and/or anti-liver cytosol type 1 (LC1) antibodies (2-4). Previous work has shown that the target of LC1 antibodies is formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD)(5), and that anti-LKM1 antibodies are directed against P450 2D6 (CYP2D6)(6). These two enzymes are mainly expressed in hepatocytes. Titres of these autoantibodies show a good correlation with AIH activity and it has been speculated that they might play a role in the pathogenesis of this inflammatory disease(7). Information obtained from clinical data can be applied to develop an animal model which will give new and broader insights into the relative importance of different factors involved in the pathogenesis of AIH.

Several murine models of autoimmune hepatitis have been described, but none of them appear completely satisfactory. One of these models showed the development of a subacute hepatitis, after immunization with a liver subcellular fraction(8). Other models are based on the breaking of immune homeostasis by over expression of interferon  $\gamma$  (9), a pro-inflammatory cytokine, in the liver or by the deficiency of TGF- $\beta$ 1 an immunomodulatory one(10). A transgenic mouse model expressing the main epitope of the lymphocyte choriomeningitis virus (LCMV) – Glycoprotein(GP) under the control of the albumin promoter was produced (11). This promoter supported the expression of the protein not only in the liver but also in the thymus, resulting in the deletion of most T-specific cells and the development of tolerance. Therefore, LCMV infection did not trigger a chronic hepatitis. In this model, an autoimmune hepatitis was observed after transplant of specific

cytotoxic lymphocytes, and only in double transgenic mice (LCMV-GP and HBsAg). HBsAg expression renders hepatocyte sensitive to cell death induced by different cytokines(11).

Recently, a transgenic mouse expressing LCMV – nucleoprotein (NP) under the control of the liver specific transthyretin promoter was generated. This animal developed an immune mediated liver injury after vaccination with plasmids coding for NP. This study showed that AIH can be triggered by molecular mimicry and that activated T lymphocytes in the periphery migrated and caused cytolysis of targeted cells (12). Based on these facts a new murine model of autoimmune hepatitis was developed by molecular mimicry against self-antigens in naïve mice. Aiming to reproduce a type 2 autoimmune hepatitis, CYP2D6 and FTCD were used as antigens. Cross-species immunization(13-16) has proved to be successful in producing animal models of autoimmune diseases(14, 16, 17) or induce immune response against cross-species viral antigens(18) or cancer antigens (19, 20). Mice vaccinated with a plasmid coding for human CYP2D6 and FTCD developed a specific immune reaction and consequently an autoimmune hepatitis. Herein, we describe the development of this experimental model and its similarities with human type 2 AIH.

## MATERIALS AND METHODS

### **cDNA construction and DNA vaccination**

The DNA vaccination was done using the pRc/CMV vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) for expression in eukaryotic cells. All the plasmids were propagated in *E. Coli* using standard techniques and purified using QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA), according to the manufacturer's guidelines. The pVR-IL12 plasmid was kindly provided by G. Prud'homme (Montreal, Canada)(21).

The CTLA-4-CYP2D6-FTCD cDNA construction was made first in pCRII-TOPO and then transferred to pCMV, cDNA coding for the mouse CTLA-4 extracellular region was obtained by PCR amplification of a fragment of the full length cDNA in pUC9 American Type Culture (ATCC, Manassas,VA). The following primers were used 5'-GCT CTA GAA CTA GTG AAT TCC CGG GG-3' and 5'-CCA AGA ATG CAC AGT AGA ATC CGG GCA TGG-3'. This PCR fragment was then cloned using the pCRII-TOPO TA cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). To receive the CYP2D6-FTCD fragment the pCRII-TOPO-CTLA-4 vector was digested with BsmI and XbaI restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA) and gel-purified with the QIAQUICK gel extraction kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA). The CYP2D6-FTCD cDNA cloned in pMAL-cR1 (22) was digested with BsmI and XbaI restriction enzymes. The DNA fragment containing the CYP2D6-FTCD was gel-purified and cloned in the BsmI and XbaI restriction sites in pCRII-TOPO-CTLA-4. The complete CTLA-4-CYP2D6-FTCD cDNA was removed from pCRII-TOPO with HindIII and XbaI and cloned in the corresponding sites in pRc/CMV.

Six to eight weeks old female C57BL/6 mice were injected under general anaesthesia in the anterior tibialis muscle with 100 µg (50 µl) of plasmid DNA dissolved in saline buffer. The mice were separated in four groups according to the plasmid injected; 1) pCMV alone (n=5); 2) pVR-IL12 (interleukin 12) alone (n=5); 3) pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD alone (n=5); or 4) pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12 (interleukin 12) (n=46). Mice

were injected three times, two weeks apart. Some animals were lost during anaesthesia (n=5) at different times. No animals were lost to organ failure or other manifestation of an extra-hepatic condition attributable to inflammation.

#### **In vitro transcription-translation of pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD**

In vitro transcription-translation of pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD was performed using the RiboMAX large scale RNA production system and the rabbit reticulocytes lysate system (Promega, Madison, WI), according to the manufacturer's instructions. In vitro synthesized and [<sup>35</sup>S] methionine-labeled CTLA-4-CYP2D6-FTCD fusion protein was immunoprecipitated with patient's serum (positive for anti-LKM1 and anti-LC1 autoantibodies), according to a previously published protocol(5). The immunoprecipitate was analyzed by 10% SDS-PAGE, followed by autoradiography.

### **Preparation of mouse liver homogenate**

C57BL/6 normal mouse livers were homogenized with a Potter-Elvehjem in lysis buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) at 4°C. The crude homogenate was centrifuged at 500 g for 10 minutes and the supernatant was removed. The cleared homogenate was then analyzed by SDS-PAGE.

### **Western blot analysis**

Proteins (30 µg of mouse liver homogenate or 2 µg of recombinant fusion proteins) were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada). The membrane was blocked with 5% powder milk in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). The nitrocellulose filter was then incubated for 2 hours at room temperature with the first antibody in TBST/1% powder milk. The secondary antibody used was conjugated to peroxidase (Biosource International, Camarillo, CA), diluted to 1:10,000 in TBST/1% powder milk. Bound peroxidase was detected with chemiluminescence blotting substrate (Boehringer Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### **ELISA**

ELISA was performed as described (22), using the fusion protein coded by the pMAL-cR1-CYP2D6-FTCD, purified in a maltose-Sepharose column (New England Biolabs). The purity of the preparation was assessed by SDS-PAGE, and the protein was quantified by UV spectroscopy with BSA as standard. Briefly, microwell plates were coated with 0.2 µg/well of CYP2D6-FTCD fusion protein in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6, overnight at 4°C. After blocking with 2% BSA in PBS for 1 h at 37°C, 200 µl of mouse sera was loaded under different dilution. The presence of anti-CYP2D6-FTCD antibodies were revealed by incubation with anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugated antibodies at a dilution of 1/2000 (Biosource). Alkaline phosphatase was developed by incubation with *p*-nitrophenyl phosphate, and the result read at 405 nm. ODs were compared for sera from different groups of vaccinated mice. A serum was considered positive if its specific OD was at least

2 times higher than the mean OD of the preimmune mice sera. The same technique was applied to establish the IgG subclasses. Briefly, mice sera were tested at a dilution of 1/50, followed by alkaline phosphatase conjugated anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, and IgM (Santa Cruz Biotechnology), at a dilution of 1/1000.

### **Immunohistochemistry and histopathology**

Vaccinated mice were sacrificed at eight to ten months after the last plasmid injection, and their livers were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned, and stained with H&E. The livers were also tested by an immunohistochemistry experiments to characterize the lymphocyte infiltrate using antibodies specific for mouse CD3, CD4, CD8 and CD23 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) using published protocols(23).

**Analysis of liver and spleen CTLs against CYP2D6 and FTCD**

EL4 cells, an H-2b lymphoma T cell line (ATCC), was used as target. Briefly,  $1 \times 10^4$  target cells were left in contact with the CYP2D6-FTCD fusion protein for 24 h at 37°C. These cells were then incubated with serial dilutions of between  $2,5 \times 10^3$  and  $2,5 \times 10^4$  splenocytes and/or liver isolated lymphocytes (effector cells) in a final volume of 200  $\mu$ l. After 5 h of incubation at 37°C, the release of lactate dehydrogenase was measured at 490 nm using the CytoTox 96 assay kit (Promega), according to the manufacturer's guidelines. Maximum release and spontaneous release were determined by incubating the cells with lysis solution and culture medium, respectively.

**Serum ALT activity**

Serum ALT levels were measured in a Beckman-Synchron CX9 apparatus, from blood taken from one to nine months after the last plasmid injection.

**Statistical analysis**

Statistical significance was evaluated by the Student's test and  $p < 0.05$  was considered significant.



## RESULTS

### DNA vaccination

A chimeric cDNA was constructed with the mouse CTLA-4 cDNA coding for the extracellular domain, the minimal antigenic region of human CYP2D6(22) and the antigenic region of human FTCD(5) (fig. 1A). The CTLA-4 portion of the chimeric cDNA was used to enable the secretion of the chimeric protein(12). This construction was verified by *in vitro* expression and the chimeric protein was immunoprecipitated with anti-LC1 and anti-LKM1 human sera (figure 1b). This plasmid, pVR-IL12 and the pCMV vector were used to immunize 8 weeks old C57BL/6 female mouse at two weeks interval (fig. 1c).

### Characterization of the liver disease

Alanine Aminotransferase (ALT) activity level was measured up to 12 months and was used to monitor the activity of the liver inflammation. Increase in ALT activity was not found in mice of the control groups (pCMV and pVR-IL12) but 3/5 (60%) mice in the pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD group and 37/46 (77%) of mice in the pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD+pVR-IL12 showed ALT at more than 2 standard deviation above normal levels in C57BL/6. As described in figure 2 the vaccination with pVR-IL12 and pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD gave the highest ALT levels. Two ALT peaks, at 4 and 7 months, can be seen for mice injected with both plasmids and to a lesser extent with the mice injected with pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD alone. These findings are compatible with the physiological role of IL12, which is to increase the B and T cell mediated response.

Histopathological examination of the liver of mice with elevated ALT (between 8 and 9 months after the last injection) showed inflammatory infiltrates in the portal tracts and interface hepatitis (figure 3, mouse 1 and 2), small foci of interlobular inflammation and necrosis were also observed. Grading score of liver biopsies was between 8 and 12 (24, 25). ALT levels in serum correlate with the presence of inflammation ( $p=0,001$ ) at the liver

histology. No mouse in the control groups showed any inflammation (figure 2 and 3, control). No fibrosis was noted in any of the mouse.

To characterize the lymphocyte infiltrate, specific antibodies were used (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD23) (figure 3). The large majority of the T lymphocytes were CD4+, these cells were distributed throughout the infiltrate. CD8+ cells were found mainly in the interface and perivascular areas of the portal tract. B lymphocytes were also present sparsely in the liver inflammatory infiltrate. To confirm that these lymphocytes were specific for either the CYP2D6 and/or FTCD protein, lymphocytes were isolated from the spleen and/or the liver of 5 animals with elevated ALT and their CTLs activity was measured. We found 2 animals with detectable cytotoxic T-cell activity, at an effector/target ratio of 2,5. T cells isolated from the spleen of one mouse showed 8,3% specific lysis. Isolated liver lymphocytes from the other mouse showed 3% specific lysis. These preliminary results indicate that CYP2D6 and/or FTCD specific lymphocytes can be activated and found in the liver of vaccinated C57BL/6 mice.

### **Characterization of the B –lymphocyte immune response**

A specifically developed ELISA test allowed the detection of both anti-LKM1 and anti-LC1 at the same time(22). These results are summarized in figure 4. Higher titres of combined anti-LKM1 and anti-LC1 were found in mice immunized with IL12 compared to the group immunized without IL12. IL12 also affected the timing of the increase in antibodies titres, which appeared 1 month earlier than in the group without IL12. A slight increase in titres at 7 months post-injection for both groups was observed. The levels of ALT correlates well with the presence or absence of anti-LKM1/anti-LC1 antibodies ( $p=0,0067$ ). To further characterize the B-cell response, IgG subclasses were determined and results are summarized in figure 5a. The predominance of the IgG2 subclass is compatible with a Th1 immune response and seems to be independent of the adjunction of IL12 which is known to orient the immune response toward a Th1 phenotype.

The reactivity of sera from each group of mice was evaluated by ELISA and western blot with either, the fusion protein (CYP2D6-FTCD), CYP2D6 alone or FTCD alone. Results are summarized in table 1. As expected, ELISA is more sensitive than Western blot analysis. In addition, ELISA and Western Blot results showed that human FTCD is less antigenic than human CYP2D6 in C57BL/6 mice.

Antibodies detected by ELISA recognized the human proteins used for the immunization. To look for autoantibodies, sera from vaccinated mice were tested against proteins from C57BL/6 mouse liver homogenate in a western blot analysis (figure 5b). The mouse sera either recognize a 48 kDa or a 58 kDa protein or both. These molecular weights correspond to the mouse cytochrome from the 2D subfamily, CYP2D9 (48 kDa), and mouse FTCD (58 kDa).

## DISCUSSION

The development of a murine model of type 2 AIH and its analysis may shed light on an otherwise poorly understood autoimmune pathology. The reasons behind the development of specific autoantibodies in type 2 AIH, anti-LKM1 and anti-LC1, against proteins which are neither secreted nor expressed at the surface of the hepatocyte, remains unknown(5, 26). The possible involvement of these autoantibodies in the pathogenicity of type 2 AIH is, at least, controversial(7). Previously described animal models of AIH have been of help in understanding some of the underlying processes which could give rise to a liver autoimmune disease(8, 9, 11, 27). Many identified shortcomings of those models lead us to develop a new mouse model based on the hypothesis of molecular mimicry, between a foreign and a neo-self antigen, as the trigger of the autoimmune process (12).

DNA vaccination has been proven to induce a specific humoral and cellular immune response in animals(28, 29). The plasmid used for the DNA vaccination was constructed to produce a 62 kDa chimeric fusion protein containing the antigenic regions of both human CYP2D6 and human FTCD. This chimeric protein also contains the extracellular region of mouse CTLA-4. This fragment acts as a secretory signal and as an immunological modulator(12). The extracellular part of CTLA4 allows binding of the fusion protein to the B7-1 and B7-2 receptors at the surface of antigen presenting cells (APC's). An increase in the cellular and humoral response to fusion proteins containing this CTLA-4 fragment has been previously described(30, 31). To increase the immunological response to the product of this construct, pVR-IL12 was co-injected. The IL-12 is a strong B and T cell stimulator naturally produced by APC, driving T-cells toward a Th1 phenotype differentiation and enhancing the cytotoxic T-cell (CTL) reactivity(12, 32-34). The protocol used, of three intra-muscular injections of plasmid DNA at two weeks interval has been proven to maintain prolonged level of protein expression, thus continually stimulating the immune system (both T and B lymphocyte system) and produce a strong CTL response to the antigen(32).

Two peaks of ALT serum activity were found at 4 months and at a higher level at 7 months post-injection. These findings are similar to previous results obtained using a transgenic mouse model of AIH(12). An interesting observation is that the ALT serum activity peak found at 4 month is only the first event in a two-step process. The first event occurs following the development of autoantibodies and probably the activation and migration of T-cells to the liver. A second event occurs at 7 month after the last immunization, in which an increase of ALT serum activity and production of autoantibodies are simultaneous. If the initial raise of autoantibodies is dependent on the secretion of antigens from the muscle, the 7 month peak was most probably secondary to the liberation of the autoantigen from the hepatocytes. In type 2 AIH, it was already shown that the inflammatory activity correspond with the autoantibody titres of anti-LC1 (7).

A characteristic portal and periportal inflammatory infiltrate as well as an intralobular infiltrate were only observed in mice with elevated ALT levels. The characterization of this infiltrate shows that most lymphocytes are CD4+ T helper (Th) cells, but CD8+ CTL's are also present, mainly in the periphery of portal areas, along with B lymphocytes (CD23+) which are sparsely distributed. A predominance of CD4+ lymphocytes was also observed on liver biopsies of AIH patients(35). Autoreactive anti-LKM1 (anti-CYP2D6) lymphocytes in type 2 AIH patients were also CD4+, displaying a Th1 phenotype(36). As in the model described here, the presence of B lymphocytes in the liver of AIH patients is sparse, most cells in the infiltrate are T-lymphocytes; CD4+ cells are widely distributed in septal inflammatory tissue, while CD8+ are predominantly located in areas of active hepatocellular necrosis (37). The analysis of T-lymphocytes from the spleen and liver of vaccinated mice indicate that there are activated, CYP2D6 and/or FTCD specific, cytotoxic T-cells in both organs of animals with elevated levels of ALT. The levels of specific lysis observed are similar to those previously obtained in NP transgenic mouse model of autoimmune hepatitis (12). These preliminary data warrants further investigation to fully characterize the cellular autoimmune response in this model of type 2 AIH.

The fact that CYP2D9 and mouse FTCD are mainly expressed in the liver like CYP2D6 and FTCD in humans can explain a liver-specificity of this inflammatory disease as observed in human type 2 AIH. In this human disease the immune T-cell reactivity against CYP2D6 and FTCD is limited to the liver. Nonetheless, the presence of inflammation in other organs should be investigated in future experiments, even if the level of expression of CYP2D9 and mouse FTCD is very low (ex: kidney, brain) (38, 39).

The production of autoantibodies against CYP2D9 and murine FTCD is an interesting aspect of this model of type 2 AIH. The LKM1/LC1 antibodies, in the group co-injected with pVR-IL12, were found earlier and at higher titres than in mice injected only with pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD. These results showed that B lymphocyte activation was induced by IL12. The autoantibodies produced are mainly of the IgG2a and IgG2b subclasses and are representative of a Th1-type response. This type of immune response (Th1) was already found in other organ-specific autoimmune diseases(40). Autoantibodies detected in mice recognized both the human and the mouse antigens; and they were directed mainly against conformational epitopes on cytochromes from the 2D subfamily and FTCD. Interestingly, the CYP2D6 appeared to be more antigenic than FTCD, as it has been found in type 2 AIH patients (22).

In conclusion, type 2 autoimmune hepatitis can be induced in naïve C57BL/6 mice using xenoinmunization with known human type 2 AIH antigens. A break of tolerance against mouse liver proteins occurs and an autoimmune process develops. Mice with elevated ALT levels have a characteristic liver inflammatory infiltrate, constituted mainly of CD4+ lymphocytes, but also CD8+ and B lymphocytes. Mice show anti-LKM1 and anti-LC1 autoantibodies, the hallmark of type 2 AIH, and display a Th1 phenotype of immune response. This break of tolerance against self-proteins induced by molecular mimicry is a proof that foreign antigens can use the same mechanism to trigger an autoimmune process.

## REFERENCES

1. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938.
2. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662-1666.
3. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-1339.
4. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:376-381.
5. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643-649.
6. Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988;168:801-806.
7. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726.
8. Lohse AW, Manns M, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Cohen IR. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 1990;11:24-30.
9. Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, Yamamura K. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:614-618.

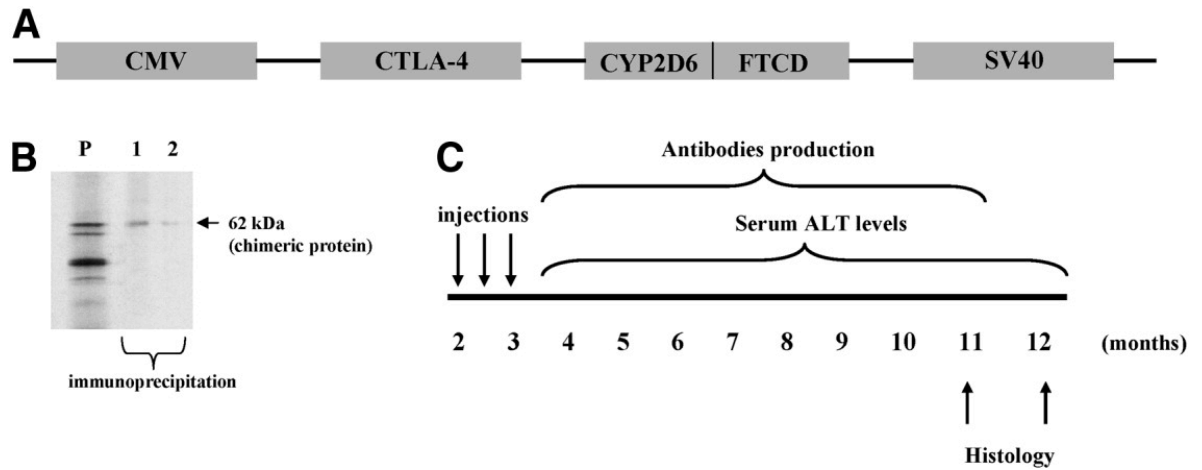
10. Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA. Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol* 2001;166:6413-6422.
11. Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 2000;165:2415-2422.
12. Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, Alvarez F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2002;169:4889-4896.
13. Nawrath M, Pavlovic J, Moelling K. Synergistic effect of a combined DNA and peptide vaccine against gp100 in a malignant melanoma mouse model. *J Mol Med* 2001;79:133-142.
14. Tincani A, Gilburd B, Abu-Shakra M, Blank M, Allegri F, Ottaviani R, Riboni M, et al. Immunization of naive BALB/c mice with human beta2-glycoprotein I breaks tolerance to the murine molecule. *Arthritis Rheum* 2002;46:1399-1404.
15. Scofield RH, Kaufman KM, Baber U, James JA, Harley JB, Kurien BT. Immunization of mice with human 60-kd Ro peptides results in epitope spreading if the peptides are highly homologous between human and mouse. *Arthritis Rheum* 1999;42:1017-1024.
16. Marion S, Braun JM, Ropars A, Kohn LD, Charreire J. Induction of autoimmunity by immunization of mice with human thyrotropin receptor. *Cell Immunol* 1994;158:329-341.
17. Oliver AR, Lyon GM, Ruddle NH. Rat and human myelin oligodendrocyte glycoproteins induce experimental autoimmune encephalomyelitis by different mechanisms in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003;171:462-468.
18. Choi AH, McNeal MM, Basu M, Flint JA, Stone SC, Clements JD, Bean JA, et al. Intranasal or oral immunization of inbred and outbred mice with murine or human rotavirus VP6 proteins protects against viral shedding after challenge with murine rotaviruses. *Vaccine* 2002;20:3310-3321.



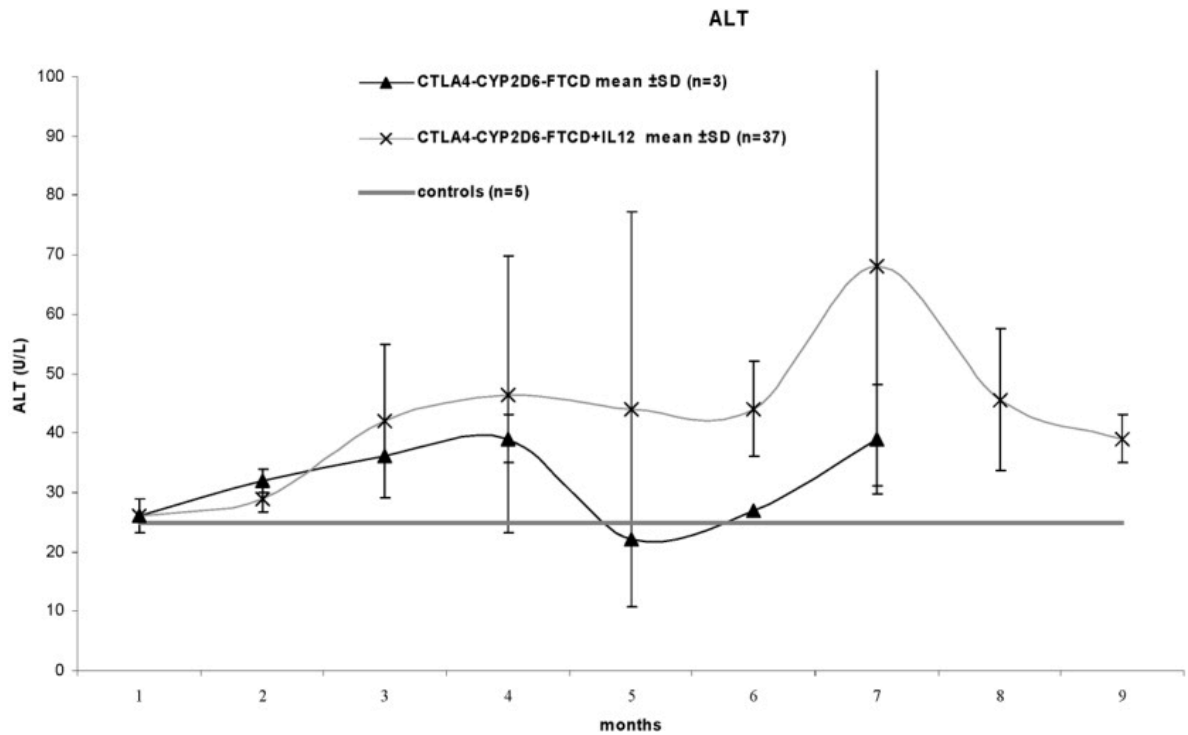
19. Steitz J, Bruck J, Steinbrink K, Enk A, Knop J, Tuting T. Genetic immunization of mice with human tyrosinase-related protein 2: implications for the immunotherapy of melanoma. *Int J Cancer* 2000;86:89-94.
20. Nowak J, Cohen EP, Graf LH, Jr. Cytotoxic activity toward mouse melanoma following immunization of mice with transfected cells expressing a human melanoma-associated antigen. *Cancer Immunol Immunother* 1991;33:91-96.
21. Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene Ther* 2000;7:1527-1535.
22. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* 2002;262:103-110.
23. Current protocols in immunology. In: John E. Coligan JE, Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W., ed. Current protocols in immunology. Volume 1. New York: John Wiley and Sons, 2000; 5.8.1-6.
24. Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435.
25. Desmet VJ, Gerber M, Hoofnagle JH, Manns M, Scheuer PJ. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 1994;19:1513-1520.
26. Yamamoto AM, Mura C, De Lemos-Chiarandini C, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Cytochrome P450IID6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:381-390.
27. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:149-173.
28. Weidt G, Utermohlen O, Zerrahn J, Reimann J, Deppert W, Lehmann-Grube F. CD8+ T lymphocyte-mediated antiviral immunity in mice as a result of injection of recombinant viral proteins. *J Immunol* 1994;153:2554-2561.

29. Hassett DE, Slifka MK, Zhang J, Whitton JL. Direct ex vivo kinetic and phenotypic analyses of CD8(+) T-cell responses induced by DNA immunization. *J Virol* 2000;74:8286-8291.
30. Boyle JS, Brady JL, Lew AM. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* 1998;392:408-411.
31. Deliyannis G, Boyle JS, Brady JL, Brown LE, Lew AM. A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6676-6680.
32. Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther* 2000;7:481-492.
33. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998;8:275-283.
34. Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J Virol* 2000;74:6278-6286.
35. Senaldi G, Portmann B, Mowat AP, Mieli-Vergani G, Vergani D. Immunohistochemical features of the portal tract mononuclear cell infiltrate in chronic aggressive hepatitis. *Arch Dis Child* 1992;67:1447-1453.
36. Lohr HF, Schlaak JF, Lohse AW, Bocher WO, Arenz M, Gerken G, Meyer Zum Buschenfelde KH. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticlonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996;24:1416-1421.
37. Frazer IH, Mackay IR, Bell J, Becker G. The cellular infiltrate in the liver in autoimmune chronic active hepatitis: analysis with monoclonal antibodies. *Liver* 1985;5:162-172.
38. Solans A, Estivill X, de la Luna S. Cloning and characterization of human FTCD on 21q22.3, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency. *Cytogenet Cell Genet* 2000;88:43-49.

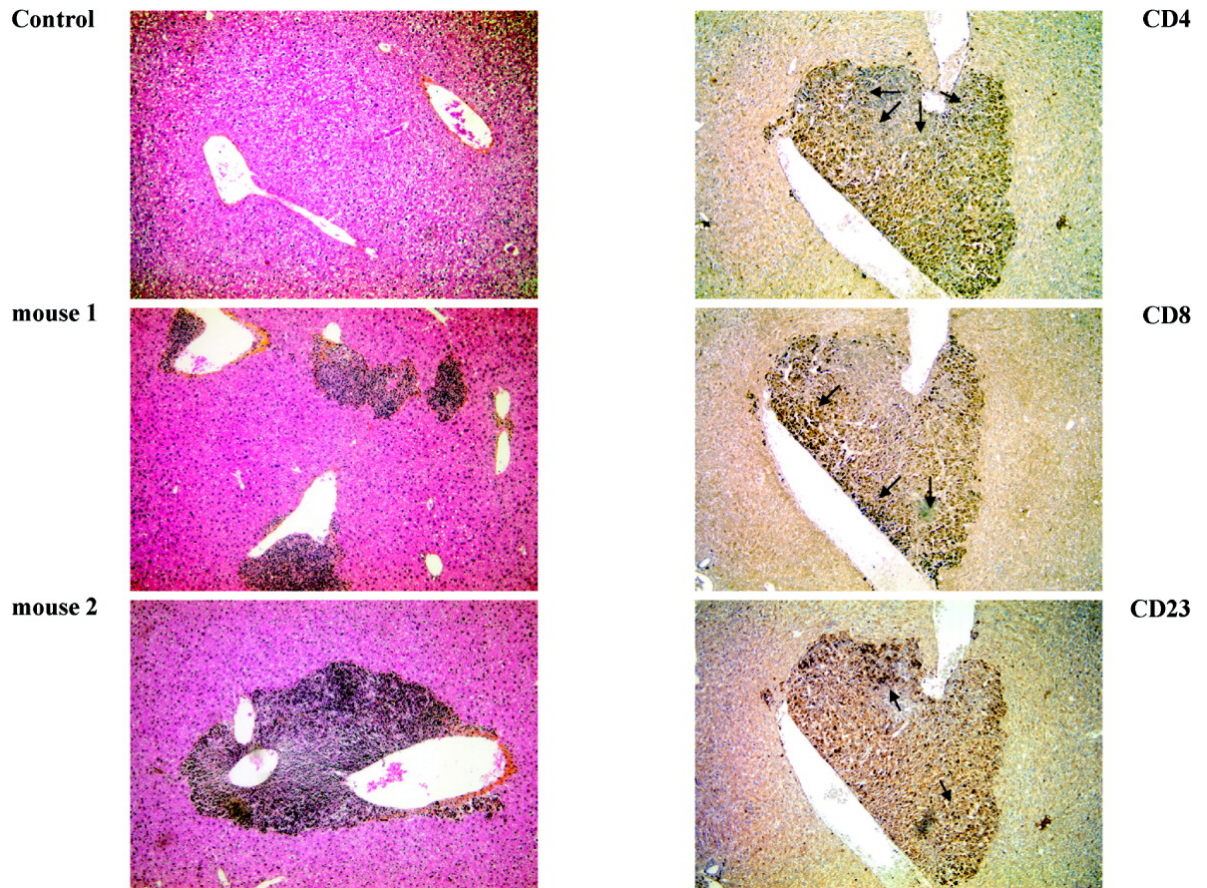
39. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T. Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi* 2003;123:369-375.
40. Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999;5:285-294.



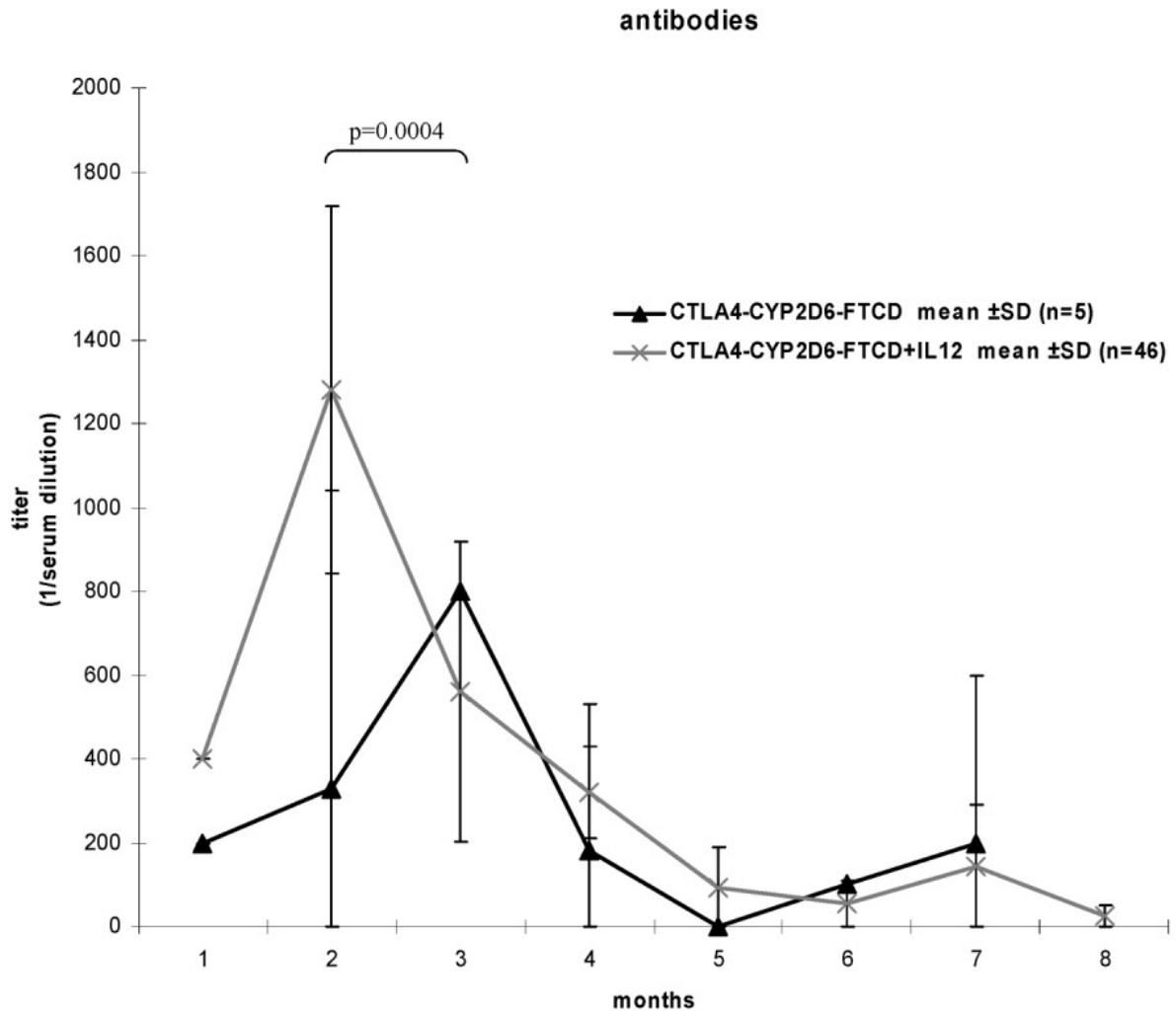
**Figure 1.** Construction and characterization of the *pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD* plasmid. **A.** Plasmid used for vaccination. CTLA-4 extracellular cDNA region was introduced to enable the secretion of the chimeric fusion protein. The plasmid also contains cDNAs coding for the antigenic regions of human CYP2D6 and FTCD. The expression of the constructed cDNA was under the control of the CMV promoter. **B.** The fusion protein is recognized by anti-LKM1 and anti-LC1 sera. The fusion protein was synthesized *in vitro* (P) and the protein was immunoprecipitated with either anti-LKM1 sera (1) or anti-LC1 sera (2). **C.** Immunization protocol. C57BL/6 female mice were injected i.m. at 8 weeks of age and then at 2 weeks interval. Blood was drawn from 1 to 9 months after the last injection and mice were sacrificed 8 to 9 months after the last injection.



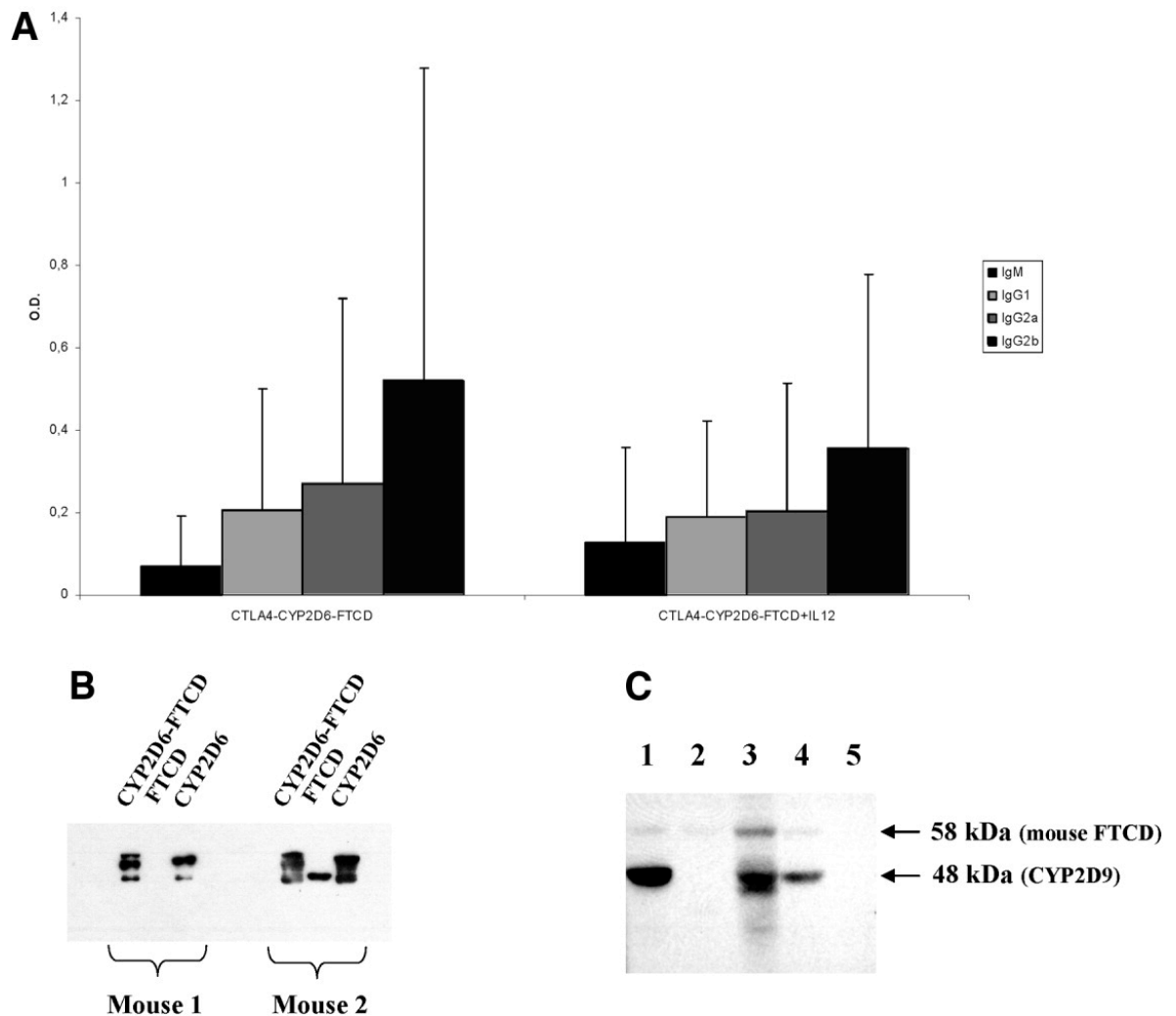
**Figure 2.** Serum Alanine Aminotransferase activity levels. Mice injected with the plasmid pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD show ALT levels increase at 4 and 7 months post-injection. Higher levels of serum ALT were observed when mice were co-injected with pVR-IL12. The control group showed no increase in their ALT levels.



**Figure 3.** *Liver histology and immunohistochemistry.* Mice injected only with pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD showed moderate inflammation of portal, periportal and intralobular distribution (mouse 1). Mice injected with both pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12 show moderate to strong inflammation with the same distribution. Mice in the control group showed no inflammation. To characterize the inflammatory infiltrate, immunohistochemistry was used. The infiltrate was mainly composed of CD4<sup>+</sup> lymphocytes distributed throughout the portal tracts (arrows). CD8<sup>+</sup> lymphocytes were mainly located in the periportal and perivascular area (arrows) and B lymphocytes were sparsely distributed (arrows).



**Figure 4.** *Anti-LKM1 and anti-LC1 antibodies titres.* Mice injected with pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12 show a sharp peak of antibodies at 2 months post-injection. The second group injected only with pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD show a peak 3 months post-injection at a lower titre ( $p=0.0004$ ). A slight increase of antibodies titres at 7 months coincides with the highest serum ALT levels recorded (figure 2). The control group showed no antibodies.



**Figure 5.** *Characterization of the B cell response.* **A.** Antibodies are mainly of the IgG2 subclass (IgG2a and IgG2b). Similar distribution was observed in mice co-injected or not with pVR-IL12. **B.** Antibodies recognize mainly CYP2D6 and the fusion chimeric protein (mouse 1). Some mice recognize all three proteins (CYP2D6-FTCD, FTCD, CYP2D6), (mouse 2). **C.** Specific autoantibodies in mouse sera. Mouse sera were positive for anti-LKM1 (1, 4) or anti-LC1 (2) or both (3) proteins of 48 kDa and 58 kDa were recognized when tested by western blot using mouse liver homogenate.



TABLE

Plasmids used for injection	ELISA (n)			Western Blot (n)		
	Fusion protein only	fusion protein+ CYP2D6	fusion protein +CYP2D6 +FTCD	Fusion protein only	fusion protein+ CYP2D6	fusion protein +CYP2D6 +FTCD
PCMV	0%	0%	0%	0%	0%	0%
IL12	0%	0%	0%	0%	0%	0%
CTLA4-CYP2D6-FTCD	0%	100% (2)	0%	0%	50% (1)	0%
CTLA4-CYP2D6-FTCD+IL12	48% (12)	40% (10)	12% (3)	0%	8% (2)	12% (3)

**Table I.** *Characterization of the B cell response for the four groups of mice used.* This table describes the results obtained when mouse sera was tested by either western blot or ELISA, against CYP2D6-FTCD, CYP2D6 and FTCD. Mouse sera reacted mainly against the fusion protein (CYP2D6-FTCD) by ELISA. Reactivity against the denatured antigens as tested by western blot was infrequent.

## **Étude de l'influence du patrimoine génétique sur le développement de l'HAI**

Le modèle expérimental d'HAI de type 2 que nous avons développé ayant été basé sur une souris non transgénique (C57BL/6), il permet d'étudier l'impact du patrimoine génétique sur la susceptibilité à développer une HAI. Prenant avantage de ceci, nous avons tenté d'induire une HAI chez des souris de trois souches différentes : les souris C57BL/6 avec lequel le modèle avait été développé, les souris 129S/v possédant le même CMH que les C57BL/6 mais chez qui les gènes hors du complexe CMH étaient différents et finalement, les BALB/c qui possède un CMH et des gènes hors du complexe CMH différent des C57BL/6 et des 129S/v.

**2.1 Article 4 « Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development. » (J Autoimmun. 2006 Mar;26(2):82-9.)**

**Contribution des différents auteurs**

PL : Conception du projet, réalisation des expérimentations et rédaction de l'article

KB : Réalisa certaines expérimentations et participa à la rédaction de l'article

IS : Participa à la rédaction de l'article

FA : Conception et supervision du projet et rédaction de l'article

**TYPE 2 AUTOIMMUNE HEPATITIS MURINE MODEL: THE INFLUENCE OF  
GENETIC BACKGROUND IN DISEASE DEVELOPMENT**

**Authors:** Pascal Lapierre\*, Kathie Béland\*, Idriss Djilali-Saiah\* and Fernando Alvarez\*.

**Affiliations:** \*Service de gastroentérologie et nutrition, Hôpital Sainte-Justine,  
3175 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5

**Running title:** Genetic susceptibility in type 2 AIH.

**List of abbreviations:** AIH, autoimmune hepatitis; LC1, liver cytosol type 1; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; LKM1, anti-liver kidney microsome type 1.

**KeyWords:** Autoimmunity, MHC, animal model, autoantibody

**Financial support:** This work was supported by the Canadian institutes of health research grant (mop\_36524) to F.A.

**Contact Information:** Fernando Alvarez, M.D.

Service de gastroentérologie

Hôpital Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) Canada H3T 1C5

Tél.:(514) 345-4626, Fax :(514) 345-4999

**ABSTRACT**

Genetic predisposition is recognized as an important factor for the development of autoimmune hepatitis (AIH). To assess the potential contribution of MHC and non-MHC genes, type 2 AIH was reproduced in three mice strains, taking advantage of their different genetic makeup with regard to MHC and non-MHC genes. Mice (C57BL/6, 129/sv and BALB/c) were DNA vaccinated with a pCMV-CTLA4-CYP2D6-FTCD plasmid coding for the extracellular region of CTLA-4 and for the antigenic region of the CYP2D6 and FTCD, and with pCMV-IL12. ALT and total IgG levels, liver histology, FACS analysis and liver T-cell cytotoxicity assays were monitored up to 8 months post-injection. C57BL/6 mice showed elevated serum ALT levels, autoantibodies, antigen-specific cytotoxic T-cells and lobular and periportal inflammatory infiltrate. The 129s/v mice showed slightly elevated ALT levels, sparse liver lobular infiltrate and cytotoxic T-cells. The BALB/c mice showed no liver inflammation. All mice had elevated total serum IgG levels. This murine model of type 2 AIH shows that MHC and non-MHC genes contribute to the susceptibility to autoimmune hepatitis. The understanding of the genetic determinants implicated in AIH development will be a major advance in the study of its pathogenesis and could lead to a better diagnostic approach and preventive strategies.

## INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) is a disease of unknown aetiology characterized by a progressive destruction of the hepatic parenchyma by the immune system[1-3]. Progression to cirrhosis and end stage liver disease may occur in 10-20% of cases and liver transplantation may be necessary[1, 3], even when the appropriate available treatment is administered. Particular characteristics of this disease are the presence of a hypergammaglobulinemia and circulating autoantibodies. These autoantibodies allowed the classification of AIH into 2 types. Type 1 is characterized by the presence of anti-smooth muscle and/or anti-nuclear antibodies, whereas type 2 shows anti-liver kidney microsomal type 1 and/or anti-liver cytosol type 1 antibodies [4-6]. Previous work has shown that the targets of LKM1 and LC1 antibodies are cytochrome P-450 2D6 (CYP2D6)[7], and formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD)[8] respectively; both autoantigens are mainly expressed in hepatocytes[9, 10].

A model of type 2 autoimmune hepatitis using xenoinmunization with human CYP2D6 and FTCD antigens of wild-type C57BL/6 mice was recently developed in our laboratory[11]. These mice showed an increase of serum alanine aminotransferase (ALT) levels, circulating anti-LKM1 and anti-LC1 autoantibodies associated with massive infiltration of the liver by lymphocytes. This model is particularly appropriate for the study of the influence of the genetic background on the development of the disease. Susceptibility to autoimmune hepatitis in humans has been shown to be related to both the MHC haplotype and to non-MHC genes[12-16]. Further studies have implicated different loci with either type 1 or type 2 autoimmune hepatitis[17-20].

To evaluate the importance of the genetic background on the development of AIH and to further validate our animal model of type 2 AIH, we have compared the susceptibility of three mouse strains displaying similar or different MHC and non-MHC genes to develop a type 2 AIH.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **DNA vaccination**

The DNA vaccination was done using the pRc/CMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD vector as described[11] along with pVR-IL12 plasmid (kindly provided by G. Prud'homme, Montreal, Canada). All the plasmids were propagated in *E. Coli* by standard techniques and purified using QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA), according to the manufacturer's guidelines.

C57BL/6, BALB/c and 129S/v mice were used due to their different genetic makeup (Table 1). In mouse, the H-2 denomination refers to both class I and class II genes. The C57BL/6 mice have been previously found to be susceptible to develop an AIH following vaccination with pRc/CMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12[11]. The 129S/v mice were used because they share the same MHC class I and II genes with the C57BL/6 but have different non-MHC genes (Table I). The BALB/c mice were used because they have different MHC and non-MHC genes (Table 1). By testing these strains, it will be possible to evaluate the importance of MHC and non-MHC genes in AIH development.

Six to eight weeks old females (20) C57BL/6, BALB/c, 129S/v mice were injected under general anesthesia in the internal tibial muscle with 100 µg (50 µl) of both plasmids (pRc/CMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD, pVR-IL12) dissolved in saline buffer. Mice were injected three times, at two weeks interval. Control mice of each strain were injected with the pVR-IL12 plasmid only following the same protocol (100 µg, 3 times).

### **Serum alanine aminotransferase (ALT) activity**

Serum ALT levels were measured in a Beckman-Synchron CX9 apparatus, from blood samples taken every month after the last plasmid injection.

### **Total serum IgG measurement**

Mouse total serum IgG were measured by ELISA. Briefly, sera from non-injected (controls) and injected mice (control and experimental) were applied to a 96-well ELISA plate in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.6, overnight at 4°C. After blocking with 5 mg/mL BSA in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> for 2 h at 4°C, 100 µl of anti-mouse IgG conjugated to alkaline phosphatase (1/3000) (Biosource International, Camarillo, CA) was added and incubated for 2 hours at room temperature. The plates were washed and the alkaline phosphatase activity was revealed by incubation with *p*-nitrophenyl phosphate, the results were read at 405 nm. Results were expressed as times above normal serum levels.

### **Histopathology and immunohistochemistry**

Vaccinated mice were sacrificed eight months after the last plasmid injection, and their livers were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned, and stained with H&E. Characterization of the lymphocyte infiltrate was made by immunohistochemistry using specific antibodies against murine CD3, CD4, CD8 and CD23 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) according to published protocols[21]. Histopathological examination of various organs (heart, kidney, brain, small intestine) was also performed to evaluate possible extra-hepatic inflammations.

### **ELISA**

ELISA was performed as described[22]. Briefly, the fusion protein produced by the pMAL-cR1-CYP2D6-FTCD plasmid was purified and used as antigen in this ELISA (0.2 µg/well). An antiserum was considered positive if its specific OD was at least 2 times higher than the mean OD of the preimmune mice sera. The same technique was applied to establish the Ig subclass using anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA and anti-IgM secondary antibodies (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Canada).

### **Preparation of mouse liver microsomal and cytosolic fractions**

Normal mouse livers were homogenized with a Potter-Elvehjem in lysis buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7.4) at 4°C. The crude



homogenate was centrifuged at 500 g for 10 minutes, and the supernatant was centrifuged at 10,000 g for 20 minutes. The pellet was discarded and the supernatant was fractioned into cytosolic fraction (supernatant) and microsomal fraction (pellet) by a 40 minute period of centrifugation at 100,000 g. To ensure fraction purity, the supernatant was centrifuged again for 40 minutes at 100,000 g.

### **Western blot analysis**

Proteins from the cytosolic and microsomal fractions were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada). The western blot technique was carried out as previously described[11]. Briefly, the membrane was blocked with 5% powder milk then incubated with the mouse sera (1/200) for two hours. After washing, the filter was incubated with peroxidase-conjugated Anti-mouse IgG (Biosource International, Camarillo, CA). Bound peroxidase was revealed by chemiluminescent blotting substrate (Boehringer Mannheim, Germany).

### **Flow cytometry analysis**

Phenotype of isolated hepatic lymphocytes has been analyzed by three color immunofluorescence, using different monoclonal antibodies. Each reaction was carried out with  $1 \times 10^5$  cells at 4°C. The following antibodies were used; anti-mouse CD8 Allophycocyanin (APC) conjugated (Santa Cruz Biotechnology, CA), anti-mouse CD4 Fluorescein-isothiocyanate (FITC) conjugated (Santa Cruz Biotechnology, CA) and anti-mouse CD45R R-phycoerythrin (PE) conjugated (Santa Cruz Biotechnology, CA) respectively. Fluorescence positive cells were analyzed with a FACScan unit (Becton Dickinson, CA).

### **Cytotoxicity assay**

EL4 cells, an H-2b lymphoma T cell line (ATCC), served as targets for 129S/v and C57BL/6 mouse. Autologous splenocytes from BALB/c unvaccinated mouse served as target for BALB/c mouse. Briefly,  $1 \times 10^4$  target cells were coated with CTLA-4-CYP2D6-

FTCD fusion protein and left for 24 hour for antigen processing. The cells were then incubated with serial dilutions of between  $1 \times 10^4$  and  $5 \times 10^5$  of effector cells in a final volume of 200  $\mu$ l. After 5 h of incubation at 37°C, the release of lactate dehydrogenase was measured at 490 nm using the CytoTox 96 assay kit (Promega, Madison, WI). Lysis percentage was calculated by the formula:  $100 \times (A - B - C) / (D - C)$ , in which A is experimental value (test release), B is spontaneous background signal value from effector cells, C is spontaneous background signal value from target cells, and D is the target maximum signal value. Maximum release and spontaneous release were determined by incubating the cells with lysis solution and culture medium, respectively.

## RESULT

### **Alanine Aminotransferase and total IgG levels**

Serum ALT levels were used to monitor disease activity. As opposed to the other 2 strains, the C57BL/6 mice showed abnormal ALT levels by 3 months post-injection (Figure 1). These elevated levels were maintained throughout the 7 month study. As was previously reported [11], 60% of C57BL/6 mice developed an AIH following peripheral plasmids vaccination; the others were considered non-responders. Total IgG levels show a statistically significant elevation for the 129s/v and BALB/c strains while C57BL/6 showed a trend toward elevated levels, control mice (injected with pVR-IL12 only) had normal IgG levels (Figure 2).

### **Histology and immunohistochemistry**

Mice were sacrificed eight months after the last injection and histological examination of several organs was carried out. The liver of BALB/c mice did not show any inflammatory infiltrate. The 129/sv mice showed isolated foci of intra-lobular infiltration, but no lymphocytes were found in the portal tracts. C57BL/6 responder mice showed an intense portal tract lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate, interface hepatitis and foci of intralobular inflammation (Figure 3). No other organs showed any inflammation. The liver inflammatory infiltrate was composed mainly of CD4+ cells and CD8+ cells were located in the periphery of the infiltrate, they are seen invading the surrounding parenchyma (Figure 3).

### **B cell response**

The combined anti-LKM1 (anti-CYP2D6) and anti-LC1 (anti-FTCD) titers were measured every month during the study. Elevated titers of antibodies against the antigens expressed by the injected plasmid DNA (CYP2D6 and FTCD) were observed 1 month after the last injection in C57BL/6 and 129/sv mice. Low levels of antibodies were found in sera from BALB/c mice (Figure 4), indicating that the DNA vaccination was successful in generating

a B-cell response against the human antigen used. High titers of antibodies were detected in sera from C57BL/6 mice during the follow-up while high titers were transient in 129/sv (Figure 4).

Sera from the three mouse strains were tested by western blot against proteins of liver cytosolic and microsomal fractions. BALB/c mice sera showed no autoantibodies (Figure 5). 129/sv mice display low levels of antibodies of various specificities (Figure 5). C57BL/6 mice sera have specific antibodies against proteins of the cytosol and microsomal fractions. These proteins have the same molecular weight (48 kDa and 58 kDa) than mouse CYP2D9 and FTCD. The CYP2D9 is the cytochrome P450 from the 2D subfamily expressed in mouse liver, with a 78% homology with human CYP2D6. All three group of mice (BALB/c, 129/sv and C57BL/6), had an IgG2 subclass response against the CYP2D6-FTCD antigen (data not shown).

### **T cell response**

Immunohistochemistry results were confirmed by FACS. Higher numbers ( $2.5 \times 10^6$  compared to  $1 \times 10^6$  cells) of lymphocytes were isolated from livers of C57BL/6 responders than from non-responder or non-injected animals (controls). The liver infiltrate is composed mainly of CD4+ cells in C57BL/6 mice developing type 2 AIH, and the ratio of CD4+ to CD8+ cells in the liver shifts from 1:1 to 2:1 following DNA vaccination (Figure 6).

Cells isolated from the spleens and livers of vaccinated mice were used in a cytotoxicity assay. Lymphocytes isolated from the spleen of all three strains, showed low levels of cytotoxicity while liver lymphocytes from C57BL/6 mice showed CYP2D6 and/or FTCD specific cytotoxic activity of up to 70% when a ratio of 20:1 was used (Figure 7). The 129/sv mice exhibited intermediate levels of specific cytotoxicity (20%), while the BALB/c mice revealed no detectable cytotoxicity.

## DISCUSSION

This study clearly shows that both MHC and non-MHC genes contribute to the development of type 2 autoimmune hepatitis in this murine model. The clear difference observed in both disease occurrence and intensity in the various strains (as summarized in table 1) highlights the importance of the genetic makeup in the development of AIH. These observations show that the genetic susceptibility is based on both a particular MHC and non-MHC background. This suggests that a class II MHC haplotype (H-2<sup>b</sup>) is permissive but not sufficient for the development of a full fledged AIH in this murine model. The relevance of an animal model for the study of a human pathology lies mainly on its pathogenic similarities with it. Studies on the genetic predisposition of human AIH identified both MHC and non-MHC genes as contributors to AIH susceptibility[12-20]. The fact that this model exhibits the same complexity in its genetic predisposition as human AIH increases its usefulness as a model for future studies.

No known mouse strains develop an AIH spontaneously. Several attempts have been made in recent years to find an adequate model for the study of AIH pathogenesis and eventually to try new therapeutic approach. Autoimmune hepatitis was produced by intraperitoneal injection of a 100,000g supernatant of syngeneic liver homogenate (S-100) in complete Freund's adjuvant. In this model, C3H and BALB/c mouse strains were less susceptible than C57BL/6 to develop an AIH[23]. Recently, C57BL/6-TGF- $\beta$ 1 knockout mouse, a model of systemic and frequently deadly inflammation starting in the neonatal period, was extensively back-bred on a BALB/c and 129/cf-1 background[24]. The liver inflammatory infiltration was more aggressive in the BALB/c-TGF- $\beta$ 1 knockout mouse than in the other two strains. Altogether these results, and those presented here, show that no strain can be labeled as 'liver autoimmunity prone' and that complex associations of MHC and non-MHC genes are responsible for a susceptibility to develop a liver autoimmune inflammation. The identification of specific genetic determinant will need to be performed using a mouse model with the most similarities with human AIH if parallel are to be drawn between mouse and humans for susceptibility genes.

A similarity observed between this murine model of AIH and human AIH is the elevated total serum IgG levels. Elevated IgG levels are a key characteristic of human AIH and are a definite criteria for the diagnosis of AIH[2]. In our experiment, all three mice strains show elevated IgG levels. This increase does not correlate with the disease activity or with the presence of specific autoantibodies, similar findings have been observed in humans with AIH [22, 25]. This increase in total serum IgG probably reflects a non-specific, polyclonal activation of B cell and could be attributed to a general immune system activation rather than with a specific process. The xenoimmunization could be the source of this immune system activation. In this study, it was found that injection of the pVr-IL12 plasmid alone does not increase serum levels of total IgG. However, when the pVr-IL12 plasmid is coinjected with the plasmid coding for the autoantigens (pRc/CMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD), hence used as an adjuvant, it cannot be excluded that the production of IL12 during the immune system exposition to CYP2D6 and FTCD could be partially responsible for the elevated IgG levels observed. An IL-12 mediated increase of IgG might be relevant in this murine model of AIH as the IL-12 receptor (Il-12R $\beta$ 2) has been found to be significantly upregulated in human liver biopsies of AIH patients[26], implicating IL-12 in the pathogenesis of AIH.

The model of type 2 AIH by xenoimmunization reported here displays a CD4 mediated response with a T<sub>h</sub>1 phenotype [11] and is triggered by a molecular mimicry mechanism. This is confirmed by the fact that the autoantibodies produced by the three groups of mice are mainly of the IgG2 subclass, which is indicative of a T<sub>h</sub>1-type response. This infers that a class II MHC dependent presentation of specific epitopes occurs. The contribution of a particular class II MHC is necessary but not sufficient for the development of AIH, as shown by the difference in the liver inflammation displayed by the 129S/v and the C57BL/6. The 129S/v mice display a mild autoimmune response, but did not reach the intensity displayed by the C57BL/6 responders. While the C57BL/6 and 129/sv mice are H-2<sup>b</sup> there is a difference in the L locus of the class I region, the 129/sv are H2-L<sup>b</sup> while the

C57Bl/6 are H2-L<sup>null</sup>. When compared to other class I molecules, H2-L is expressed at low level at the cell surface, has a slower rate of intracellular transport and a weaker association with  $\beta_2m$ [27]. The absence of the H2-L molecule in the C57BL/6 mouse, presenting the most active autoimmune hepatitis, could mean that, either this molecule has no direct role in the pathogenesis of AIH or the H2-L allele carried by the 129S/v and BALB/c mice protects against the development of autoimmune hepatitis. This may lead to the speculation that other genes promote the autoimmune response and/or inhibit autoimmune regulatory pathways. Recently, it was described that lower numbers and a diminished ability to expand CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells is observed in autoimmune hepatitis patients[28]. CD4(+)CD25(+) are a key component of the immune system regulation, preventing the activation of autoreactive T-cells[29]. This pathway needs to be investigated in this murine model of type 2 AIH.

It could be speculated that the inflammation seen in the C57BL/6 mice is not antigen-specific and could have occurred with any foreign antigen. However, C57BL/6 mice have been extensively tested in DNA vaccination protocols very similar to ours (intramuscular injection of 100  $\mu$ g of both, a plasmid coding for an antigen and a plasmid coding for murine IL-12)[30, 31] and no liver dysfunction or inflammation[32] were reported. Therefore, we can assume that the immune manifestations seen in these mice are specific to the antigens used.

The titer of autoantibodies and their persistence during the follow-up period, as well as their specificity against mouse antigens in C57BL/6 mice confirms our previous hypothesis that hepatocyte injury and the subsequent liberation of intracellular proteins maintains a constant stimulation on the immune system[11]. This observation should be confirmed by the identification of specific epitopes recognized by mouse antibodies on the human and mouse homologous antigens. The absence of autoantibodies reactivity against mouse proteins by vaccinated BALB/c mice probably indicates that the initial low titer reactivity against human antigens are directed toward non-homologous epitopes, and that these may

not have sufficient homology with their mouse counterpart to elicit an autoimmune response through a molecular mimicry mechanism. These results indicate that the H-2<sup>b</sup> haplotype expressed by C57BL/6 and 129s/v mice enables the development of an AIH in this model, but it does not exclude that a different MHC could potentially generate a similar liver inflammatory disease.

In conclusion, a particular MHC (H-2<sup>b</sup>) is important but not sufficient to produce an AIH in this murine model. Non-MHC genes seem to be important to mount an effective immune response against murine autoantigens and produce an autoimmune hepatitis with similar pathophysiological manifestations as human AIH. The complex interactions between MHC and non-MHC genes for AIH susceptibility observed replicates what has been found in human AIH. Therefore, this model will prove to be useful for the study and identification of specific genetic determinants involved in the susceptibility and pathogenesis of autoimmune hepatitis, as well as factors known to influence human AIH development such as age and sex.

The clinical implications of reliable models of autoimmune disease cannot be minimized. The understanding of the genetic determinants and triggering factors implicated in AIH development and perpetuation will lead not only to better diagnostic approach and more specific immunotherapies but perhaps to preventive strategies in families at risk.



**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Professor Claude C. Roy, MD for critical reading. We are grateful to Ms. Troesch for the FACS analysis.

## REFERENCES

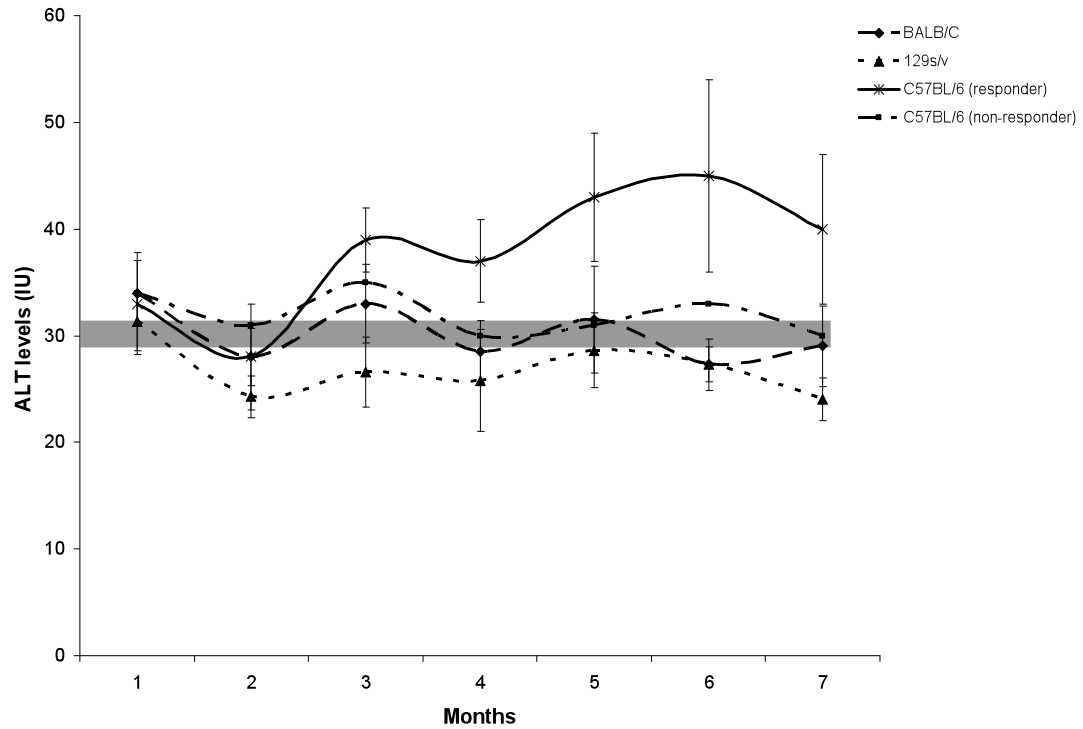
1. Alvarez F. Autoimmune hepatitis. In: Suchy F, Sokol RJ, Baliestreri W, Editors. Liver disease in childhood. Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 429-441
2. Alvarez F., Berg P.A., Bianchi F.B., Bianchi L., Burroughs A.K., Cancado E.L., Chapman R.W., Cooksley W.G., Czaja A.J., Desmet V.J., Donaldson P.T., Eddleston A.L., Fainboim L., Heathcote J., Homberg J.C., Hoofnagle J.H., Kakumu S., Krawitt E.L., Mackay I.R., MacSween R.N., Maddrey W.C., Manns M.P., McFarlane I.G., Meyer zum Buschenfelde K.H., Zeniya M. and et al. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol*; 31: 929-38.
3. Krawitt E.L. 1996. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med*; 334: 897-903.
4. Martini E., Abuaf N., Cavalli F., Durand V., Johanet C. and Homberg J.C. 1988. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology*; 8: 1662-6.
5. Homberg J.C., Abuaf N., Bernard O., Islam S., Alvarez F., Khalil S.H., Poupon R., Darnis F., Levy V.G., Grippon P. and et al. 1987. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology*; 7: 1333-9.
6. Maggiore G., Veber F., Bernard O., Hadchouel M., Homberg J.C., Alvarez F., Hadchouel P. and Alagille D. 1993. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 17: 376-81.
7. Gueguen M., Meunier-Rotival M., Bernard O. and Alvarez F. 1988. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med*; 168: 801-6.
8. Lapierre P., Hajoui O., Homberg J.C. and Alvarez F. 1999. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*; 116: 643-9.

9. Tabor H. and Wyngarden L. 1959. The enzymatic formation of formiminotetrahydrofolic acid, 5,10-methenyltetrahydrofolic acid, and 10-formyltetrahydrofolic acid in the metabolism of formiminoglutamic acid. *J Biol Chem*; 234: 1830-46.
10. Gonzalez F.J., Skoda R.C., Kimura S., Umeno M., Zanger U.M., Nebert D.W., Gelboin H.V., Hardwick J.P. and Meyer U.A. 1988. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*; 331: 442-6.
11. Lapiere P., Djilali-Saiah I., Vitozzi S. and Alvarez F. 2004. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology*; 39: 1066-74.
12. Page A.R., Sharp H.L., Greenberg L.J. and Yunis E.J. 1975. Genetic analysis of patients with chronic active hepatitis. *J Clin Invest*; 56: 530-5.
13. Mackay I.R. and Morris P.J. 1972. Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8. *Lancet*; 2: 793-5.
14. Lindberg J., Lindholm A. and Iwarson S. 1977. Genetic factors in the development of chronic active hepatitis. *Lancet*; 1: 67-8.
15. Djilali-Saiah I., Ouellette P., Caillat-Zucman S., Debray D., Kohn J.I. and Alvarez F. 2001. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol*; 62: 1356-62.
16. Cookson S., Constantini P.K., Clare M., Underhill J.A., Bernal W., Czaja A.J. and Donaldson P.T. 1999. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology*; 30: 851-6.
17. Djilali-Saiah I., Renous R., Caillat-Zucman S., Debray D. and Alvarez F. 2004. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol*; 40: 904-9.
18. Donaldson P.T., Doherty D.G., Hayllar K.M., McFarlane I.G., Johnson P.J. and Williams R. 1991. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology*; 13: 701-6.

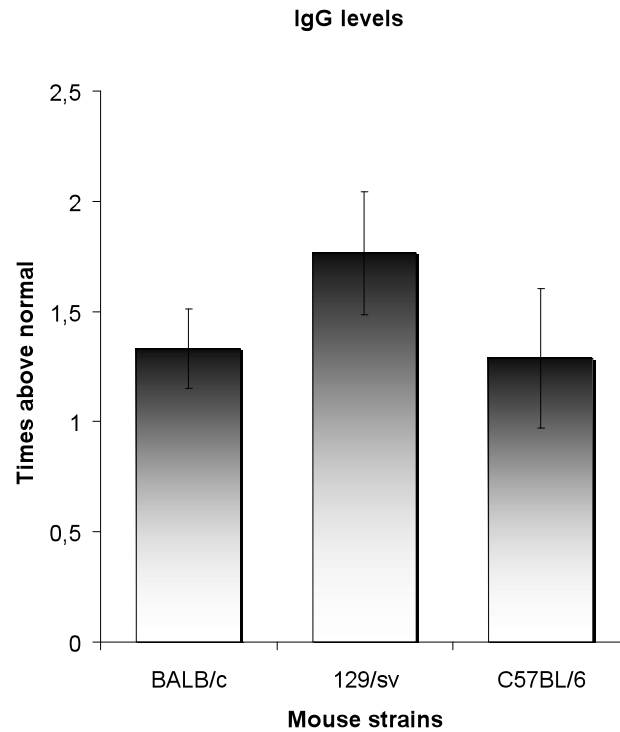
19. Mackay I.R. and Tait B.D. 1980.HLA associations with autoimmune-type chronic active hepatitis: identification of B8-DRw3 haplotype by family studies. *Gastroenterology*; 79: 95-8.
20. Seki T., Ota M., Furuta S., Fukushima H., Kondo T., Hino K., Mizuki N., Ando A., Tsuji K. and Inoko H. 1992.HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology*; 103: 1041-7.
21. in "Current protocols in immunology," John Wiley and Sons, New York, 2000.
22. Vitozzi S., Lapierre P., Djilali-Saiah I. and Alvarez F. 2002.Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods*; 262: 103-10.
23. Lohse A.W., Manns M., Dienes H.P., Meyer zum Buschenfelde K.H. and Cohen I.R. 1990.Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology*; 11: 24-30.
24. Gorham J.D., Lin J.T., Sung J.L., Rudner L.A. and French M.A. 2001.Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol*; 166: 6413-22.
25. Gregorio G.V., McFarlane B., Bracken P., Vergani D. and Mieli-Vergani G. 2002.Organ and non-organ specific autoantibody titres and IgG levels as markers of disease activity: a longitudinal study in childhood autoimmune liver disease. *Autoimmunity*; 35: 515-9.
26. Chernavsky A.C., Paladino N., Rubio A.E., De Biasio M.B., Periolo N., Cuarterolo M., Goni J., Galoppo C., Canero-Velasco M.C., Munoz A.E., Fainboim H. and Fainboim L. 2004.Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Hum Immunol*; 65: 683-91.
27. Beck J.C., Hansen T.H., Cullen S.E. and Lee D.R. 1986.Slower processing, weaker beta 2-M association, and lower surface expression of H-2Ld are influenced by its amino terminus. *J Immunol*; 137: 916-23.

28. Longhi M.S., Ma Y., Bogdanos D.P., Cheeseman P., Mieli-Vergani G. and Vergani D. 2004. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol*; 41: 31-7.
29. Shevach E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*; 2: 389-400.
30. Katae M., Miyahira Y., Takeda K., Matsuda H., Yagita H., Okumura K., Takeuchi T., Kamiyama T., Ohwada A., Fukuchi Y. and Aoki T. 2002. Coadministration of an interleukin-12 gene and a *Trypanosoma cruzi* gene improves vaccine efficacy. *Infect Immun*; 70: 4833-40.
31. Haghighi H.R. and Prescott J.F. 2005. Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. *Vet Immunol Immunopathol*; 104: 215-25.
32. Akbar S.K., Horiike N. and Onji M. 1999. Prognostic importance of antigen-presenting dendritic cells during vaccine therapy in a murine hepatitis B virus carrier. *Immunology*; 96: 98-108.

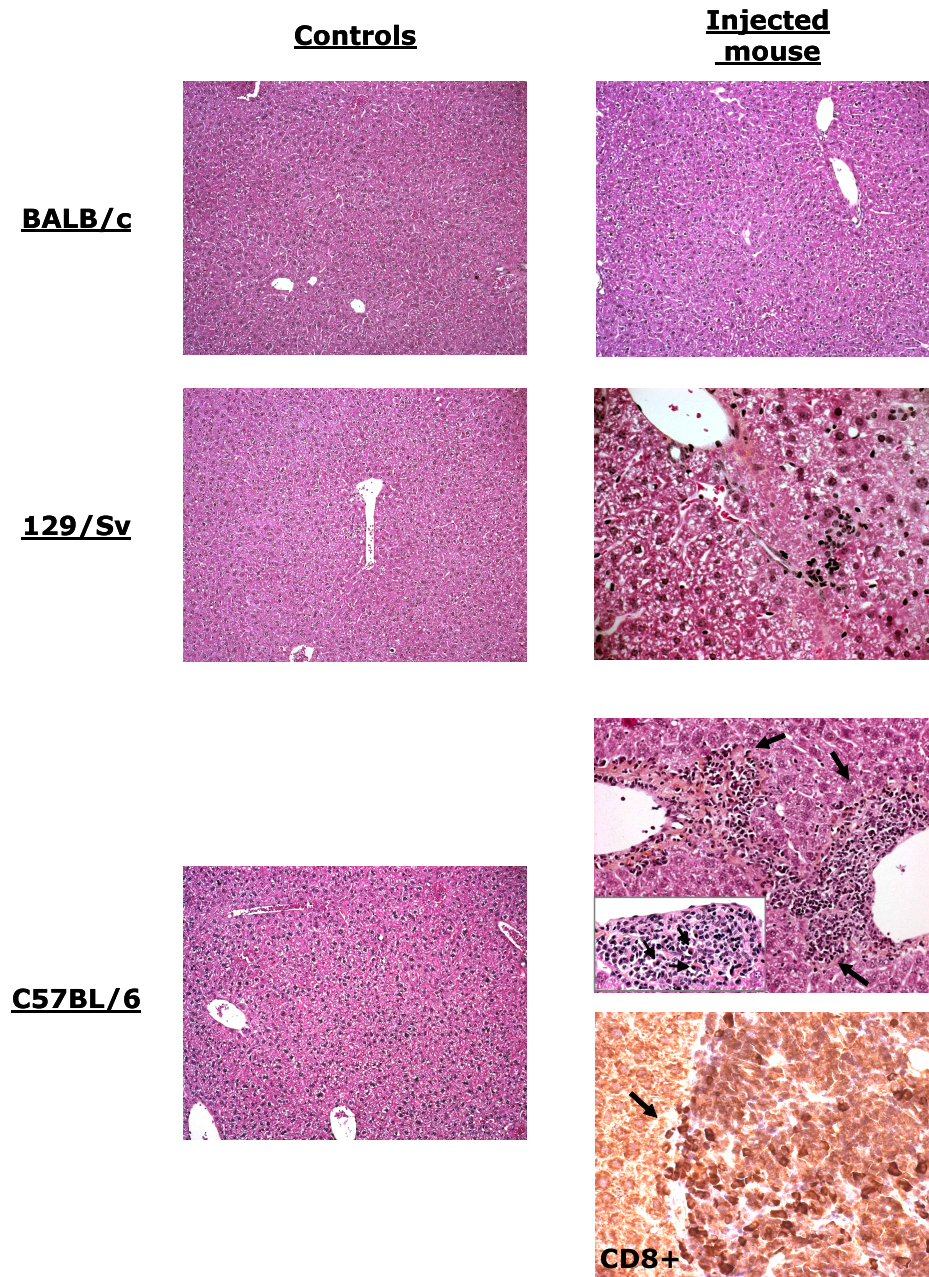
## FIGURES



**FIGURE 1. ALT serum levels in different groups of mice.** A trend toward elevated ALT serum levels was observed in C57BL/6 mice, at the 3<sup>rd</sup> and 6<sup>th</sup> month after the last plasmids injection. The non-responders C57BL/6, 129/sv and BALB/c mice showed normal levels of ALT. Normal mouse ALT levels are indicated (grey box).

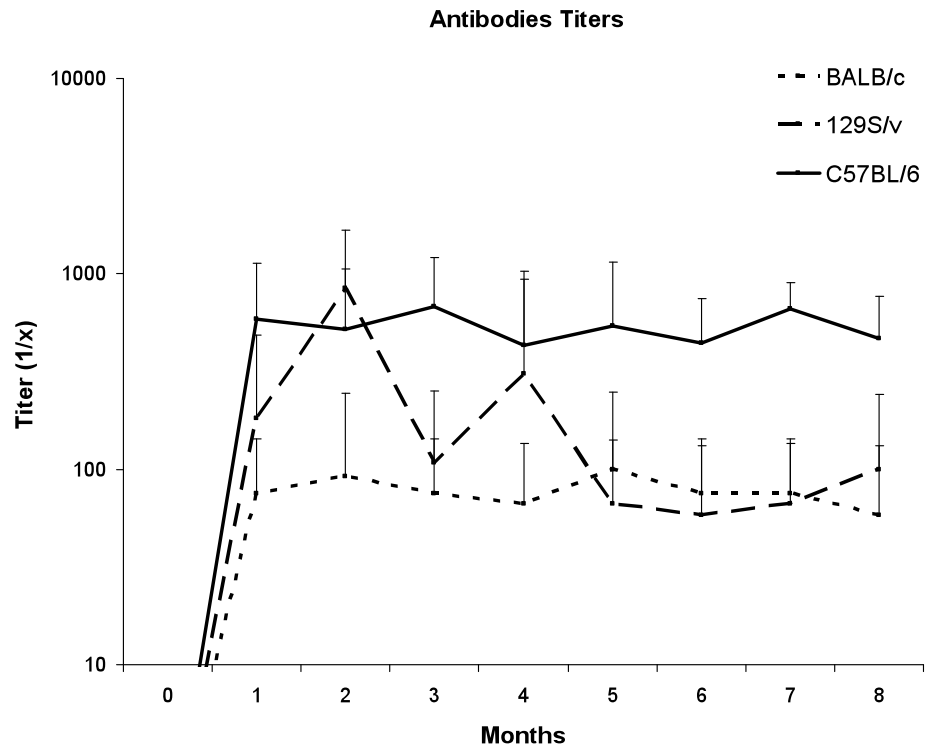


**FIGURE 2. Total serum IgG levels.** The BALB/c and 129/sv showed increased IgG levels compared to normal mice and C57BL/6 had a trend toward elevated IgG levels. Control mice of each strain (pVR-IL12 vaccinated only) had normal levels of IgG (data not shown).

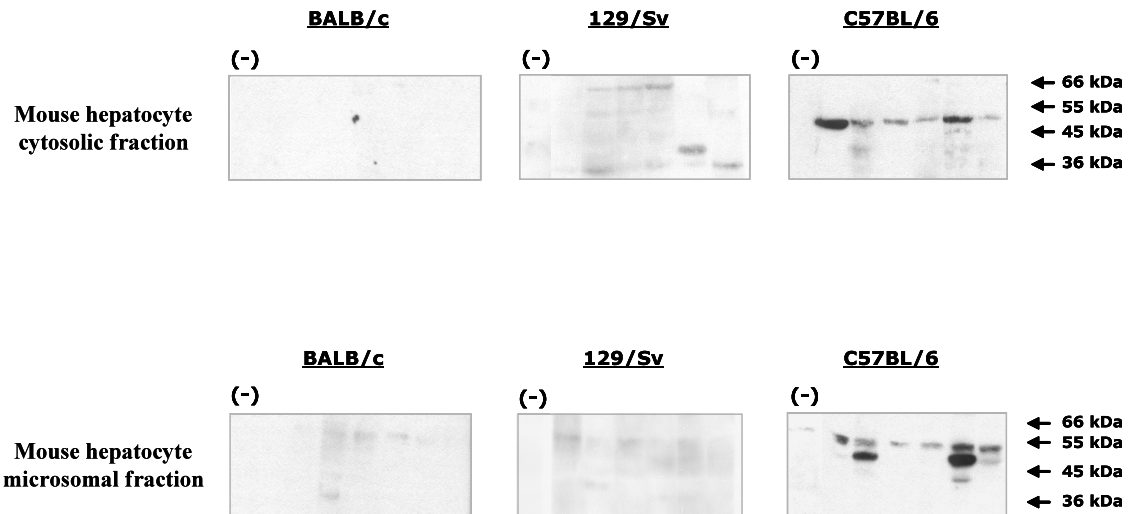


**FIGURE 3. Histological examination of livers from vaccinated BALB/c, 129/sv and C57BL/6 mice.** Control mice did not show any inflammatory infiltrate. BALB/c mice showed no differences with control animal. Injected 129/sv mice showed scarce intralobular inflammation. C57BL/6 displayed interface hepatitis and a lymphoplasmocytic infiltrate at the portal tract.

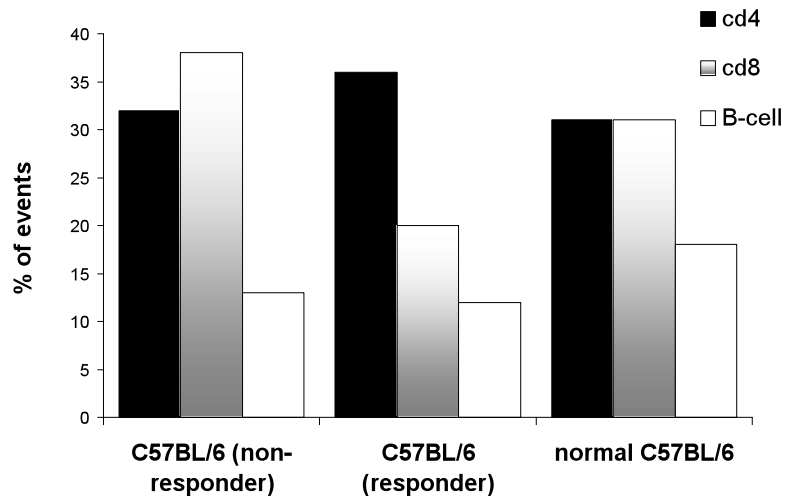




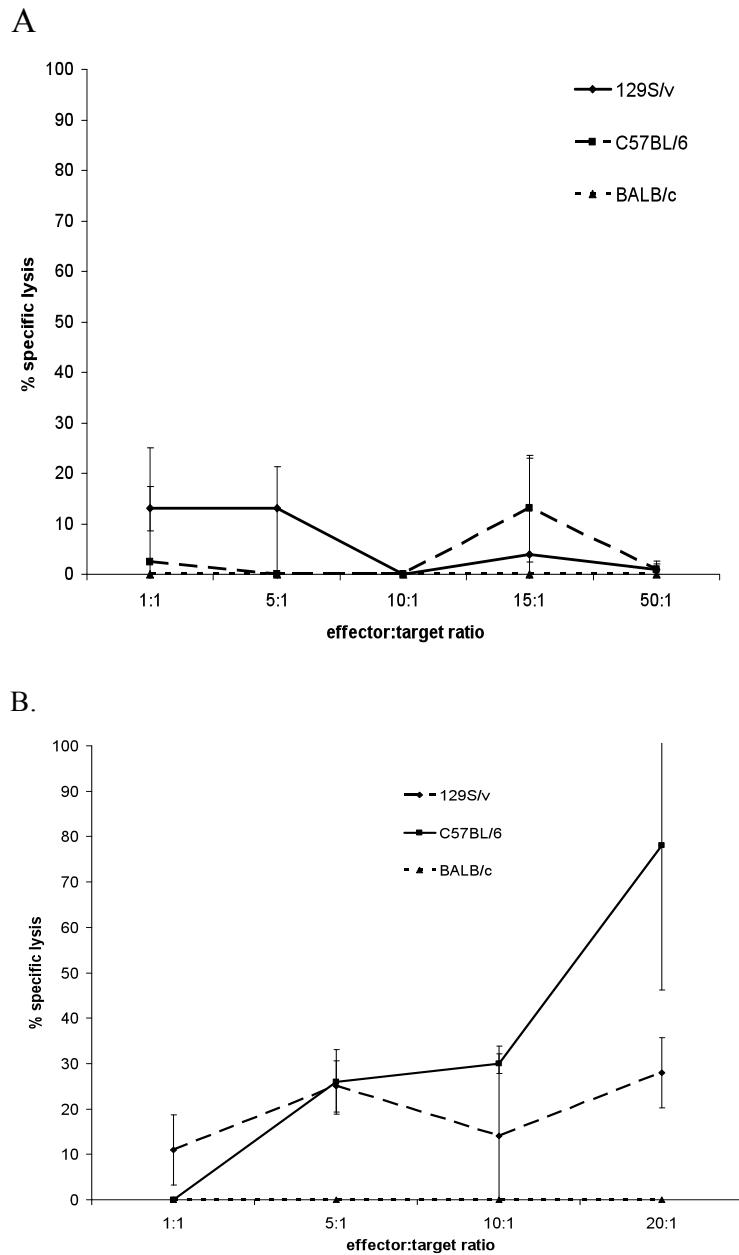
**FIGURE 4. Anti-LKM1 and anti-LC1 antibodies titers.** C57BL/6 mice show elevated titers of antibodies. 129/sv mice show a transient elevation of antibodies. BALB/c mice maintain low levels of antibodies.



**FIGURE 5. Characterization of the B-cell response.** BALB/c mice sera show no antibodies against mouse proteins. 129/sv mice display low levels of antibodies of various specificities. C57BL/6 mice sera have specific antibodies against proteins of the cytosolic and microsomal fractions. These proteins have the same molecular weight (48 kDa and 58 kDa) than mouse FTCD and CYP2D9.



**FIGURE 6. FACS analysis of liver-isolated lymphocytes.** Normal C57BL/6 hepatic lymphocytes show a ratio of 1:1 of CD4+/CD8+ cells. The same is observed in non-responder C57BL/6. C57BL/6 mice with an AIH show a ratio CD4+/CD8+ of 2:1.



**FIGURE 7. CTLs against CYP2D6 and/or FTCD .** Lymphocytes isolated from either the spleen (A) or the liver (B) were used as effectors in a cytotoxicity assay. Low levels of cytotoxicity were found for lymphocytes isolated from spleen of 129/sv and C57BL/6 mice. High levels were found for liver lymphocytes from C57BL/6 mice and moderate levels for 129/sv lymphocytes

**TABLE**

<b>Mouse Strain</b>	<b>MHC (Class I and II)</b>	<b>Elevated ALT Levels</b>	<b>Antibodies</b>	<b>Cytotoxic T-Cells</b>	<b>Portal Inflammation</b>	<b>Lobular Inflammation</b>
BALB/c	H-2 <sup>d</sup>	-	+	-	-	-
129/sv	H-2 <sup>b</sup>	-	++	+	-	+/-
C57BL/6	H-2 <sup>b</sup>	+	++++	+++	++++	++

**TABLE 1. Summary of the data obtained following the xenoimmunization with the three strains used.**

## **Influence de l'âge et du sexe sur le développement de l'HAI**

Comme nous l'avons vu précédemment, l'âge et le sexe ont une forte influence sur la susceptibilité à l'HAI. En effet, les jeunes filles représentent la majorité des patients atteints d'HAI de type 2. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène mais aucune n'a pu être prouvée. Ceci est en partie dû à l'absence de modèles animaux fiables où ce type d'étude est possible.

Dans cette étude, nous avons voulu vérifier l'existence d'un biais de susceptibilité relié au sexe et à l'âge dans notre modèle expérimental d'HAI de type 2. Puis, le cas échéant, identifier les différents mécanismes (hormones sexuelles, différences dans les différentes composantes du système immunitaire) responsables de ce biais de susceptibilité relié au sexe et à l'âge.

**3.1 Article 5 « Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis» (Hepatology. 2010 Mai;51(5):1789-98.)**

**Contribution des différents auteurs**

PL : Conception du projet, réalisation des expérimentations et rédaction de l'article

KB : Réalisa certaines expérimentations et participa à la rédaction de l'article

CM : Mise au point et réalisation des mesures d'autoanticorps anti-mFTCD

FAjr: Mise au point et réalisation des mesures d'autoanticorps anti-CYP2D9

FA : Conception et supervision du projet et rédaction de l'article

**FORKHEAD BOX P3+ REGULATORY T CELL UNDERLIES MALE  
RESISTANCE TO EXPERIMENTAL TYPE 2 AUTOIMMUNE HEPATITIS**

**Authors:** Pascal Lapierre<sup>1</sup>, Kathie Béland<sup>1</sup>, Caroline Martin<sup>1</sup>, Fernando Alvarez Jr<sup>1</sup> and  
Fernando Alvarez<sup>1,2</sup>

**Affiliations:** <sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, CHU Sainte-Justine and <sup>2</sup>Pediatrics, Université de Montréal, Canada

**Running Title:** Influence of sex on experimental AIH

**Grant support:** This work was supported by the Canadian institutes of health research grant MOP-86506 to F.A. P.L is recipient of a Canada Graduate Scholarships from the Canadian Institutes of Health Research.

**Abbreviations:** AIH, autoimmune hepatitis; FoxP3, forkhead box P3; E2, 17 $\beta$ -estradiol; FTCD, formiminotransferase cyclodeaminase; ALT, alanine aminotransferase; LKM1, Liver/Kidney Microsomal type 1; LC1, Liver Cytosol type 1; IPEX, Immune dysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy with X-linked inheritance syndrome;

**Keywords:** Autoimmunity, T cells, autoantibodies, vaccination

**Correspondence to:** Fernando Alvarez, M.D.

Department of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition

CHU Sainte-Justine

3175 Côte Ste-Catherine, Montréal (Québec) Canada H3T 1C5

Tel.:(514) 345-4626, Fax :(514) 345-4999



**ABSTRACT**

Autoimmune hepatitis (AIH), like many autoimmune diseases, is most prevalent in young women. The immunological basis of this age and gender susceptibility bias was investigated in a murine model of AIH. Xenoinmunization of seven week-old female C57BL/6 mice resulted in more severe AIH with higher levels of liver inflammation, serum ALT, specific T-cell cytotoxicity and autoantibody than younger and older females. Vaccinated males developed minimal liver inflammation and higher percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cell in PBMC, spleen and liver than females. Tregs were virtually absent in liver-lymphocytes infiltrates of females. Castration of C57BL/6 mice, with or without 17 $\beta$ -estradiol supplementation, did not modify susceptibility in males, nor Treg numbers, suggesting minimal contribution of testosterone and estradiol to AIH susceptibility. Xenoinmunized *Aire*(+/0) mouse displayed similar AIH susceptibility, gender bias and Tregs numbers as C57BL/6 mice, suggesting that susceptibility in females is not the result of less stringent thymic central tolerance. Autoreactive B cell response against formiminotransferase-cyclodeaminase correlated with disease activity, possibly linking B-cell autoreactivity and AIH pathogenesis. **Conclusion:** Peripheral tolerance and development of regulatory T cells following self-mimicking antigen exposure, and not sexual hormone nor central tolerance, are the main factors for susceptibility to AIH in females.

## INTRODUCTION

Prevalence of most autoimmune diseases shows a striking sex difference with women being affected more often than men(1, 2). The ratio of female patients versus male ranges from 20:1 in Sjogren's syndrome, to 3:2 in multiple sclerosis(2). Less frequently, the ratio approaches 1:1, as in ulcerative colitis and diabetes(2). In autoimmune hepatitis (AIH), the female to male ratio ranges from 3:1 in type 1 AIH to 9:1 in type 2 AIH(3).

Differences in the immune response have also been observed between females and males. Higher level of antibodies and stronger T cell activation are observed in women after vaccination(4). Women also have higher absolute numbers of CD4<sup>+</sup> T cells and produce higher levels of Th1 cytokines than men(5). Age also affects immune responses, including incidence of several autoimmune diseases. In AIH, 40% of cases of type 1 are diagnosed before the age of 18 years, with a mean age at onset of 10 years(6, 7), and 80% of cases of type 2 are diagnosed before 18, with a mean age at onset of 6.5 years(6, 7). A second peak of incidence of AIH has also been reported in women after menopause(8). These prepubertal and post-menopausal peaks of incidence suggest that the hormonal status could influence susceptibility to AIH.

Research on autoimmune diseases gender bias is scarce. Studies on AIH susceptibility factors, including its gender bias, have been severely limited by the lack of experimental models. Recently, a murine experimental model of AIH has been produced(9) in which mice develop a disease very similar to that observed in humans(10). This murine model of type 2 AIH is initiated by xenoinmunization of 6-8 week-old female C57BL/6 mice with human type 2 AIH antigens which, by molecular mimicry, triggers an autoreactive immune response against homologous murine liver proteins(9). C57BL/6 mice were found to be more susceptible to develop an AIH than 129S/v or BALB/c mice, showing that this model of AIH is under the influence of both major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC genes(11). The close parallels between this experimental model and AIH in humans(10, 11) are such that it is ideally suited for the study of immunological mechanisms of susceptibility to AIH on the basis of gender and age.

Herein, we report that, as in humans, female mice of a specific age were most susceptible to

develop an AIH. In these mice, a break of B cell immunological tolerance against liver proteins was detected early on and then paralleled the grade of liver inflammation. Female susceptibility was not the result of a failure in thymic negative selection of autoreactive T cells but of the generation of lower numbers of FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (Tregs) in response to xenoinmunization. Furthermore, male resistance to AIH was not mediated by testosterone nor testes-induced peripheral tolerance to liver antigens and susceptibility in females was not linked to 17 $\beta$ -Estradiol levels.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

All experiments with C57BL/6 mice (Charles River, Canada) and B6.129S2-Aire<sup>tm1.1Doi</sup>/J (The Jackson Laboratory, MN) were performed under protocols approved by the institutional committee for animal care and following guidelines published by the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Genotype of B6.129S2-Aire<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice was confirmed using 2 specific PCR reactions on tail clippings as previously described(12). Briefly, two PCR reactions were performed with the following primers: Set 1- GTCATGTTGACGGATCCAGGGTAGAAAGT and AGACTAGGTGTTCCCTC CCAACCTCAG; Set 2-. ATAGCACCACGACACCCAAG and ATATCATTCTCCA ACTCCTGCCTCTTT. In wild type mice, the first set of primers results in an amplicon of 1150 bp, while in knockout mice a fragment of 690 bp is produced. The second set of primers generates a product of 507 bp in wild type mice while in knockout mice for the *Aire* gene no amplicon is produced.

Surgical castration of 3 week-old male C57BL/6 mice was performed by Charles River, Canada. A group of castrated C57BL/6 mice received subcutaneous 90-day timed-release pellets (Innovative Research of America, FL) containing E2 (17 $\beta$ -estradiol) (1.5mg/ pellet) which reproduces murine physiological levels(13). These pellets were implanted every 90 days for the duration of the study.

### Experimental type 2 autoimmune hepatitis

Experimental AIH was induced in mice by xenoimmunization as previously described(9, 11). Briefly, C57BL/6 or B6.129S2-Aire<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice (male or female at 4, 7 or 14 weeks of age) were injected in the tibialis cranialis muscle with 100  $\mu$ g (50  $\mu$ l) of plasmids coding for type 2 AIH human autoantigens and murine IL-12 (pRc/CMV- CTLA-4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12)(9, 11) dissolved in saline buffer. Mice were injected three times, at two weeks interval. Control mice were injected with the pVR-IL12 plasmid only (100  $\mu$ g, 3 times). All plasmids were propagated in *E. Coli* by standard techniques and purified using QIAGEN Endofree Plasmid Giga Kit (QIAGEN, Santa Clarita, CA), according to the manufacturer's guidelines.

**Serum alanine aminotransferase (ALT) activity**

Serum ALT levels were measured in a Beckman-Synchron CX9 apparatus, from blood samples taken every month after the last plasmid injection.

**Histopathology and immunohistochemistry**

Mice were sacrificed and their livers were dehydrated, embedded in paraffin, sectioned, and stained with Hematoxylin-Phloxine-Safran (HPS).

**ELISA**

ELISA was performed as described(9, 11, 14). Briefly, the fusion protein produced by the pMAL-cR1-CYP2D6-FTCD plasmid (human FTCD and CYP2D6) or pEt-30C-mFTCD (murine FTCD) or pEt-30c-CYP2D9 (murine member of the P450 2D subfamily homologous to human CYP2D6) were purified and used as antigen in the ELISA (0.2 µg/well). An antiserum was considered positive if its specific OD was at least 2 times higher than the mean OD of the preimmune mice sera.

**Western blot analysis**

Proteins expressed from the pMAL-cR1-CYP2D6-FTCD or pEt-30C-mFTCD vector were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada). The western blot technique was carried out as previously described(9, 11).

**Flow cytometry analysis**

Regulatory T cells frequency in blood, spleen or amongst liver-infiltrating lymphocytes was assessed by simultaneous surface and intracellular immunofluorescence staining using the Mouse regulatory T cell staining kit (eBioscience, CA). Each reaction was performed with  $1 \times 10^6$  cells and a minimum of 200 000 events were recorded. Isotypic controls were included for each sample tested. Fluorescence positive cells were analyzed with a FACScalibur unit (Becton Dickinson,CA).

**Cytotoxicity assay**

EL4 cells, an H-2b lymphoma T cell line (ATCC, VA), served as targets for cytotoxicity assays. Briefly,  $1 \times 10^4$  target cells were incubated with CYP2D6-FTCD fusion protein and left for 24 hour for antigen processing. Cells were then co-cultured with serial dilutions of

$1 \times 10^4$  to  $5 \times 10^5$  effector cells in a final volume of 200  $\mu$ l. After 5 h of incubation at 37°C, the release of lactate dehydrogenase was measured at 490 nm using the CytoTox 96 assay kit (Promega, Madison, WI). Lysis percentage was calculated by the formula:  $100 \times (A - B - C) / (D - C)$ , in which A is experimental value (test release), B is spontaneous background signal value from effector cells, C is spontaneous background signal value from target cells, and D is the target maximum signal value. Maximum release and spontaneous release were determined by incubating cells with lysis solution and culture medium, respectively.

#### **CYP2D9 and mFTCD expression level**

RNA was isolated from thymuses of newborn mice (1-2 days old) and livers of newborn and 7 week-old C57BL/6 mice using the RNeasy Micro kit (QIAGEN, CA). Sex of newborns was confirmed by PCR with male-specific Sry primers (TGGGACTGGTGACAATTGTC and GAGTACAGGTGTGCAGCTCT) as previously described(15). Expression of liver autoantigens was studied using specific primers for murine FTCD and CYP2D9 (TGCTGCCTGTTTGGAGGCAA, AAGCAAGGCTTGGGCCACTT and GAGCAGAGGCGATTCTCTGT, CCCAGGTGGTCCTATTCTCA respectively). PCR was performed using the OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, CA) and murine  $\beta$ -actin expression level was used as internal reference.

#### **Statistical analysis**

Differences between groups were tested using the Kruskal-Wallis test with Dunn's post test. Correlation coefficients were computed using Pearson's test. In all graphs, error bars represent standard deviations (SD). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, CA).

## RESULTS

### Sex and age influence on susceptibility to experimental AIH

To assess the influence of sex and age on the development of an experimental autoimmune hepatitis, 4, 7 and 14 week-old C57BL/6 female mice and 7 week-old male mice were xenoinmunized with pRc/CMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD and pVR-IL12(9). Female C57BL/6 mice immunized at 7 weeks of age were the only group that showed elevated serum levels of ALT, a marker of hepatocyte lysis, from month 6 post-immunization ( $p < 0.05$ ) (Figure 1a). Liver histological analysis showed very mild inflammation in male and 14 week-old mice compared with 7 week-old females ( $p < 0.01$ ). Younger (4 week-old) female mice showed an intermediate grade of liver inflammation (Figure 1b). Liver-infiltrating T cells and splenocytes isolated from males and 4 or 14 week-old females showed low specific cytotoxicity against type 2 AIH antigens compared to 7 week-old female mice (Figure 1c). Seven week-old female C57BL/6 mice were susceptible while 4 and 14 week-old females were less prone to the development of an experimental AIH. Seven week-old female mice were also more vulnerable than male at the same age. In this animal model, as was observed in humans, female sex and age are susceptibility factors for the onset of AIH.

### B cell immune response

Antibodies against the injected xenoantigens were measured in the four groups of mice. Females vaccinated at 7 weeks of age showed the highest titer of antibodies ( $p < 0.05$ ) (Figure 2a). Titers reached their maximal level in the first month and remained elevated until the 8<sup>th</sup> month post-vaccination. When autoantibodies against murine formiminotransferase-cyclodeaminase (FTCD) and CYP2D9 (the murine homolog of human CYP2D6) were measured, female mice vaccinated at 7 weeks of age showed significantly higher levels of anti-mFTCD autoantibodies than mice from other groups (Figure 2c). No statistically significant differences in reactivity against CYP2D9 were found between sera from all four groups (Figure 2b). However, autoantibodies level increased over time, a feature evident in 7 week-old female mice sera reactivity against mFTCD.

Interestingly, levels of mFTCD autoantibodies correlated with the histological activity index in mice from all 4 groups suggesting a possible role for B cell response against mFTCD in development of the disease (Figure 2d). To characterize this B cell response, reactivity against xenoantigens (CYP2D6 and FTCD) and mFTCD were compared by western blot to detect high affinity antibodies targeting linear epitopes. Early on, reactivity against injected antigens was found in all mice (human CYP2D6-FTCD) (Figure 2e). However, a shift of B-cell reactivity (human FTCD) to autoreactivity (murine FTCD) occurred in female mice (Figure 2e). This type of B cell shift to autoreactivity was not observed in male mice.

#### **Autoantigen expression level in the target organ**

The expression level in the liver of the targeted antigens, mFTCD and CYP2D9 could potentially influence the reactivity of specific T cells and development of AIH. Therefore, their expression level was assessed in livers from newborn and 7 week-old C57BL/6 mice. Male and female newborn (data not shown) and 7 week-old C57BL/6 mice showed similar hepatic expression level of both mFTCD and CYP2D9 (Figure 3a). Therefore, the amount of autoantigen in hepatocyte is not related to female's susceptibility to AIH.

#### **Central tolerance**

The thymic expression level of FTCD and CYP2D9 was measured in C57BL/6 newborn mice. No differences were observed between males and females (Figure 3b). FTCD thymic expression level was lower than that of CYP2D9 (Figure 3b), raising the possibility that a less effective negative selection of autoreactive T-cells against FTCD could occur.

To test for other factors influencing the expression of known liver autoantigens in the thymus and their relation with the observed sex difference in AIH susceptibility, B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J transgenic *Aire* knockout mice were studied. *Aire*, which stands for *Autoimmune Regulator*, is a transcription factor responsible for the ectopic expression of peripheral antigens in the thymus to allow deletion of self-reactive T cells. FTCD but not CYP2D9 is, as insulin(16), under control of the *Aire* transcription factor (Figure 3c). The invalidation of one copy of the *Aire* gene in heterozygous mice (+/0) lowers the expression of FTCD in the thymus (Figure 3c). Therefore, heterozygous *Aire* mice offers a model



where the importance of partial failure in T cell negative selection for specific liver autoantigens on AIH development can be studied.

Following xenoinmunization, male and female *Aire* heterozygous mice showed the same sex-bias as observed in C57BL/6 mice (Figure 3d and 1b). Therefore, the invalidation of one copy of the *Aire* gene in heterozygous mice (+/0) did not modulate the grade of liver inflammation compared to wild-type mice (+/+) (Figure 3d).

### **Peripheral tolerance**

Peripheral tolerance by regulatory T cells could influence the development of an autoimmune hepatitis in mice. Xenoinmunized 7 week-old C57BL/6 male mice show a statistically significant higher percentage of Tregs in the spleen, blood and liver than vaccinated females of the same age (Figure 4a). The same difference is observed in vaccinated heterozygous *Aire* mice. Male mice show higher levels of regulatory T cells in the spleen, blood and liver when compared with females (Figure 4b). Significantly higher levels of regulatory T cells are found in liver infiltrates of male mice compared to female where regulatory T cells were virtually absent (Figure 4b).

### **Sex-related factors impact on immune tolerance**

Testes are an immunological privileged site and as such, provide an environment able to suppress and control immune responses. In C57BL/6 mice, ectopic expression of FTCD and CYP2D9 was found in testes (Figure 5a) and their expression was independent of the *Aire* transcription factor in this organ (Figure 5b). This finding suggests that testes could influence susceptibility to AIH through peripheral conversion of autoreactive naïve T cells to FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. Sexual hormones can also directly modulate immune responses locally and systemically and in doing so, alter the development of an autoimmune disease.

Therefore, to assess the role of testes and sexual hormones on AIH susceptibility, we xenoinmunized castrated male C57BL/6 mice, supplemented or not with physiological levels of 17 $\beta$ -estradiol. After an 8-month follow-up, castrated male C57BL/6, supplemented or not with 17 $\beta$ -estradiol, showed a similar grade of liver inflammation following xenoinmunization than vaccinated male C57BL/6 mice (Figure 6a). Castrated

males liver inflammation was also significantly lower than that of vaccinated females showing that the absence of testes and loss of testosterone secretion have little impact on males' resistance to the development of an AIH. In addition, the administration of physiological levels of  $17\beta$ -estradiol over a 9-month period did not increase male susceptibility to AIH.

Regulatory T cells populations were assessed in the spleen and liver of castrated males supplemented, or not, with  $17\beta$ -estradiol and no statistically significant differences were found with non-castrated males (Figure 6b). However, castrated males, with or without  $17\beta$ -estradiol, developed significantly higher numbers of Tregs in both the spleen and liver following xenoimmunization compared with females (Figure 6b). These results indicate that the Tregs population and susceptibility to AIH is not influenced by testes, testosterone or  $17\beta$ -estradiol levels.

## DISCUSSION

The gender bias present in AIH has been known since the initial description of the disease by Waldenström and Kunkel when AIH patients were referred to as “Kunkel-Waldenström girls”(17). Since then, little progress has been made in understanding the fundamental basis of female susceptibility to AIH. Herein, we report that an experimental model of AIH exhibits a similar gender bias as described in humans and is influenced by age at the time of encounter with the triggering agent.

Development of Liver/Kidney Microsomal type 1 and Liver Cytosol type 1 autoantibodies (LKM1 and LC1 autoantibodies) is a hallmark of type 2 AIH (18). As in previous studies(9, 11), xenoimmunized 7 week-old female mice develop high titers of LKM1 and LC1 antibodies, switching to autoantibodies directed against mouse liver autoantigens. In mice of all groups, anti-mFTCD (Anti-LC1) reactivity correlated with the grade of liver inflammation found after xenoimmunization. This suggests that in mouse that develop an AIH, a loss of B cell immunological tolerance against mFTCD occurs in the first months after immunization and through exposure to self-antigen, this B cell autoimmune response is perpetuated. Interestingly, anti-LC1 autoantibody titers were found to parallel disease activity in type 2 AIH patients (19). These observations suggest that a loss of B cell tolerance against hepatic autoantigens could be an initial and fundamental step in the development of late-onset liver autoimmunity.

In this model, a break of T cell immunological tolerance also occurs following xenoimmunization, since CD8<sup>+</sup> T cell cytotoxicity leading to hepatocyte lysis and subsequent liver inflammation are observed. T cell immunological tolerance results from the thymus negative selection and is directly influenced by the thymic expression level of autoantigens(16). A reduction in insulin thymic expression level has been shown to result in a proportional increase in the number of insulin-specific autoreactive T cells(20-22). Therefore, the thymus expression levels of the targeted autoantigens, CYP2D9 and FTCD, were used as surrogate markers of its ability to negatively select T-cells specific to these antigens. While no differences in expression levels were found between wild type males and females, FTCD was found to be expressed at very low levels in the thymus compared

to CYP2D9, suggesting a reduced ability in C57BL/6 mice to negatively select FTCD-specific autoreactive T cells.

Since-FTCD thymic expression is under Aire control, the invalidation of one copy of the *Aire* gene in heterozygous B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice induces a thymus-specific reduction of FTCD expression in mice with an otherwise normal phenotype. Xenoinmunization of these B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice induced an AIH with a similar grade of liver inflammation as C57BL/6 mice and exhibited the same gender bias. Therefore, despite lowered expression of FTCD in the thymus, male mice are still resistant to AIH and female mice develop an AIH of similar intensity. This observation and the similar thymic expression level of mFTCD and CYP2D9 in both sex suggests that central tolerance is likely not the main factor responsible for the observed gender bias in AIH.

Peripheral tolerance to AIH autoantigens could be involved in susceptibility or resistance to AIH. The main mechanisms of peripheral tolerance are 1) the induction of functional unresponsiveness (anergy) or deletion of autoreactive T cells and 2) suppression by regulatory T cells. Since we have no means to directly measure the frequency of circulating AIH-specific CD8<sup>+</sup> T cells, peripheral deletion and/or induction of anergy cannot be excluded as a possible factor in AIH susceptibility. However, male and female C57BL/6 mice express similar levels of AIH autoantigens implying similar exposure to autoantigens in both sexes. Therefore, C57BL/6 male resistance to AIH is probably not the result of extensive peripheral deletion and/or induction of anergy of AIH-specific autoreactive T cells.

Regulatory T cells are key elements in the control of autoimmunity stemming from molecular mimicry(23) since Tregs have the ability to be activated at 10- to 100-fold lower antigen concentration compared with naïve T cells and in presence of low levels of CD80/86 and self-peptide/MHC on APCs(24). Furthermore, once activated by specific antigens, Tregs can exert a suppressive action on T cells irrespective of their antigen specificity(24). C57BL/6 male mice showed significantly higher numbers of regulatory T cells in the spleen, PBMC and liver in response to the xenoinmunization compared with females. In vaccinated female mice, Tregs were virtually absent from liver infiltrates. This

parallels the observation by Longhi *et al.* that patients with AIH have decreased numbers of circulating regulatory T cells(25). In B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice, males also show higher levels of regulatory T cells than females in the spleen, PBMC and liver following vaccination. Interestingly, the percentage of Tregs in PBMC and liver were higher in male B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice than in male C57BL/6 mice. This higher number of regulatory T cells in B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice could be an adaptive response to the presence of higher numbers of autoreactive T cells in these mice, which would explain the development of an AIH of similar intensity in heterozygous *Aire* knockout mice and C57BL/6 mice despite the reduced negative selection against mFTCD. This type of autoreactive T cells suppression in B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice by Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells has been previously observed(26).

From these data, we believe that the presence of Tregs in males could have limited the development of a autoreactive B cell response and inhibited the proliferation and cytotoxicity of autoreactive T cell, hence preventing the development of AIH. The lowered requirement of Tregs for co-activating molecules(24) and the fact that hepatocyte can serve as APCs, with reduced expression of co-stimulatory molecules(27) during an inflammatory response(28) raises the possibility that Tregs could have been activated locally in the liver preferentially over naïve autoreactive T cells. Therefore, the ability to induce the proliferation of regulatory T cells following exposure to a triggering agent (xenoimmunization in this model) could be critical in preventing the development of an AIH.

The role of FoxP3 in the development of regulatory T cells and its location on the X chromosome suggests that differential regulation of this gene expression could influence the development of autoimmune diseases. However, there are no evidence that the *FoxP3* gene shows a variable pattern of methylation as found in other X-linked genes(29). In addition, heterozygous female carriers of *FoxP3* mutations, which in male leads to the *Immune dysregulation, Polyendocrinopathy and Enteropathy with X-linked inheritance* (IPEX) syndrome, are healthy despite expression of the mutated allele in half of circulating CD4<sup>+</sup> T cells(30). In our model, no differences in the level of FoxP3 expression in

regulatory T cells were found between male and female C57BL/6 mice (data not shown). Other factors could explain the higher proportion of regulatory T cells found in males following xenoinmunization, such as the hormonal environment and the presence of male-specific sexual organs. Testes are an immunologically privileged site and as such, immune responses to antigens are reduced at this site. In experimental models of autoimmune diseases, intratesticular antigen injections can induce systemic tolerance and prevent development of the disease(31-33). Testes are also capable of promiscuous expression of autoantigens(34) and their repertoire of ectopic autoantigens expression is different from that of the thymus(34). In C57BL/6 mice, we found ectopic expression of FTCD and CYP2D9 in testes and their expression was independent of the *Aire* transcription factor. Herein, castrated males developed the same level of liver inflammation as male C57BL/6, significantly less than females. Castration of C57BL/6 mice did not modify the level of regulatory T cells found in the spleen and liver following vaccination, indicating that induction of regulatory T cells in C57BL/6 males by xenoinmunization is not influenced by ectopic expression of hepatic autoantigen in testes.

Sexual hormones are known to directly modulate immune responses and in doing so, alter the development of autoimmune diseases(35). Xenoinmunization of castrated C57BL/6 males and castrated males supplemented with 17 $\beta$ -estradiol resulted in a grade of liver inflammation similar to that observed in non-castrated male C57BL/6 mice. Therefore, the absence of testosterone or the presence of 17 $\beta$ -estradiol in males did not modify the development of AIH. The production of regulatory T cells was also unaffected by the absence of testosterone or presence of 17 $\beta$ -estradiol: castrated males showed significantly more Tregs than females following xenoinmunization. Therefore, in this experimental model of AIH, 17 $\beta$ -estradiol and testosterone levels are not the main factors responsible for the observed gender bias in disease susceptibility.

Recently, using *Sry*(-)Y and *Sry*(+)X transgenic mice, Smith-Bouvier *et al.* have shown that the XX sex chromosome complement conferred susceptibility to both experimental autoimmune encephalomyelitis and lupus, irrespective of the type of gonads present(36). This observation and our data, while not excluding that sexual hormones could have some

influence on the gender bias observed in autoimmune diseases, suggests that other factors related to the X chromosome could be involved in women's susceptibility to autoimmune diseases.

In summary, susceptibility to experimental AIH is not influenced by testosterone or estradiol levels nor is the result of reduced central tolerance. Peripheral tolerance and development of regulatory T cells following self-mimicking antigen exposure are the main factor resulting in susceptibility to AIH. This suggests that the immune response raised to an initiating antigenic event could be the deciding factor for the development of an AIH.

**REFERENCES**

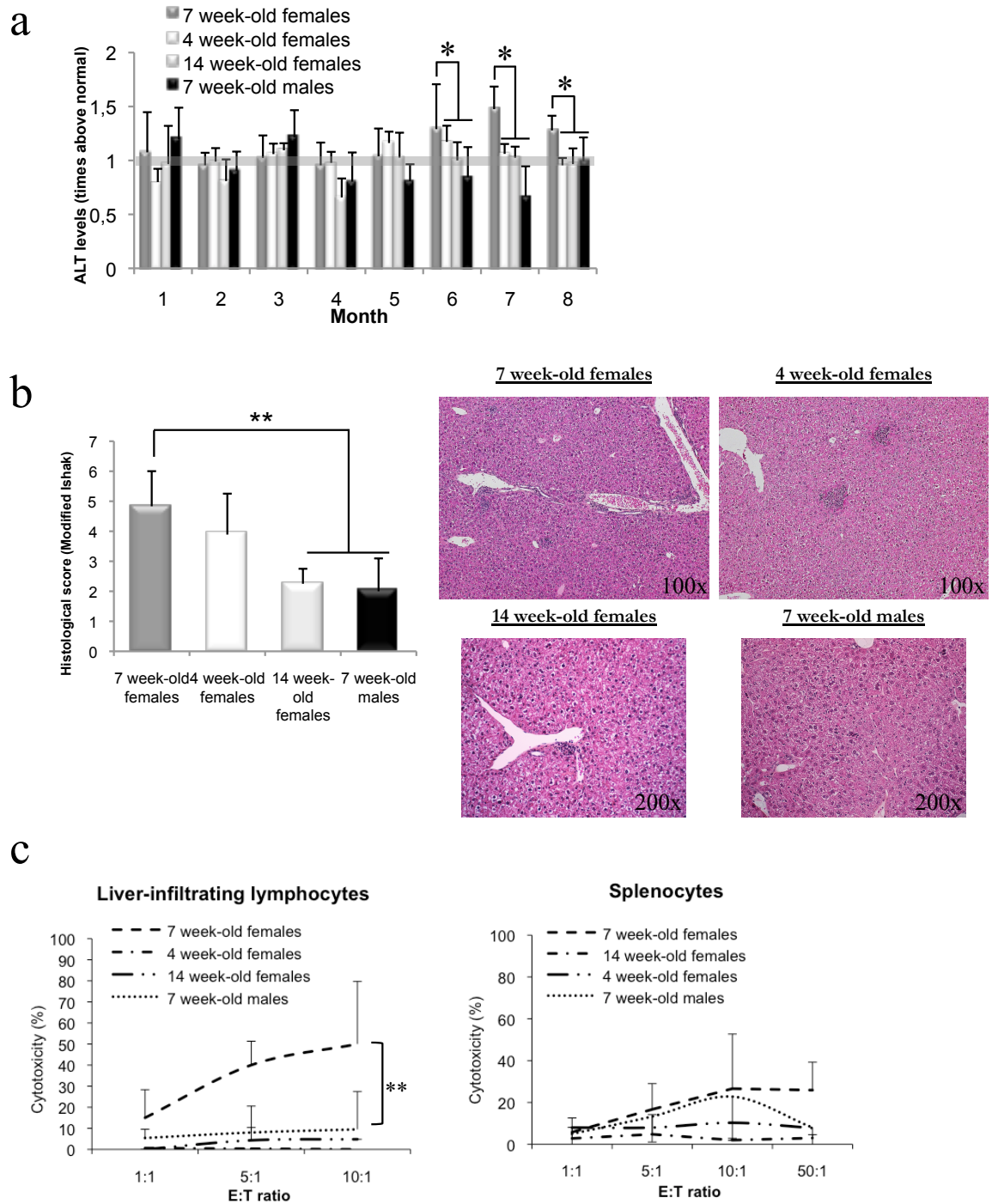
1. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997;84:223-243.
2. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2:777-780.
3. Alvarez F. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis* 2006;10:89-107, vi.
4. Michaels RM, Rogers KD. A sex difference in immunologic responsiveness. *Pediatrics* 1971;47:120-123.
5. Amadori A, Zamarchi R, De Silvestro G, Forza G, Cavatton G, Danieli GA, Clementi M, et al. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med* 1995;1:1279-1283.
6. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:376-381.
7. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, Mowat AP, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25:541-547.
8. Keating JJ, O'Brien CJ, Stellon AJ, Portmann BC, Johnson RD, Johnson PJ, Williams R. Influence of aetiology, clinical and histological features on survival in chronic active hepatitis: an analysis of 204 patients. *Q J Med* 1987;62:59-66.
9. Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004;39:1066-1074.
10. Lapierre P, Beland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007;149:107-113.



11. Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: The influence of genetic background in disease development. *J Autoimmun* 2006;26:82-89.
12. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002;298:1395-1401.
13. Zheng H, Xu H, Uljon SN, Gross R, Hardy K, Gaynor J, Lafrancois J, et al. Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *J Neurochem* 2002;80:191-196.
14. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* 2002;262:103-110.
15. McClive PJ, Sinclair AH. Rapid DNA extraction and PCR-sexing of mouse embryos. *Mol Reprod Dev* 2001;60:225-226.
16. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, et al. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med* 2004;200:1015-1026.
17. Reuben A. A sheep in wolf's clothing. *Hepatology* 2003;38:1596-1601.
18. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169-176.
19. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726.
20. Vafiadis P, Bennett ST, Todd JA, Nadeau J, Grabs R, Goodyer CG, Wickramasinghe S, et al. Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* 1997;15:289-292.

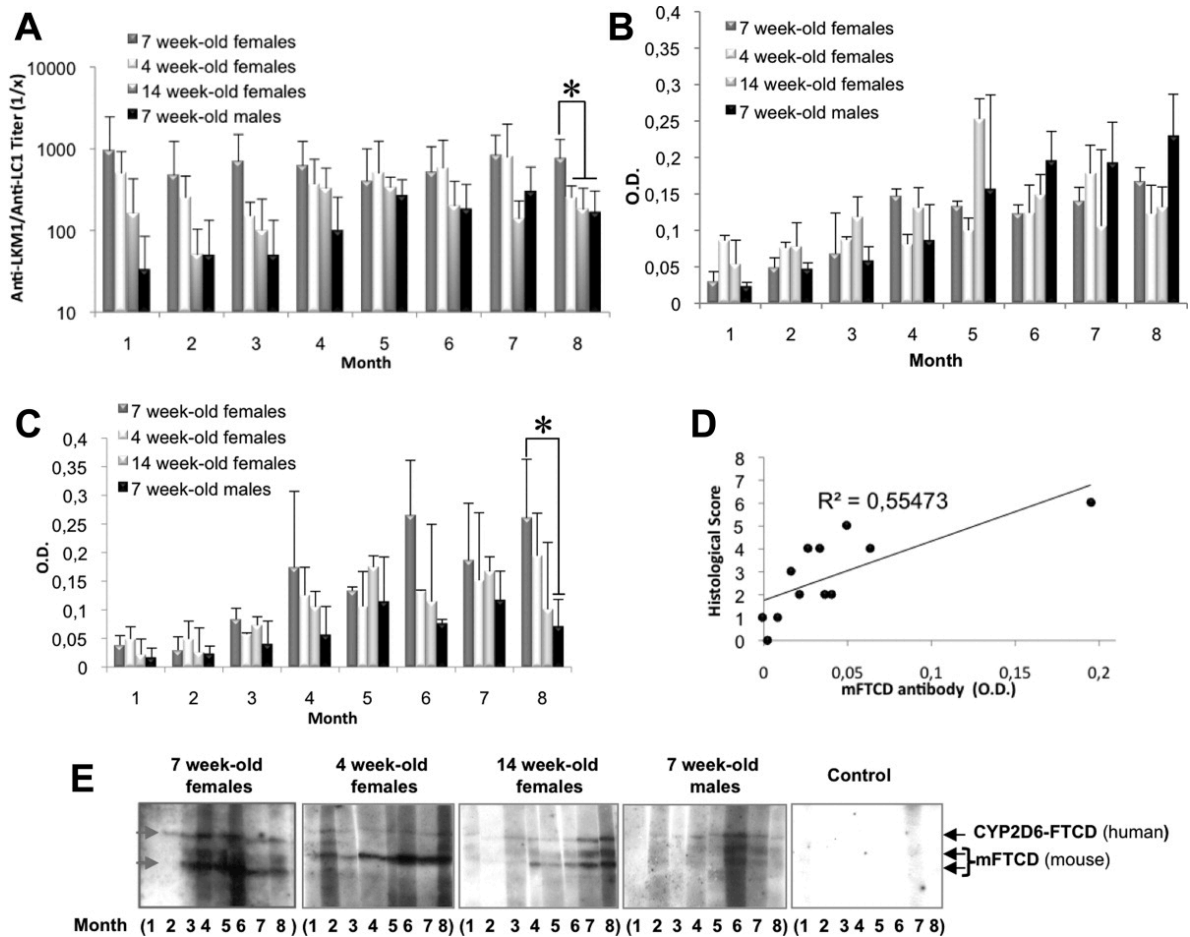
21. Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* 2002;51:1383-1390.
22. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Jr., Zalcborg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, et al. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDM2 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet* 1997;15:293-297.
23. Stephens LA, Gray D, Anderton SM. CD4+CD25+ regulatory T cells limit the risk of autoimmune disease arising from T cell receptor crossreactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:17418-17423.
24. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-1980.
25. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006;176:4484-4491.
26. Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:14735-14740.
27. Gao D, Li J, Orosz CG, Bumgardner GL. Different costimulation signals used by CD4(+) and CD8(+) cells that independently initiate rejection of allogenic hepatocytes in mice. *Hepatology* 2000;32:1018-1028.
28. Franco A, Barnaba V, Natali P, Balsano C, Musca A, Balsano F. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology* 1988;8:449-454.
29. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005;434:400-404.

30. Tommasini A, Ferrari S, Moratto D, Badolato R, Boniotto M, Pirulli D, Notarangelo LD, et al. X-chromosome inactivation analysis in a female carrier of FOXP3 mutation. *Clin Exp Immunol* 2002;130:127-130.
31. Peng B, Yoshitoshi T, Shichi H. Suppression of experimental autoimmune uveoretinitis by intraorchidic administration of S-antigen. *Autoimmunity* 1992;14:149-153.
32. Ren J, Singh AK, Gregerson DS, Shichi H. Induction of immunotolerance in rats by intratesticular administration of an eicosapeptide of bovine S-antigen. *Autoimmunity* 1996;25:19-31.
33. Verajankorva E, Setala N, Teros T, Salmi AA, Pollanen P. Testicular-associated immune deviation: flushing of the testicular lymph sinusoids induces immunosuppression and inhibits formation of EAE in SJL mice. *Scand J Immunol* 2002;55:478-483.
34. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2001;2:1032-1039.
35. Jansson L, Holmdahl R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res* 1998;47:290-301.
36. Smith-Bouvier DL, Divekar AA, Sasidhar M, Du S, Tiwari-Woodruff SK, King JK, Arnold AP, et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J Exp Med* 2008;205:1099-1108.

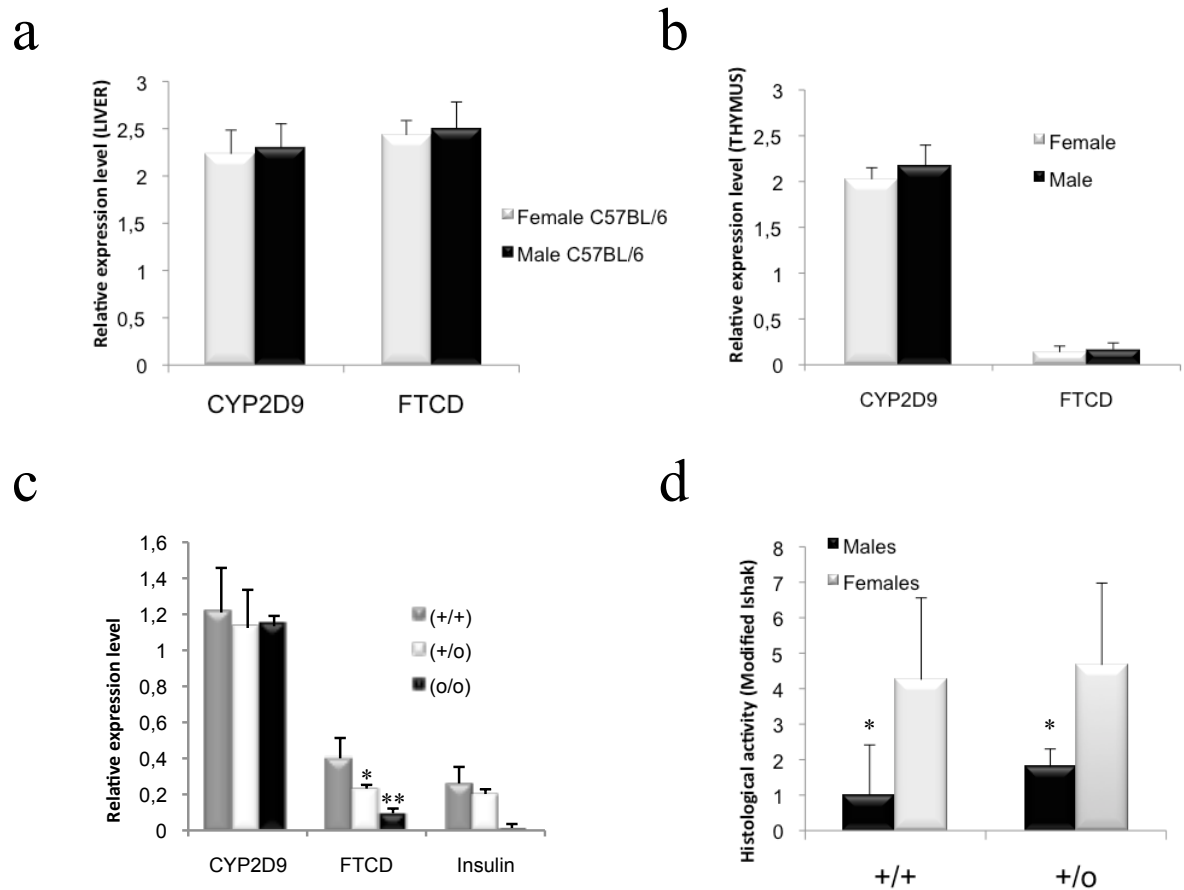


**FIGURE 1. C57BL/6 female mice xenoimmunized at 7 weeks of age develop the most severe autoimmune hepatitis. a)** From month 6 post-vaccination, C57BL/6 female mice

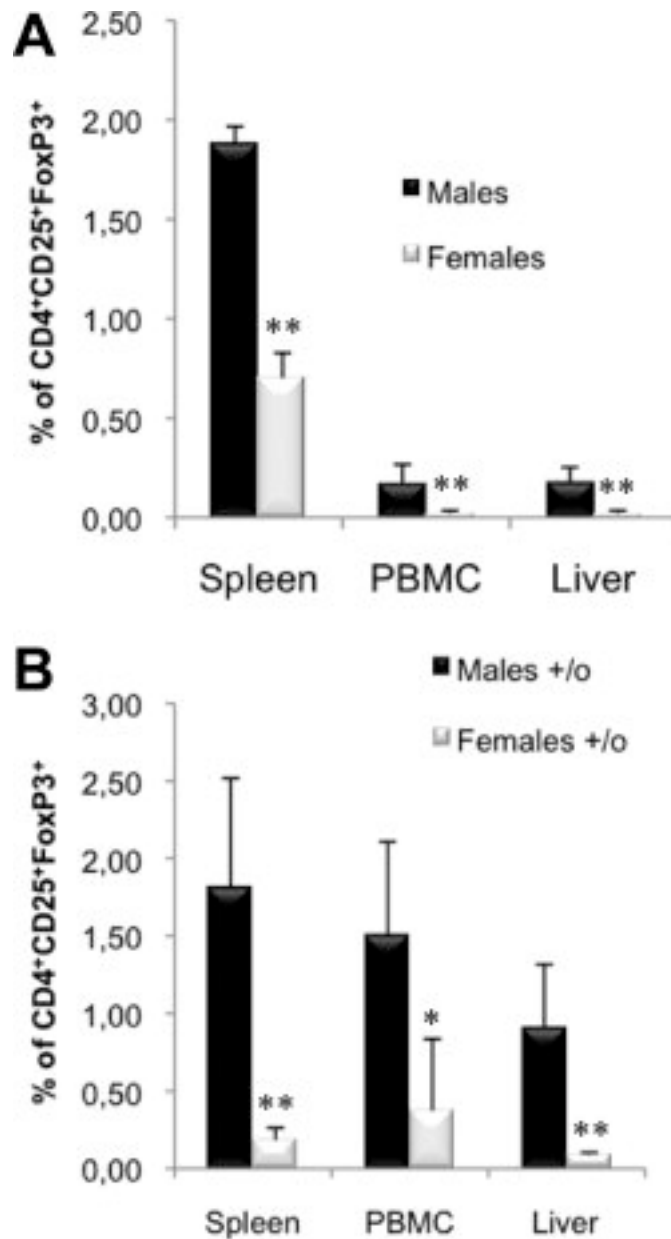
vaccinated at 7 weeks of age show significantly higher ALT levels compared to males or females vaccinated at 4 or 14 weeks of age (n=8 for each group, histogram represent the average of two separate experiment) (\*:  $p < 0.05$ ). **b)** At autopsy, female mice vaccinated at 7 weeks of age have increased liver inflammation compared to males or female mice vaccinated at 14 weeks of age (\*\*:  $p < 0.01$ , liver inflammation grading is based on the modified Ishak histological activity index). **c)** Lymphocytes isolated from female mice vaccinated at 7 weeks of age have higher specific cytotoxicity against hepatic autoantigens (FTCD and CYP2D6) than mice of other sex or age (Effector/target ratios (E:T)).



**FIGURE 2. Autoreactive B cell response.** a) A statistically significant difference of specific type 2 autoimmune hepatitis antibodies (Anti-LKM1/Anti-LC1) titer was observed between male and female mice when human antigens were used (\*:  $p < 0.05$ ). b) When mouse autoantigen were used, anti-CYP2D9 autoantibody titer was similar in all groups, but c) anti-mFTCD (mouse) autoantibody titer were higher in female mice vaccinated at 7 weeks of age and d) this B cell response against murine FTCD on month 8 correlates with liver inflammation levels in mice from each group. e) Mice that will develop an AIH show a conversion from reactivity against the vaccinated human proteins (CYP2D6-FTCD) to an autoreactivity against the FTCD murine autoantigen.

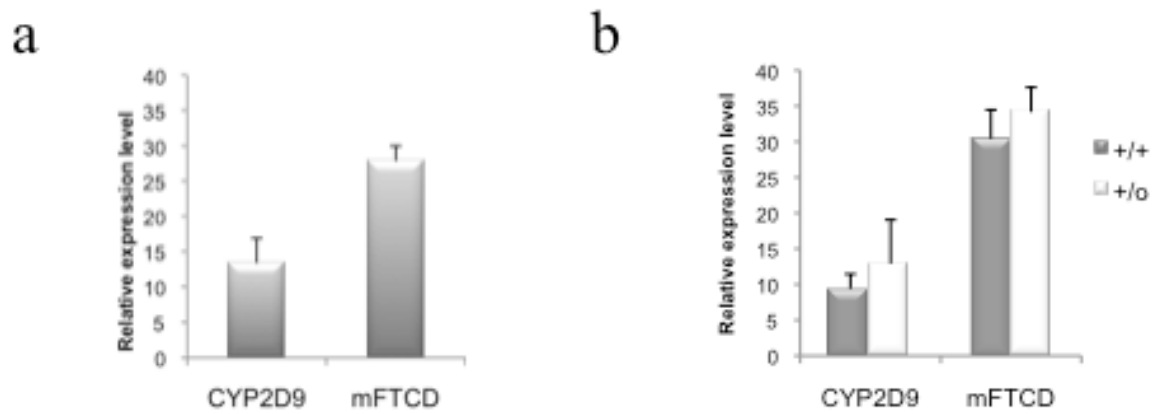


**FIGURE 3. Hepatic expression level of FTCD and CYP2D9 and central tolerance against these autoantigens are not responsible for female C57BL/6 mice susceptibility to AIH. a)** Male and female C57BL/6 mice have similar hepatic expression levels of CYP2D9 and mFTCD. **b)** Male and female C57BL/6 mice have similar thymic expression levels of CYP2D9 and mFTCD. However, C57BL/6 mice show low-level thymic expression of FTCD compared to CYP2D9 expression levels. **c)** Heterozygous and homozygous B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi/J</sup> mice (+/o and o/o) have reduced FTCD thymic expression. (n=8 per group) **d)** Heterozygous B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi/J</sup> male and female mice (+/o) show the same gender bias in AIH development as C57BL/6 mice following xenoinmunization. The grade of liver inflammation is comparable to that of xenoinmunized wild-type mice (+/+) (n=8 per group; \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ).



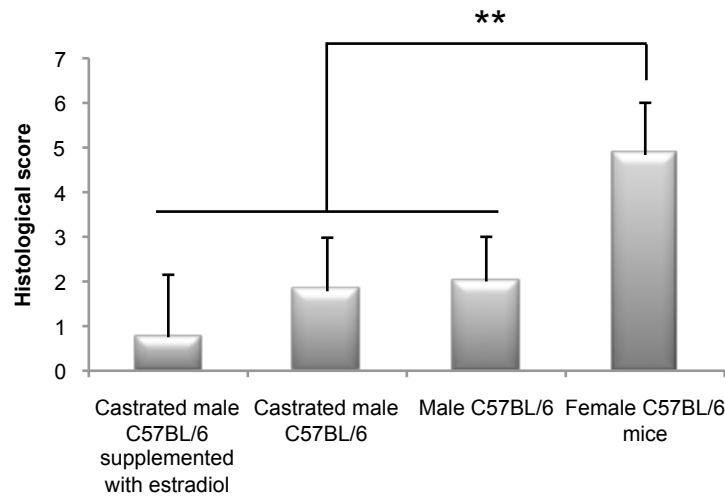
**FIGURE 4. Female C57BL/6 and B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice have less CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells following xenoinmunization. a) Male C57BL/6 mice (n=8) have a higher proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in the spleen, PBMC and liver compared with females (n=8) following xenoinmunization. b) Heterozygous B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J male mice (n=8) also show a higher proportion of regulatory T cells following xenoinmunization compared with females (n=8) (\*\*:  $p < 0.01$ ).**



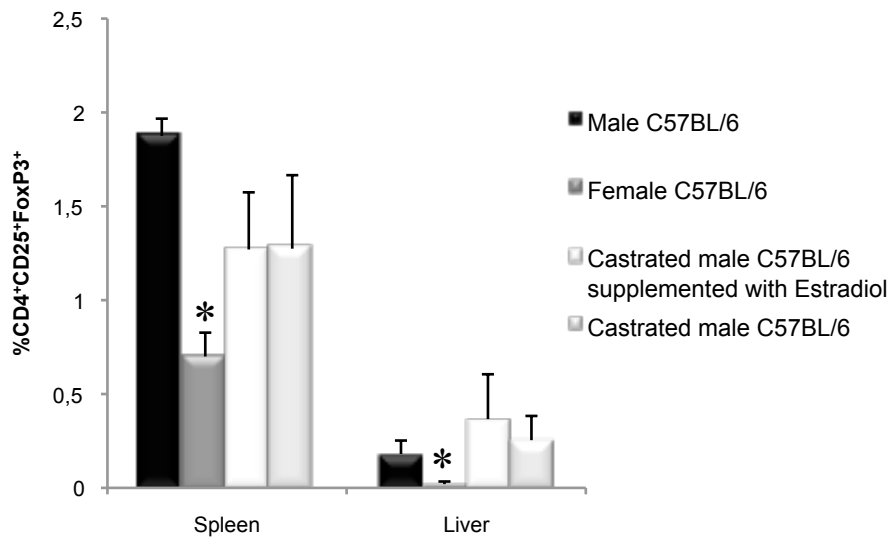


**FIGURE 5. C57BL/6 and B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J testes show ectopic expression of CYP2D9 and FTCD. a) C57BL/6 male mice express FTCD and CYP2D9 ectopically in their testes. b) Wild-type and heterozygous B6.129S2-*Aire*<sup>tm1.1Doi</sup>/J mice express FTCD and CYP2D9 at similar level.**

a



b



**FIGURE 6. The absence of testosterone, testes and  $17\beta$ -estradiol supplementation does not increase male C57BL/6 mice susceptibility to AIH.** a) Castrated male C57BL/6 mice (n=8) and castrated male C57BL/6 mice supplemented with  $17\beta$ -estradiol (n=6) develop similar liver inflammations as C57BL/6 male mice (n=8) following xenoinmunization. Their liver inflammation is significantly lower than that of

xenoinmunized C57BL/6 female mice (\*\*:  $p < 0.01$ ). **b)** Castrated C57BL/6 male and castrated male mice supplemented with  $17\beta$ -estradiol develop higher levels of regulatory T cells compared to C57BL/6 females mice following xenoinmunization in both the liver and spleen.

## Discussion générale

Les maladies autoimmunes telle l'HAI sont généralement des maladies complexes résultant des influences du patrimoine génétique de l'individu, de l'âge et du sexe et des facteurs environnementaux. Ces éléments contribuent à créer un milieu propice au développement d'une autoimmunité et la connaissance précise de ceux-ci permettra non seulement une meilleure compréhension de la pathogenèse de la maladie, mais également une intervention mieux ciblée pour le traitement des patients. Une des pathologies autoimmunes les plus étudiées est le diabète de type 1 (T1D pour *type 1 diabetes*). L'étude de la pathogenèse de cette maladie auto-immune a permis de découvrir plusieurs mécanismes fondamentaux régissant la tolérance, tant centrale que périphérique, l'homéostasie et la régulation du système immunitaire ainsi que le développement de nouvelles immunothérapies prometteuses (126). Une grande partie de la recherche effectuée sur cette pathologie a été réalisée à l'aide de modèles expérimentaux. L'un de ces modèles, la souris NOD (*non-obese diabetic*), fut découvert par Makino *et al.* (127) au laboratoire de recherche Shionogi à Aburahi, au Japon, en 1980. Elle fut découverte par hasard lors de croisements voués à l'isolation de souris susceptibles au développement de cataractes (128). Ces souris développent spontanément une insulite et éventuellement, un diabète insulino-dépendant. Ce modèle non transgénique montre une influence de l'âge et du sexe : 60 à 80% des femelles et 20 à 30% des mâles développent la maladie et ce, à partir d'un âge allant de 10 à 20 semaines (128).

L'environnement influence aussi le développement de la maladie chez les souris NOD. En effet, lorsque les souris sont maintenues dans un environnement sans pathogènes, l'incidence de la maladie augmente de façon variable selon l'environnement des différentes animaleries (129). Plusieurs loci de susceptibilité génétique présents chez la souris NOD ont été découverts via le développement de souris NOD congéniques, montrant l'influence du patrimoine génétique de cet animal sur le développement de la maladie. La complexité des différents facteurs présents chez la souris NOD permettant le développement de la

pathologie autoimmune réplique une partie des influences présentes chez les patients atteints de diabète de type 1, faisant de ce modèle un atout pour la recherche sur cette maladie.

Un autre modèle expérimental du diabète de type 1 est la souris transgénique RIP-GP, qui exprime la glycoprotéine de LCMV sous le contrôle du promoteur de l'insuline (130). Suite à une infection par le LCMV, il y a une perte de tolérance envers la GP et le développement d'une insulite et d'un diabète autoimmun (130). Ce modèle a permis de mieux comprendre certains mécanismes responsables d'une perte de tolérance immunitaire envers les cellules  $\beta$  du pancréas et d'acquérir de meilleures connaissances sur les cellules pouvant être responsables de sa destruction, mais n'a pas permis de déterminer des facteurs de susceptibilité ou un mécanisme pathogénique pouvant être facilement transposé aux patients atteints de diabète de type 1.

Notre connaissance de la pathogenèse de l'HAI est limitée et les études sur les patients atteints étant plutôt de nature descriptive, elles nous ont conduits à l'étude des conséquences biologiques de cette maladie plutôt qu'à son étiologie. Les modèles animaux d'HAI précédemment décrits nous ont aidé à mieux comprendre certains des processus sous-jacents qui pourraient donner lieu à une maladie autoimmune du foie (108, 111, 114, 115), mais se prêtent peu à l'étude des interactions complexes entre le bagage génétique de l'hôte, l'environnement, l'âge et le sexe qui amènent une susceptibilité à l'HAI telle que présente chez l'homme (131).

C'est dans cette optique que nous avons voulu développer un modèle d'HAI basé sur une souris de type sauvage. À travers son développement et son étude, nous avons pu constater que, quoique non spontané, ce modèle d'HAI de type 2 est le résultat d'interactions complexes telles que celles pouvant être présentes chez les patients atteints d'HAI (132-134). Le développement de notre modèle expérimental d'HAI de type 2 reposait sur l'hypothèse qu'un mimétisme moléculaire entre des antigènes étrangers (CYP2D6 et FTCD humains) et des antigènes du soi (CYP2D9 et FTCD murins), pouvait

donner lieu au déclenchement d'un processus autoimmunitaire et au développement d'une HAI étant donné la localisation de ces autoantigènes chez la souris.

L'ensemble de nos travaux sur la pathogénèse de l'HAI réalisés à l'aide de notre modèle expérimental d'HAI de type 2, nous permettent de conclure qu'une atteinte hépatique préalable n'est pas nécessaire au développement d'une HAI, qu'un mimétisme moléculaire entre une protéine étrangère et un autoantigène peut déclencher une maladie autoimmunitaire du foie; que la réponse B autoimmunitaire peut influencer la réponse T contre les autoantigènes hépatiques, que la tolérance centrale joue un rôle dans la susceptibilité au développement d'une autoimmunité hépatique et que l'influence du sexe sur la susceptibilité à l'HAI résulterait d'une modification de la tolérance périphérique.

**Une rupture de tolérance immunitaire envers des autoantigènes hépatiques est suffisante pour induire une HAI et ce, sans atteinte hépatique préalable**

Dans notre modèle expérimental, le développement d'une HAI de type 2 suite à la xénoimmunisation a lieu en absence d'atteinte hépatique préalable. L'HAI se développe donc uniquement suite à un bris de tolérance périphérique envers des autoantigènes hépatiques. Cette observation est en contradiction avec l'hypothèse voulant que le «statut inflammatoire» de l'organe cible, en raison de dommages antérieurs, soit un facteur décisif dans le développement d'une atteinte autoimmunitaire (135).

En utilisant un modèle de souris transgéniques exprimant un antigène spécifique (H-2K<sup>b</sup>) au foie et dans les ganglions lymphatiques, l'équipe de Bertolino *et al.* est également arrivée à la conclusion qu'un bris de tolérance périphérique suffisait à entraîner le développement d'une HAI (136). Des cellules T CD8<sup>+</sup> naïves, spécifiques pour le H-2K<sup>b</sup> et activées dans les ganglions de ces souris, ont mené au développement d'une HAI tandis que l'activation de ces mêmes cellules au foie n'a pas provoqué d'HAI. Chez les cellules activées au foie, une fonction cytotoxique réduite et une demi-vie plus courte ont été observées (136).

Il y a donc eu dans ce modèle, comme dans le nôtre, développement d'une HAI suite à un bris de tolérance périphérique, et ce en absence d'une atteinte hépatique préalable. On y voit aussi que des cellules T CD8+ cytotoxiques activées dans les ganglions ont pu intervenir dans le développement d'une HAI. Par contre, l'activation des cellules T cytotoxiques par le foie est inefficace et entraîne éventuellement leur élimination. Cette mort des cellules CD8+ activées au foie en serait une par « négligence » dû à l'absence de facteurs de survie (137). En effet, la mort de ces cellules peut être prévenue par l'ajout d'IL-2 exogène et d'anticorps anti-CD28 (signaux de co-stimulation) (137).

Récemment, le groupe du Dr Rolf Zinkernagel a décrit qu'une stimulation du système immunitaire inné pourrait être nécessaire au développement d'une HAI (138). Leur modèle est basé sur le transfert de cellules T CD8+ spécifiques à la glycoprotéine du LCMV (GP) à des souris Alb-1, exprimant la GP du LCMV spécifiquement au foie (138). Ils ont observé que ni le transfert de cellules CD8+ naïves spécifiques à l'épitope 33-41 (gp33) de la glycoprotéine de LCMV et issues de souris TCR-Tg 318, ni l'injection de peptide gp33 n'entraîne de forte hausse des ALT chez les souris Alb-1 (138). Cependant, si la voie du TLR-3, un récepteur de la famille des récepteurs de type Toll, est stimulée par une co-injection de poly (I:C) lors du transfert, une forte hausse des ALT est alors observée. Le poly (I:C) est un analogue synthétique du ligand naturel du TLR-3, l'ARN double brin qui est une molécule d'origine virale. Cette stimulation entraînerait la sécrétion d'IFN- $\alpha/\beta$  et de TNF- $\alpha$  par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles, amenant l'expression de CXCL9 par les hépatocytes, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales. L'expression de CXCL9 entraînerait le recrutement au foie des cellules CD8+ CXCR3+ activées et, selon les auteurs, serait responsable de la forte hausse des ALT et du développement d'une HAI transitoire (138).

Cependant les auteurs n'ont pas étudié la possibilité que l'activation des CPA par le poly (I:C) pourrait aussi avoir pour conséquence de rendre les CPA présentes au foie capables d'activer efficacement les cellules CD8+ naïves transférées, la stimulation du TLR-3 sur les CPA entraînant l'augmentation de l'expression des molécules co-

stimulatrices CD80 et CD86 (139). Cette activation efficace, associée à un potentiel cytotoxique augmenté et à une meilleure survie (136), pourrait être responsable, en combinaison avec l'augmentation de la chimiokine CXCL9, de l'augmentation rapide des ALT dans le sérum et du développement d'une HAI transitoire chez ces souris.

Une rupture de la tolérance périphérique seule peut entraîner le développement d'une atteinte autoimmune contre le foie mais le profil d'expression de différentes molécules d'adhésion et de chimiokines responsables du recrutement des CTL par le foie pourrait influencer le moment du déclenchement et l'évolution de l'HAI. Dans notre modèle d'HAI de type 2, l'absence de stimulation du TLR-3 pourrait avoir pour conséquence l'expression à de faibles niveaux de CXCL9 par le foie et par conséquent un faible recrutement de cellules CD8<sup>+</sup> autoréactives activées. Ceci pourrait être un des facteurs responsables du délai de plusieurs mois nécessaire à l'obtention d'une inflammation hépatique capable d'influencer les taux d'ALT sériques.

Les motifs CpG présents dans les plasmides d'origine bactériennes, tel le pCMV utilisé pour notre vaccination, ont la capacité d'activer les cellules dendritiques via le TLR-9 et d'augmenter l'expression des molécules co-stimulatrices CD40 et CD86 (140). Il pourrait donc y avoir eu, dans notre modèle, une stimulation du système immunitaire inné qui, en influençant l'activation des cellules T autoréactives et l'expression de certaines chimiokines et molécules d'adhésion, pourrait moduler le développement de l'HAI.

**Il est possible de briser la tolérance immunitaire par un mécanisme de mimétisme moléculaire, et ainsi induire une HAI.**

Le pourcentage élevé de discordance entre les paires de jumeaux monozygotes quant au développement d'une maladie autoimmune montre bien le rôle non négligeable que jouent les facteurs environnementaux dans l'étiologie de ces maladies. Un bris de tolérance périphérique par mimétisme moléculaire implique qu'une réponse immune envers un antigène exogène peut, par similarité avec un autoantigène, briser la tolérance



immunitaire. L'étude de modèles animaux a clairement montré que certaines infections peuvent déclencher des maladies autoimmunes, comme dans le cas du virus de Coxsackie B4 dans le diabète de type I ou du virus de l'encéphalomyocardite dans la myosite autoimmune (141).

Ce mécanisme de mimétisme moléculaire n'a jusqu'à présent que peu de parallèle chez l'homme mais on peut supposer que des virus encore inconnus pourraient être à l'origine d'un certain nombre de maladies chroniques autoimmunes telles l'HAI, le diabète de type 1 ou la sclérose en plaques. Cependant, la longue période pouvant s'écouler entre l'infection initiale et l'apparition de la maladie autoimmune rend très difficile l'identification de virus potentiellement étiologiques.

Notre modèle est l'un des premiers qui utilisent un véritable mécanisme de mimétisme moléculaire plus proche de celui qui pourrait exister chez l'homme. En effet, les modèles précédents de maladie autoimmune (diabète de type I et HAI) utilisaient plutôt un mécanisme d'« identité moléculaire » où l'élément déclencheur (virus ou plasmide) exprimait une protéine identique à celle introduite chez la souris transgénique (120, 130).

Nous proposons la séquence d'événements suivante lors du bris de tolérance immune via un mimétisme moléculaire chez nos souris C57BL/6 : la vaccination entraîne l'expression de la protéine CYP2D6-FTCD (antigènes étrangers), qui sera ensuite captée par les cellules présentatrices d'antigènes et présentée par le CMH de classe II. Des cellules CD4+ spécifiques aux antigènes humains seront activées ainsi que de rares cellules T CD4+ autoréactives dirigées contre un épitope partagé avec une des protéines de l'hôte (CYP2D9 ou FTCD murine). Les CD4+ autoréactifs auraient la capacité d'activer des cellules B autoréactives et d'entraîner la production d'autoanticorps envers le CYP2D9 ou la FTCD murine. Suite à ces activations chez les femelles C57BL/6, la présence de cellules CD4+ et B autoréactives entraînerait l'activation de cellules CD8+ cytotoxiques et le développement d'une HAI.

Chez les souris C57BL/6 mâles (132) et les souris 129S/v (142), qui ne développent qu'une HAI de faible intensité, la présence de cellules T régulatrices spécifiques (C57BL/6 mâles (132) et 129S/v; données non publiées) limiterait la prolifération des cellules T autoréactives et l'activation de cellules B autoréactives (réduisant ainsi la production d'autoanticorps) et préviendrait le développement d'une HAI d'intensité comparable à celle présente chez les femelles C57BL/6 (132, 142).

**La réponse B autoimmune envers les autoantigènes hépatiques contribuerait au développement de la réponse T autoimmune**

La réponse B présente chez les patients avec une HAI a généralement été considérée comme un épiphénomène responsable du développement des autoanticorps. Cependant, plusieurs indices nous font croire que les cellules B pourraient avoir un rôle plus important dans la pathogenèse de l'HAI que celui initialement proposé.

Dans notre modèle expérimental d'HAI de type 2, les niveaux d'autoanticorps dirigé contre la FTCD murine (anti-LC1) corrèlent avec le développement de la maladie, tel qu'observé chez l'homme (60, 132). De plus, chez les souris qui développent une HAI (femelles C57BL/6), la réponse B dirigée contre les antigènes humains (vaccination) se transforme en autoréactivité contre les autoantigènes murins homologues (CYP2D9 et mFTCD)(142). Ce bris de tolérance B, qui n'a lieu que chez les souris qui vont développer une HAI, suggère qu'il pourrait être impliqué dans les étapes subséquentes de la pathogenèse d'une HAI.

Les cellules B peuvent agir comme cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. En effets, les cellules B peuvent présenter, via le CMH de classe II, des antigènes captés via leurs récepteurs B. Ce mécanisme de présentation spécifique pour un antigène est près de 10 000 fois plus efficace que pour des antigènes non ou faiblement reconnus par le récepteur B exprimé à la surface cellulaire. Ceci suggère que les cellules B

pourraient présenter de manière très efficace, via le CMH de classe II, des autoantigènes hépatiques pour lesquels elles expriment des récepteurs spécifiques.

Les cellules B pourraient donc avoir un rôle plus tardif, dans la perpétuation de la réponse autoimmune envers le foie. De fait, la capture efficace par les cellules B d'autoantigènes hépatiques relâchés lors de la lyse d'hépatocytes par un petit nombre de cellules T CD8+ cytotoxiques pourrait « nourrir » la réponse T CD4+ autoréactive dirigée contre ces autoantigènes, via leur présentation efficace par le CMH de classe II. Elle pourrait mener à une intensification des réponses B et T auxiliaire et, indirectement, de la réponse CTL. L'intensification de la réponse CTL entraînerait la relâche croissante d'autoantigènes et la stimulation des cellules B augmentant la différenciation en plasmocytes. Ce mécanisme entraînerait une augmentation de la sécrétion d'immunoglobulines parallèlement à l'intensification de l'activité de la maladie, comme celle observé dans notre modèle (132).

L'intervention de la réponse B dans la pathogenèse de l'HAI pourrait aussi être indirecte par la formation de complexes immuns entre les autoanticorps et les autoantigènes. La capture d'autoantigènes hépatiques libres suite à la lyse des hépatocytes par les CTL pourrait entraîner la formation de complexes immuns et leur capture par des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (cellules dendritiques hépatiques, cellules de Kupffer). Ce mécanisme favoriserait donc la présentation via le CMH d'autoantigènes reconnus par ces autoanticorps et permettrait le maintien de la réponse autoimmune envers le foie. Elle aurait aussi pour effet de produire une réponse B et T qui seraient dirigées contre des séquences antigéniques partiellement ou totalement identiques. Récemment, l'équipe de Vergani *et al.* a montré que les épitopes ciblés par les autoanticorps anti-LKM1 et ceux ciblés par les cellules T chez les patients atteints d'HAI de type 2 étaient situés dans les mêmes régions antigéniques du CYP2D6 (143).

Cet aspect important de la pathogenèse de l'HAI devra être le sujet d'études ultérieures si on désire mieux comprendre le rôle précis de la réponse B et des autoanticorps dans le développement de cette maladie.

### **La tolérance centrale pourrait être impliquée dans la susceptibilité à l'HAI présente chez certains individus**

La tolérance centrale, responsable de l'élimination des cellules T autoréactives par le thymus, pourrait avoir un rôle majeur dans le développement de l'HAI. Nos travaux ont montré que cette tolérance ne serait probablement pas responsable de la susceptibilité accrue des femelles C57BL/6 (132). Cependant, nos travaux suggèrent que l'expression différentielle d'autoantigènes hépatiques ciblés dans l'HAI (FTCD et le CYP2D6) par le thymus pourrait expliquer les différences de développement de la maladie entre plusieurs souches de souris (144). En effet, les souris BALB/c exprimeraient des niveaux élevés de FTCD et de CYP2D9 au thymus, permettant une élimination plus efficace des cellules T dirigées contre la FTCD murine comparativement aux souris 129S/v et C57BL/6, qui expriment des quantités équivalentes de CYP2D9 mais moins de FTCD (144). Il a été montré qu'une réduction de l'expression de l'insuline dans le thymus de souris est responsable d'une augmentation proportionnelle du nombre de clones T spécifiques à l'insuline (145). Les niveaux d'expression thymique d'autoantigènes corréleront donc avec le nombre de cellules T spécifiques à ces antigènes présentes en circulation. Cette différence d'expression pourrait expliquer la « résistance » au développement d'une HAI des souris BALB/c qui ne développent, comparativement aux 129S/v et aux C57BL/6, aucun signe d'une réponse T autoréactive et une très faible réponse B autoimmune (133).

En résumé, les niveaux d'expression au thymus d'autoantigènes hépatiques, ciblés dans l'HAI, peuvent varier entre les souches murines et une diminution de ces niveaux corréle avec une susceptibilité accrue au développement de la maladie (142, 144). La tolérance centrale pourrait donc avoir un impact sur le développement d'une HAI et pourrait conférer une résistance ou une susceptibilité accrues chez certains individus.

### **Le bagage génétique joue un rôle important dans la prédisposition à l'HAI mais n'est qu'une composante de son développement**

Le nombre restreint de gènes du CMH partagés par plusieurs patients atteints d'HAI montre bien l'impact que ces gènes peuvent avoir dans la susceptibilité à la maladie. Ces gènes étant impliqués tant dans l'apprêtement (*processing*) des antigènes que dans leur présentation, il est facile d'imaginer que certains allèles pourraient faciliter la présentation d'épitopes susceptibles de participer au développement d'une HAI, entre autres via un mécanisme de mimétisme moléculaire. Par contre, malgré l'identification de plusieurs polymorphismes trouvés sur des gènes intervenant dans la réponse immune chez des patients avec une HAI, le rôle de gènes hors du CMH reste cependant à confirmer. Le rôle est plus clair pour certaines mutations invalidantes de ces gènes, notamment celles pour le gène AIRE (*autoimmune regulator*), qui peuvent mener au développement d'une HAI en association avec d'autres pathologies autoimmunes (146).

Nos travaux montrent bien l'importance que ces gènes peuvent jouer dans notre modèle expérimental: les souris 129/Sv possédant les mêmes gènes du CMH que les souris C57BL/6, ne développent qu'une inflammation éparse et des niveaux d'ALT normaux (133). La possession d'allèles de susceptibilité du CMH ne suffit donc pas à entraîner le développement d'une HAI. Ces résultats nous permettent de comprendre pourquoi certains allèles du CMH associés à une susceptibilité à l'HAI chez l'homme (HLA-DR3) peuvent être présent chez près de 30% des individus d'origine européenne (147). Ces gènes agiraient en synergie avec d'autres gènes liés à la réponse immunitaire, et c'est cette combinaison de facteurs génétiques qui rendraient ces individus plus susceptibles au développement d'une maladie autoimmune telle l'HAI.

Dans notre modèle, malgré la présence d'un bagage génétique prédisposant, les mâles C57BL/6 ne développent pas d'HAI (132). Il y a donc d'autres facteurs influençant le développement de l'inflammation hépatique (132).

### **L'influence du sexe sur la susceptibilité à développer une autoimmunité hépatique pourrait être le résultat d'une modification des facteurs influençant la tolérance périphérique**

Le sexe est déjà connu pour influencer la susceptibilité à l'HAI puisque près de 90% des patients atteints d'HAI de type 2 sont de sexe féminin (9). Quoiqu'elle n'ait jamais été prouvée, l'hypothèse voulant que les hormones sexuelles soient responsables de cette modification de la susceptibilité est généralement celle qui est la plus souvent énoncée (148). Nos travaux montrent que les niveaux de testostérone et d'estrogène n'auraient que peu d'effets sur la susceptibilité que montrent les sujets de sexe féminin (132). D'autres facteurs reliés au sexe, telles l'influence de gènes présents sur le chromosome X ou celle de facteurs propres aux sujets de sexe féminin, pourraient donc être responsables de l'incidence accrue d'HAI.

Nous avons aussi montré dans notre modèle expérimental d'HAI que l'influence du bagage génétique rend les femelles C57BL/6 plus susceptibles à l'HAI que les souris femelles de souches 129S/v ou BALB/c (133). Cette susceptibilité serait cependant réprimée ou absente chez les mâles C57BL/6 (132). Cette observation suggère que des facteurs présents chez les mâles offrent une protection contre le développement d'une HAI, malgré la présence de gènes de susceptibilité, ou que les facteurs de susceptibilité ne s'expriment que chez les femelles.

Nos travaux montrent que les niveaux de cellules T régulatrices FoxP3+ corrèlent avec la susceptibilité à l'HAI dans notre modèle expérimental (132). En effet, les femelles atteintes ont des niveaux plus bas de cellules T régulatrices FoxP3+ en périphérie (PBMC et rate) et au foie, où ces cellules sont pratiquement absentes en comparaison avec les mâles (132). Ces cellules T régulatrices FoxP3+, responsables de la tolérance périphérique via la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10 et TGF- $\beta$ ) ou via une action inhibitrice directe par contact cellulaire avec les CPA et les cellules T autoréactives, pourraient donc avoir une influence majeure sur le développement d'une HAI.

Le rôle essentiel du facteur de transcription FoxP3 dans le développement des cellules T régulatrices et sa localisation sur le chromosome X font de cette protéine un excellent candidat pour expliquer la différence de susceptibilité observée entre les mâles et les femelles C57BL/6. Les gènes sur le chromosome X qui sont associés à une pathologie présentent des patrons variables de méthylation (149) pouvant entraîner la modification des niveaux d'expression de ces gènes entre mâles et femelles. Cependant, il n'y a, jusqu'à présent, aucune donnée pouvant suggérer que FoxP3 présenterait un patron d'inactivation variable pouvant influencer son expression chez les sujets féminins (149). Nos observations montrent aussi que les niveaux d'expression de FoxP3 ne diffèrent pas entre mâles et femelles C57BL/6 et que les cellules T régulatrices présentes chez les femelles C57BL/6 sont fonctionnelles (données non publiées).

Nos observations qu'un nombre réduit de cellules T régulatrices pourrait être reliées à une susceptibilité accrue à l'HAI sont compatibles avec celles faites par l'équipe de Vergani *et al.* chez des patients avec HAI. Cette équipe a trouvé un nombre réduit de cellules T régulatrices circulantes, une capacité réduite de prolifération et selon les études, une capacité normale à inhiber la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules CD4+CD25- (150). Ceci suggère que chez les patients atteints d'HAI autant que dans notre modèle expérimental, un déficit en cellules T régulatrices pourrait être responsable d'une susceptibilité à développer la maladie.

Récemment, il a été montré dans une cohorte de patients atteints d'HAI que les hommes étaient porteur de plus de gènes HLA de susceptibilité : 63% des hommes versus 45% des femmes étaient porteurs de l'HLA-DR3 et 74% des hommes versus 38% des femmes étaient porteurs de l'HLA-B8 (148). Finalement, l'haplotype complexe de susceptibilité HLA-B8-DR3 était exprimé par 50% des hommes contre 23% des femmes (148). Malgré le fait qu'ils soient porteurs de ces gènes de susceptibilité, les hommes avec une HAI ont une meilleure survie à long terme (148). Ces observations chez des patients atteints d'HAI et celles faites dans notre modèle (132, 133) suggèrent que par rapport aux

sujets de sexe féminin, les mâles nécessitent une participation accrue d'autres facteurs en présence de gènes de susceptibilités similaires.

L'ensemble de ces travaux suggèrent que: 1) la susceptibilité conférée aux sujets de sexe féminin par la diminution du nombre de cellules T régulatrices aurait une influence dominante vis à vis celle apportée par le bagage génétique ou que; 2) les sujets mâles profitent d'une « protection » nécessitant la présence d'un nombre supérieur de facteurs de susceptibilité (bagage génétique et/ou environnement) pour développer une HAI.

Nous n'avons, pour l'instant, aucun moyen d'évaluer la susceptibilité d'un individu à développer une HAI. Les niveaux des cellules T régulatrices pourraient donc être un marqueur fiable. D'autres pathologies autoimmunes ont été trouvées chez des patients avec une HAI; des cellules T régulatrices en nombre ou fonctionnalité réduites chez les patients avec HAI pourraient expliquer la présence d'autres pathologies autoimmunes (126). Il a aussi été montré que dans les familles où un membre est atteint d'HAI, l'incidence de maladies autoimmunes est plus élevée (9). Ceci suggère que les anomalies du système immunitaire responsables du développement d'une HAI pourraient aussi contribuer au développement d'autres pathologies autoimmunes.



## Conclusion

Les travaux rapportés dans cette thèse avaient pour but l'étude de la pathogenèse de l'hépatite autoimmune. Plus spécifiquement, le développement d'un modèle d'hépatite autoimmune de type 2 et l'étude de l'influence du patrimoine génétique et de l'âge et du sexe sur le développement de la maladie

Le modèle expérimental d'HAI de type 2 que nous avons développé présente la plupart des caractéristiques histologiques, biochimiques et sérologiques de l'HAI de type 2 (**Tableau 4**) (134). Les souris développent une inflammation autoimmune chronique avec présence d'hépatite d'interface et d'infiltration intralobulaire, un infiltrat composé majoritairement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mais aussi de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et B, une élévation des ALT sériques, des niveaux d'immunoglobuline G circulante augmentés ainsi que des autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1 (134).

Nos travaux sur les influences du bagage génétique ont permis de définir l'importance relative des gènes du CMH et des gènes hors du CMH sur développement d'une HAI (**Tableau 4**). De ceux-ci nous pouvons conclure que des gènes du locus MHC sont essentiels mais non suffisant pour mener au développement d'une HAI et que donc, la susceptibilité génétique à l'HAI est comme chez l'homme, multigénique. L'étude des influences de l'âge et du sexe dans notre modèle a permis de montrer que les souris avant et au moment de la maturité sexuelle, sont plus susceptibles au développement d'une HAI de type 2. Les femelles ont un nombre réduit de lymphocytes T régulateurs, ce qui leur confère une susceptibilité accrue comparé aux mâles.

Selon les résultats obtenus lors de cette thèse, nous proposons la séquence d'événements suivants pour expliquer le développement d'une HAI dans notre modèle expérimental: chez les souris avec des niveaux d'expression thymique d'autoantigènes hépatiques permettant la survie de clones T autoréactifs (C57BL/6 et 129S/v par exemple), il y aurait activation de ces clones via la présentation par les CPA de la protéine exogène

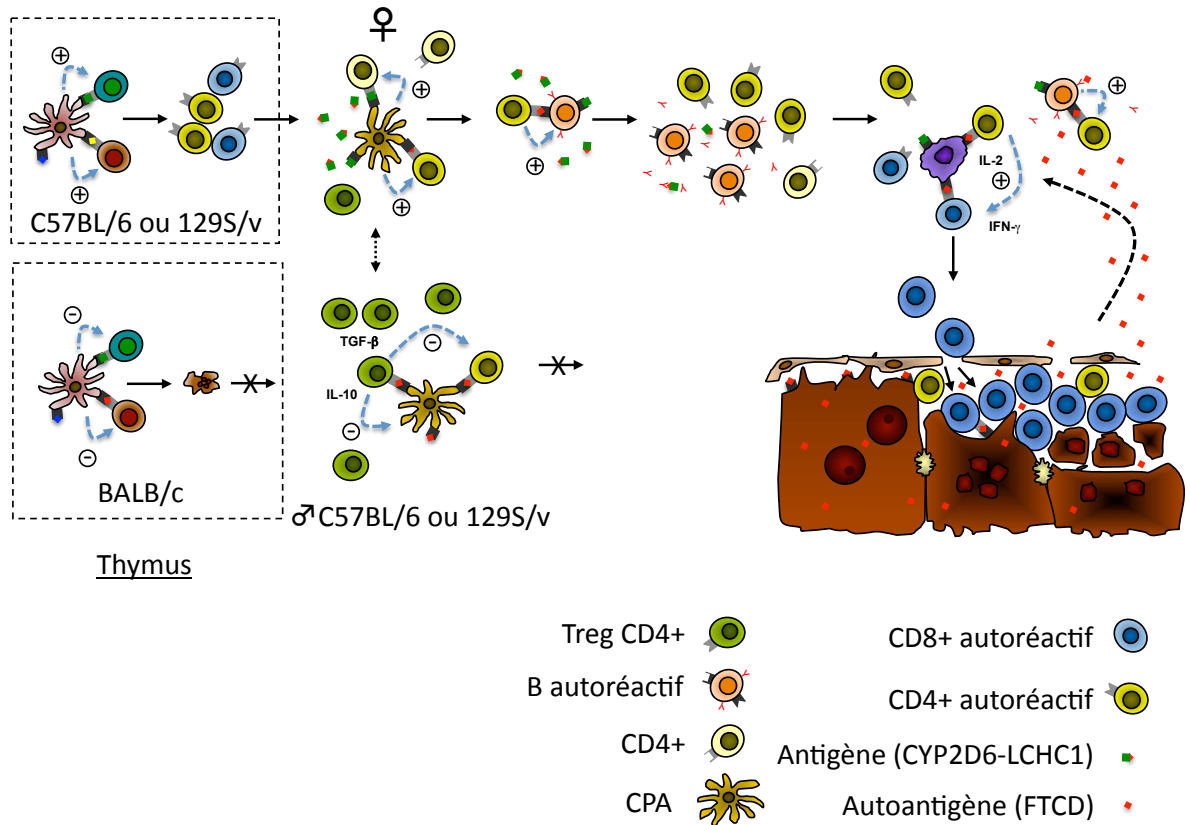
(CYP2D6-FTCD) (**Figure 4**). L'activation d'un nombre suffisant de cellules T régulatrices chez certaines souris (mâles C57BL/6 et souris 129S/v) préviendrait l'activation des cellules CD4+ auxiliaires et le développement d'une HAI.

<b>Hépatite autoimmune de type 2</b>	<b>Modèle expérimental</b>
<b>Clinique</b>	
Prépondérance féminine	Oui
Âge	Oui
<b>Laboratoire</b>	
ALT/AST élevées	Oui
Hyper-IgG	Oui
Autoanticorps (LKM1/LC1)	Oui
Prédominance cellules T CD4+ (Th1)	Oui
Cellules T CD8+ spécifiques	Oui
<b>Histologie</b>	
Infiltration lymphoplasmocytaire du foie	Oui
Hépatite d'interface	Oui
Hépatite intralobulaire	Oui
<b>Génétique</b>	
Gènes du locus CMH	Oui
Gènes hors du locus CMH	Oui

**Tableau 4. Similarités entre l'hépatite autoimmune de type 2 et le modèle expérimental.**

Chez les souris C57BL/6 femelles d'un âge particulier, suite à l'activation des CD4+ auxiliaires autoréactifs, il y aurait activation de cellules B autoréactives et production d'autoanticorps spécifiques. L'activation et la prolifération des CD4+ auxiliaires autoréactifs entraîneraient aussi l'activation de cellules CD8+ cytotoxiques (CTL) spécifiques. L'activation de CTL mènerait à la lyse d'hépatocytes présentant, via leur CMH de classe I, des autoantigènes hépatiques (mFTCD/CYP2D9). Cette lyse entraînerait la relâche d'autoantigènes hépatiques et leur présentation par les cellules présentatrice d'antigène professionnelle (CPA) à proximité. Ces autoantigènes pourraient aussi être capturés par les cellules B autoréactives et seraient présentés via le CMH de classe II,

entraînant l'activation et la survie de cellules T CD4+ auxiliaires et perpétuant ainsi la réaction autoimmune contre le foie.



**Figure 4. Pathogenèse de l'hépatite autoimmune dans notre modèle expérimental.**

Les travaux de cette thèse et le développement de ce modèle d'HAI de type 2 ont permis une meilleure compréhension de la pathogenèse de la maladie. Cependant, plusieurs avenues de recherche restent à explorer à l'aide de ce modèle. Entre autres, l'identification de nouveaux marqueurs biologiques pour l'établissement d'un diagnostic précoce de la maladie.

De plus, les traitements immunosuppresseurs présentement utilisés chez les patients avec HAI ne sont pas spécifiques et sont associés à de nombreux effets secondaires

indésirables. L'étude de la pathogénèse de l'HAI de type 2 à l'aide de notre modèle pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et à leur validation dans un modèle expérimental. Ultimement, ceci pourrait mener au développement de nouvelles immunothérapies spécifiques pour les patients atteints d'HAI. Celles-ci pourraient inclure : la déplétion spécifique de sous-populations lymphocytaires jouant un rôle important dans le développement de la maladie, le rétablissement d'une tolérance immunitaire envers les autoantigènes ciblés dans l'HAI par tolérisation orale et, l'expansion *ex vivo* et le transfert de cellules T régulatrices spécifiques à des patients HAI de type 2.

## Bibliographie

1. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
2. Otu HH, Naxerova K, Ho K, Can H, Nesbitt N, Libermann TA, Karp SJ. Restoration of liver mass after injury requires proliferative and not embryonic transcriptional patterns. *J Biol Chem* 2007;282:11197-11204.
3. Tillmann HL, Manns MP, Rudolph KL. Merging models of hepatitis C virus pathogenesis. *Semin Liver Dis* 2005;25:84-92.
4. Bayer EM, Herr W, Kanzler S, Waldmann C, Meyer Zum Buschenfelde KH, Dienes HP, Lohse AW. Transforming growth factor-beta1 in autoimmune hepatitis: correlation of liver tissue expression and serum levels with disease activity. *J Hepatol* 1998;28:803-811.
5. Bedossa P, Peltier E, Terris B, Franco D, Poynard T. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* 1995;21:760-766.
6. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest* 1995;96:447-455.
7. Bedossa P, Paradis V. Transforming growth factor-beta (TGF-beta): a key-role in liver fibrogenesis. *J Hepatol* 1995;22:37-42.
8. Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
9. Alvarez F. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis* 2006;10:89-107, vi.
10. Kirk AP, Jain S, Pocock S, Thomas HC, Sherlock S. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut* 1980;21:78-83.
11. Odievre M, Maggiore G, Homberg JC, Saadoun F, Courouce AM, Yvart J, Hadchouel M, et al. Seroimmunologic classification of chronic hepatitis in 57 children. *Hepatology* 1983;3:407-409.

12. Mallory FB. Cirrhosis of the liver. *N Engl J Med* 1932;1231-1239.
13. Barker MH, Capps R.B. , Allen, F.W. Chronic hepatitis in the mediterranean theater: a new clinical syndrome. *J Am Med Assoc* 1945;129:653-659.
14. palmer WL. Acute and chronic hepatitis (cirrhosis). *Ill med J* 1944;85:143-147.
15. Waldenström JG. Blutproteine und NahrungseiweiB. *Dtsch Z Verdau Staffwechselkr* 1950;15:113-119.
16. Bearn AG, Kunkel HG, Slater RJ. The problem of chronic liver disease in young women. *Am J Med* 1956;21:3-15.
17. Saint EG, King WE, Joske RA, Finckh ES. The course of infectious hepatitis with special reference to prognosis and the chronic stage. *Australas Ann Med* 1953;2:113-127.
18. Cowling DC, Mackay IR, Taft LI. Lupoid hepatitis. *Lancet* 1956;271:1323-1326.
19. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Mayo Clin Proc* 1948;23:25-28.
20. Mackay IR, Weiden S, Hasker J. Autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci* 1965;124:767-780.
21. Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, Hadchouel P, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;17:376-381.
22. Gregorio GV, Portmann B, Reid F, Donaldson PT, Doherty DG, McCartney M, Mowat AP, et al. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 1997;25:541-547.
23. Porta G, Gayotto LC, Alvarez F. Anti-liver-kidney microsome antibody-positive autoimmune hepatitis presenting as fulminant liver failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;11:138-140.
24. Herzog D, Rasquin-Weber AM, Debray D, Alvarez F. Subfulminant hepatic failure in autoimmune hepatitis type 1: an unusual form of presentation. *J Hepatol* 1997;27:578-582.
25. Vajro P, Hadchouel P, Hadchouel M, Bernard O, Alagille D. Incidence of cirrhosis in children with chronic hepatitis. *J Pediatr* 1990;117:392-396.

26. Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Pares A, Dalekos GN, Krawitt EL, Bittencourt PL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169-176.
27. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938.
28. Czaja AJ, Carpenter HA. Autoimmune hepatitis with incidental histologic features of bile duct injury. *Hepatology* 2001;34:659-665.
29. Miescher P, Fauconet M. Absorption of L.E. factor by isolated cell nuclei. *Experientia* 1954;10:252-253.
30. Mackay IR, Taft LI, Cowling DC. Lupoid hepatitis and the hepatic lesions of systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1959;1:65-69.
31. Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001;120:239-249.
32. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71-81.
33. Johnson GD, Holborow EJ, Glynn LE. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet* 1965;2:878-879.
34. Frenzel C, Herkel J, Luth S, Galle PR, Schramm C, Lohse AW. Evaluation of F-actin ELISA for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2731-2736.
35. Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cancado EL, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, et al. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004;41:677-683.
36. Rizzetto M, Swana G, Doniach D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 1973;15:331-344.
37. Rizzetto M, Bianchi FB, Doniach D. Characterization of the microsomal antigen related to a subclass of active chronic hepatitis. *Immunology* 1974;26:589-601.

38. Smith MG, Williams R, Walker G, Rizzetto M, Doniach D. Hepatic disorders associated with liver-kidney microsomal antibodies. *Br Med J* 1974;2:80-84.
39. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, Poupon R, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. *Hepatology* 1987;7:1333-1339.
40. Gueguen M, Meunier-Rotival M, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *J Exp Med* 1988;168:801-806.
41. Manns MP, Johnson EF, Griffin KJ, Tan EM, Sullivan KF. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *J Clin Invest* 1989;83:1066-1072.
42. Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, Homberg JC, Meyer UA. Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:8256-8260.
43. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J* 2005;5:6-13.
44. Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, et al. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000;46:553-561.
45. Yamamoto AM, Mura C, De Lemos-Chiarandini C, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Cytochrome P450IID6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clin Exp Immunol* 1993;92:381-390.
46. Trautwein C, Gerken G, Lohr H, Meyer zum Buschenfelde KH, Manns M. Lack of surface expression for the B-cell autoepitope of cytochrome P450 IID6 evidenced by flow cytometry. *Z Gastroenterol* 1993;31:225-230.
47. Yamamoto AM, Mura C, Morales MG, Bernard O, Krishnamoorthy R, Alvarez F. Study of CYP2D6 gene in children with autoimmune hepatitis and P450 IID6 autoantibodies. *Clin Exp Immunol* 1992;87:251-255.



48. Manns M, Zanger U, Gerken G, Sullivan KF, Meyer zum Buschenfelde KH, Meyer UA, Eichelbaum M. Patients with type II autoimmune hepatitis express functionally intact cytochrome P-450 db1 that is inhibited by LKM-1 autoantibodies in vitro but not in vivo. *Hepatology* 1990;12:127-132.
49. Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993;23:1105-1111.
50. Duclos-Vallee JC, Hajoui O, Yamamoto AM, Jacz-Aigrain E, Alvarez F. Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies. *Gastroenterology* 1995;108:470-476.
51. Gueguen M, Boniface O, Bernard O, Clerc F, Cartwright T, Alvarez F. Identification of the main epitope on human cytochrome P450 IID6 recognized by anti-liver kidney microsome antibody. *J Autoimmun* 1991;4:607-615.
52. Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991;88:1370-1378.
53. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* 2002;262:103-110.
54. Obermayer-Straub P, Manns MP. Hepatitis C and D, retroviruses and autoimmune manifestations. *J Autoimmun* 2001;16:275-285.
55. Muratori P, Muratori L, Verucchi G, Attard L, Bianchi FB, Lenzi M. Non-organ-specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C: clinical significance and impact on interferon treatment. *Clin Infect Dis* 2003;37:1320-1326.
56. Muratori P, Muratori L, Guidi M, Granito A, Susca M, Lenzi M, Bianchi FB. Clinical impact of non-organ-specific autoantibodies on the response to combined antiviral treatment in patients with hepatitis C. *Clin Infect Dis* 2005;40:501-507.
57. Marceau G, Lapierre P, Beland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology* 2005;42:675-682.

58. Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 1988;8:1662-1666.
59. Abuaf N, Johanet C, Chretien P, Martini E, Soulier E, Laperche S, Homberg JC. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 1992;16:892-898.
60. Muratori L, Cataleta M, Muratori P, Lenzi M, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 1998;42:721-726.
61. Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643-649.
62. Renous R, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. Characterization of the antigenicity of the formiminotransferase-cyclodeaminase in type 2 autoimmune hepatitis. *Exp Cell Res* 2004;292:332-341.
63. Lapierre P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33:1869-1878.
64. Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A, Staritz M, Meyer zum Buschenfelde KH. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987;1:292-294.
65. Stechemesser E, Klein R, Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993;18:1-9.
66. Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 2000;355:1510-1515.
67. Lohse AW, Gerken G, Mohr H, Lohr HF, Treichel U, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH. Relation between autoimmune liver diseases and viral hepatitis: clinical and serological characteristics in 859 patients. *Z Gastroenterol* 1995;33:527-533.

68. Vitozzi S, Djilali-Saiah I, Lapierre P, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen/liver-pancreas (SLA/LP) antibodies in pediatric patients with autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 2002;35:485-492.
69. Beland K, Lapierre P, Marceau G, Alvarez F. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Autoimmun* 2004;22:159-166.
70. Marceau G, Lapierre P, Beland K, Soudeyns H, Alvarez F. LKM1 Autoantibodies in Chronic Hepatitis C Infection: A Case of Molecular Mimicry? *Hepatology* 2005;42:In press.
71. Vitozzi S, Lapierre P, Djilali-Saiah I, Marceau G, Beland K, Alvarez F. Anti-soluble liver antigen (SLA) antibodies in chronic HCV infection. *Autoimmunity* 2004;37:217-222.
72. Manns MP, Kruger M. Immunogenetics of chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1994;106:1676-1697.
73. Doherty DG, Donaldson PT, Underhill JA, Farrant JM, Duthie A, Mieli-Vergani G, McFarlane IG, et al. Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1994;19:609-615.
74. Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol* 2004;40:904-909.
75. Czaja AJ, Carpenter HA, Moore SB. Clinical and HLA phenotypes of type 1 autoimmune hepatitis in North American patients outside DR3 and DR4. *Liver Int* 2006;26:552-558.
76. Vazquez-Garcia MN, Alaez C, Olivo A, Debaz H, Perez-Luque E, Burguete A, Cano S, et al. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28:985-990.
77. Pando M, Larriba J, Fernandez GC, Fainboim H, Ciocca M, Ramonet M, Badia I, et al. Pediatric and adult forms of type I autoimmune hepatitis in Argentina: evidence for differential genetic predisposition. *Hepatology* 1999;30:1374-1380.

78. Seki T, Ota M, Furuta S, Fukushima H, Kondo T, Hino K, Mizuki N, et al. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 1992;103:1041-1047.
79. Fainboim L, Marcos Y, Pando M, Capucchio M, Reyes GB, Galoppo C, Badia I, et al. Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1\*1301) haplotype. *Hum Immunol* 1994;41:146-150.
80. Czaja AJ, Souto EO, Bittencourt PL, Cancado EL, Porta G, Goldberg AC, Donaldson PT. Clinical distinctions and pathogenic implications of type 1 autoimmune hepatitis in Brazil and the United States. *J Hepatol* 2002;37:302-308.
81. Jurado A, Cardaba B, Jara P, Cuadrado P, Hierro L, de Andres B, del Pozo V, et al. Autoimmune hepatitis type 2 and hepatitis C virus infection: study of HLA antigens. *J Hepatol* 1997;26:983-991.
82. Bittencourt PL, Goldberg AC, Cancado EL, Porta G, Carrilho FJ, Farias AQ, Palacios SA, et al. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1906-1913.
83. Czaja AJ, Kruger M, Santrach PJ, Moore SB, Manns MP. Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:2197-2200.
84. Czaja AJ, Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol Rev* 2000;174:250-259.
85. Strettell MD, Donaldson PT, Thomson LJ, Santrach PJ, Moore SB, Czaja AJ, Williams R. Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1997;112:2028-2035.
86. Djilali-Saiah I, Fakhfakh A, Louafi H, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2006;45:844-850.
87. De la Concha EG, Fernandez-Arquero M, Gual L, Vigil P, Martinez A, Urcelay E, Ferreira A, et al. MHC susceptibility genes to IgA deficiency are located in different regions on different HLA haplotypes. *J Immunol* 2002;169:4637-4643.
88. Vorechovsky I, Webster AD, Plebani A, Hammarstrom L. Genetic linkage of IgA deficiency to the major histocompatibility complex: evidence for allele segregation

distortion, parent-of-origin penetrance differences, and the role of anti-IgA antibodies in disease predisposition. *Am J Hum Genet* 1999;64:1096-1109.

89. Vergani D, Wells L, Larcher VF, Nasaruddin BA, Davies ET, Mieli-Vergani G, Mowat AP. Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 1985;2:294-298.

90. Scully LJ, Toze C, Sengar DP, Goldstein R. Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion. *Gastroenterology* 1993;104:1478-1484.

91. Donaldson PT. Immunogenetics in liver disease. *Baillieres Clin Gastroenterol* 1996;10:533-549.

92. Djilali-Saiah I, Larger E, Harfouch-Hammoud E, Timsit J, Clerc J, Bertin E, Assan R, et al. No major role for the CTLA-4 gene in the association of autoimmune thyroid disease with IDDM. *Diabetes* 1998;47:125-127.

93. Fukazawa T, Yanagawa T, Kikuchi S, Yabe I, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, et al. CTLA-4 gene polymorphism may modulate disease in Japanese multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 1999;171:49-55.

94. Djilali-Saiah I, Schmitz J, Harfouch-Hammoud E, Mougenot JF, Bach JF, Caillat-Zucman S. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. *Gut* 1998;43:187-189.

95. Agarwal K, Czaja AJ, Jones DE, Donaldson PT. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2000;31:49-53.

96. Djilali-Saiah I, Ouellette P, Caillat-Zucman S, Debray D, Kohn JI, Alvarez F. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Hum Immunol* 2001;62:1356-1362.

97. Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, Kanda T, Kojima H, Fukai K, Suzuki Y, et al. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1322-1329.

98. Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis. *Tissue Antigens* 2007;69:227-235.

99. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002;35:126-131.
100. Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology* 1986;59:333-338.
101. Lemire JM, Archer DC, Beck L, Spiegelberg HL. Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: preferential inhibition of Th1 functions. *J Nutr* 1995;125:1704S-1708S.
102. Berer A, Stockl J, Majdic O, Wagner T, Kollars M, Lechner K, Geissler K, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp Hematol* 2000;28:575-583.
103. Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Bernal W, Czaja AJ, Donaldson PT. Frequency and nature of cytokine gene polymorphisms in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1999;30:851-856.
104. Czaja AJ, Cookson S, Constantini PK, Clare M, Underhill JA, Donaldson PT. Cytokine polymorphisms associated with clinical features and treatment outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;117:645-652.
105. Ahonen P, Myllarniemi S, Sipila I, Perheentupa J. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *N Engl J Med* 1990;322:1829-1836.
106. Vogel A, Liermann H, Harms A, Strassburg CP, Manns MP, Obermayer-Straub P. Autoimmune regulator AIRE: evidence for genetic differences between autoimmune hepatitis and hepatitis as part of the autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Hepatology* 2001;33:1047-1052.
107. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196-203.

108. Lohse AW, Manns M, Dienes HP, Meyer zum Buschenfelde KH, Cohen IR. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 1990;11:24-30.
109. Schramm C, Protschka M, Kohler HH, Podlech J, Reddehase MJ, Schirmacher P, Galle PR, et al. Impairment of TGF-beta signaling in T cells increases susceptibility to experimental autoimmune hepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G525-535.
110. Howell CD, Yoder TD. Murine experimental autoimmune hepatitis: nonspecific inflammation due to adjuvant oil. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:76-82.
111. Toyonaga T, Hino O, Sugai S, Wakasugi S, Abe K, Shichiri M, Yamamura K. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:614-618.
112. Nicoletti F, Di Marco R, Zaccone P, Salvaggio A, Magro G, Bendtzen K, Meroni P. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology* 2000;32:728-733.
113. Gorham JD, Lin JT, Sung JL, Rudner LA, French MA. Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol* 2001;166:6413-6422.
114. Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 2000;165:2415-2422.
115. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:149-173.
116. Lapierre P, Beland K, Alvarez F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 2007;149:107-113.
117. Lunardi C, Tiso M, Borgato L, Nanni L, Millo R, De Sandre G, Severi AB, et al. Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur J Immunol* 1998;28:936-948.

118. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80:695-705.
119. von Herrath MG, Evans CF, Horwitz MS, Oldstone MB. Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system. *Immunol Rev* 1996;152:111-143.
120. Djilali-Saiah I, Lapierre P, Vittozi S, Alvarez F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2002;169:4889-4896.
121. Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J Virol* 2000;74:6278-6286.
122. Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. Regulation of T-helper-1 versus T-helper-2 activity and enhancement of tumor immunity by combined DNA-based vaccination and nonviral cytokine gene transfer. *Gene Ther* 2000;7:481-492.
123. Song K, Chang Y, Prud'homme GJ. IL-12 plasmid-enhanced DNA vaccination against carcinoembryonic antigen (CEA) studied in immune-gene knockout mice. *Gene Ther* 2000;7:1527-1535.
124. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, Kreibich G. Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 1985;161:1231-1236.
125. Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. Intrahepatic immunity: a tale of two sites? *Trends Immunol* 2005;26:512-517.
126. Luo X, Herold KC, Miller SD. Immunotherapy of type 1 diabetes: where are we and where should we be going? *Immunity*;32:488-499.
127. Makino S, Kunitomo K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 1980;29:1-13.
128. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 1999;5:601-604.



129. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008;455:1109-1113.
130. Oldstone MB, Nerenberg M, Southern P, Price J, Lewicki H. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 1991;65:319-331.
131. Beland K, Lapierre P, Alvarez F. Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2009;15:1025-1034.
132. Lapierre P, Beland K, Martin C, Alvarez F, Jr., Alvarez F. Forkhead box p3+ regulatory T cell underlies male resistance to experimental type 2 autoimmune hepatitis. *Hepatology*;51:1789-1798.
133. Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah I, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: the influence of genetic background in disease development. *J Autoimmun* 2006;26:82-89.
134. Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004;39:1066-1074.
135. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, Odermatt B, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 2005;11:138-145.
136. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701-712.
137. Bertolino P, Trescol-Biemont MC, Thomas J, Fazekas de St Groth B, Pihlgren M, Marvel J, Roubourdin-Combe C. Death by neglect as a deletional mechanism of peripheral tolerance. *Int Immunol* 1999;11:1225-1238.
138. Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M, Harris NL, et al. Immunoprivileged status of the liver is controlled by Toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 2006;116:2456-2463.

139. Hoebe K, Janssen EM, Kim SO, Alexopoulou L, Flavell RA, Han J, Beutler B. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat Immunol* 2003;4:1223-1229.
140. Spies B, Hochrein H, Vabulas M, Huster K, Busch DH, Schmitz F, Heit A, et al. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J Immunol* 2003;171:5908-5912.
141. See DM, Tilles JG. Pathogenesis of virus-induced diabetes in mice. *J Infect Dis* 1995;171:1131-1138.
142. Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah D, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: The influence of genetic background in disease development. *Journal of Autoimmunity* 2006;26:82-89.
143. Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, Vergani D. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007;46:472-484.
144. Lapierre P, Beland K, Djilali-Saiah I, Herzog D, Alvarez F. Type 2 autoimmune hepatitis murine model: The influence of genetic determinants and central tolerance on disease development. *Hepatology* 2005;42:289A-290A.
145. Chentoufi AA, Polychronakos C. Insulin expression levels in the thymus modulate insulin-specific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* 2002;51:1383-1390.
146. Lankisch TO, Mourier O, Sokal EM, Habes D, Lacaille F, Bridoux-Henno L, Hermeziu B, et al. AIRE gene analysis in children with autoimmune hepatitis type I or II. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;48:498-500.
147. Gran JT, Husby G, Thorsby E. The prevalence of HLA-DR4 and HLA-DR3 in healthy persons with rheumatoid factor. *Scand J Rheumatol* 1985;14:79-82.
148. Al-Chalabi T, Underhill JA, Portmann BC, McFarlane IG, Heneghan MA. Impact of gender on the long-term outcome and survival of patients with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2008;48:140-147.

149. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005;434:400-404.
150. Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004;41:31-37.