

Université de Montréal

**Développement d'immunothérapies spécifiques pour le
traitement de l'hépatite autoimmune de type 2 chez un
modèle murin**

par

Roland Yang

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

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

en Microbiologie et Immunologie

Décembre 2010

© Roland Yang, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Développement d'immunothérapies spécifiques pour le traitement de l'hépatite
autoimmune de type 2 chez un modèle murin

Présenté par :
Roland Yang

a été évalué par un jury composé par :

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

Résumé

L'hépatite autoimmune (HAI) est une maladie grave affectant le foie et présentant un haut taux de mortalité lorsque non traitée. Les traitements disponibles sont efficaces, mais de graves effets secondaires leur sont associés. Ces effets secondaires sont généralement le résultat d'une forte immunosuppression et d'autres sont spécifiques à chaque médicament. Aucune immunothérapie spécifique n'est présentement disponible pour le traitement de l'HAI. Récemment, un modèle murin d'HAI a été développé dans notre laboratoire par xénoimmunisation des souris C57BL/6 avec les antigènes humains de l'HAI de type 2. Ce modèle présente la plupart des caractéristiques biochimiques et cliniques retrouvées chez les patients atteints d'HAI de type 2. Dans cette étude, nous avons évalué l'efficacité de deux types de traitement pour l'HAI de type 2 à l'aide de notre modèle murin. Dans un premier temps, l'anticorps anti-CD3 ϵ a été étudié en prophylaxie et en traitement. Nous avons montré qu'une posologie de 5 μ g d'anti-CD3 i.v. par jour pendant 5 jours consécutifs induit une rémission chez les souris avec HAI de type 2 établie (traitement). Cette rémission est caractérisée par une normalisation des niveaux d'alanine aminotransférase et une diminution significative de l'inflammation hépatique. Cette rémission semble être associée à une déplétion partielle et transitoire des lymphocytes T CD3+ dans la périphérie et une augmentation des lymphocytes T régulateurs CD4+, CD25+ et Foxp3+ dans le foie. La même posologie lorsqu'elle est appliquée en prophylaxie n'a pas réussi à prévenir l'apparition de l'HAI de type 2. La deuxième voie de traitement consiste en l'administration par voie intranasale d'une forte dose de formiminotransférase cyclodésaminase murin (mFTCD), un autoantigène reconnu dans l'HAI de type 2. Une administration en prophylaxie par voie intranasale de 100 μ g de mFTCD par jour durant 3 jours consécutifs arrive à prévenir l'HAI de type 2 en diminuant l'inflammation hépatique au bout de deux semaines post-traitement.

Mots-clés : Hépatite autoimmune de type 2, Anti-CD3, Tolérance intranasale, lymphocyte T régulateur, formiminotransférase cyclodésaminase (mFTCD)

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a severe liver disease with high mortality rates if left untreated. Current treatments, while effective, are associated with deleterious side-effects. These side effects are specific to each drug and the result of broad immunosuppression. Recently, a murine model of type 2 AIH has been created in our laboratory in wild-type naïve mice. In this model, DNA immunization with type 2 AIH human autoantigens breaks immune tolerance and induces an autoimmune response against the liver. Lately, new therapeutic strategies based on depletion of specific immune cell populations have been proposed for the treatment of several diseases, including autoimmune diseases. Currently, no immunotherapies using biological agents are available for the treatment of autoimmune liver diseases. Therefore, the goal of this project is to study the efficacy of new immunotherapeutic agents for the treatment of type 2 AIH in an experimental model. We evaluated the effectiveness of two approaches for treating type 2 AIH. First, we tested the anti-CD3 ϵ antibody in prophylaxis and in treatment of type 2 AIH. We showed that a dosage of 5 μ g i.v. of anti-CD3 ϵ antibody per day for 5 consecutive days induced remission in mice with established type 2 AIH. This remission was defined as a normalization of serum alanine aminotransferase levels and a significant decrease of liver inflammation in treated mice. This remission seems to be associated with a transitory depletion of CD3 $^+$ T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells and increased CD4 $^+$ CD25 $^+$ Foxp3 $^+$ regulatory T lymphocytes in the liver. But when this dosage was applied in prophylaxis, it could not prevent the induction of type 2 AIH. The second approach was to induce tolerance by nasal administration of murin formiminotransferase cyclodeaminase (mFTCD), an autoantigen of type 2 AIH. We showed that nasal administration of 100 μ g of mFTCD for 3 consecutive days prevented development of type 2 AIH in prophylaxis by reducing liver inflammation.

Keywords : Type 2 autoimmune hepatitis, Anti-CD3 antibody, nasal tolerance, forminotransferase cyclodeaminase, regulatory T lymphocyte

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction	1
1.1 Système immunitaire.....	1
1.1.1 L'immunité innée.....	1
1.1.2 L'immunité adaptative.....	3
1.2 Tolérance (discrimination entre le soi et le non-soi).....	4
1.2.1 Tolérance centrale.....	4
1.2.2 Tolérance périphérique.....	5
1.3 Le foie.....	7
1.3.1 Constitution et fonction.....	8
1.3.2 La tolérance immune du foie.....	9
1.4 Hépatite autoimmune (HAI).....	10
1.4.1 Historique.....	10
1.4.2 Caractéristiques.....	11
1.4.3 Pathogenèse et classification.....	14
1.5 Modèles animaux d'hépatite autoimmune.....	18
1.5.1 Modèles chimiques et biologiques.....	19
1.5.2 Modèles transgéniques.....	21
1.6 Traitements conventionnels.....	26
1.6.1 Immunosuppresseurs.....	26
1.6.2 Effet secondaire de chacun des immunosuppresseurs.....	27
1.7 Immunothérapies spécifiques pour le traitement des maladies autoimmunes.....	30
1.7.1 L'anticorps anti-CD3 ϵ et le récepteur CD3.....	30
1.7.2 Traitement intranasal.....	35
Chapitre 2 : Matériel et Méthodes.....	39
Chapitre 3 : Résultats.....	48
Chapitre 4: Discussion.....	63
Chapitre 5: Perspectives et Conclusions.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1 : Système de diagnostic du groupe International d'hépatite autoimmune. 13

Tableau 2 : Association des deux types d'HAI avec leurs autoanticorps/autoantigènes ainsi que les différentes maladies autoimmunes extra-hépatiques qui leur sont associées. 16

Liste des figures

Figure 1 : Sinusoïdes hépatiques	9
Figure 2 : Protocole de traitement de l'HAI de type 2 avec les anticorps anti-CD3 ϵ	41
Figure 3: Évaluation de l'efficacité du traitement d'anti-CD3 ϵ en quantifiant les lymphocytes T CD3 $^{+}$ par cytométrie en flux.	49
Figure 4 : Comparaison des niveaux d'ALT des souris traitées à l'anti-CD3 ϵ en prophylaxie.	50
Figure 5 : Niveaux d'inflammation du foie des souris xénoimmunisées traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ en prophylaxie.	51
Figure 6 : Pourcentage de lymphocytes T régulateurs dans les foies des souris xénoimmunisées traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ en prophylaxie.	52
Graphique 7 : Variation des ALT chez les souris atteintes d'HAI type 2 et traitées à l'anti-CD3 ϵ .	54
Figure 8 : Coupes histologiques des souris atteintes d'HAI de type 2 et traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ .	56
Figure 9 : Niveaux d'inflammation du foie des souris atteintes d'HAI de type 2 traitées par les anticorps anti-CD3 ϵ .	57
Figure 10 : Pourcentage de souris ayant un score d'inflammation inférieur à 1.	58
Figure 11 : Comparaison des niveaux de lymphocytes T régulateurs intrahépatiques entre les groupes de souris sacrifiées à 3 semaines et 3 mois post-traitement.	59
Figure 12 : Variation des ALT chez les souris xénoimmunisées et traitées par voie intranasale avec la mFTCD en prophylaxie.	60
Figure 13 : Niveaux d'inflammation hépatique des souris xénoimmunisées et traitées par voie intranasale avec la protéine mFTCD en prophylaxie	61
Figure 14 : Quantification des lymphocytes T régulateurs dans le foie des souris traitées par la voie intranasale.	62

Liste des abréviations

AIRE	Autoimmune regulator
APECED	Autoimmunes dystrophie polyendocrinopathie-candidiasesectodermal
Anti-SMA	Anticorps anti-muscle lisse
Anti-ANA	Anticorps anti-nucléaire
Anti-LKM1	Anticorps anti-microsome de foie et de rein de type 1
Anti-LC1	Anticorps anti-cytosol de type 1
Anti-ANCA	Anticorps anti-cytoplasme de neutrophiles
Anti-ASGP-R	Anticorps contre le récepteur de l'asialoglycoprotéine
Anti-SLA	Anticorps contre les antigènes solubles du foie
AICD	Activation induced cell death
ADCC	Cytotoxicité cellulaire anticorps dépendant
BALT	Bronchus associated lymphoid tissue
BCR	Récepteur des cellules B
CFA	Complete Freund's adjuvant
ConA	Concanavaline A
CPA	Cellules présentatrice d'antigène
CMH1 ou 2	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 ou 2
CTLA-4	Récepteur d'antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique
CYP2D6	Cytochrome P450 2D6
DC	Cellules dendritiques
DT1	Diabète de type 1
EAE	Encéphalomyélite autoimmune expérimentale
FTCD	Formiminotransférase cyclodéaminase
Gp33	Glycoprotéine 33 du LCMV
HAI	Hépatite autoimmune
HBVP	Polymérase du virus de l'hépatite B

IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IL-2	Interleukine-2
IFN- γ	Interféron gamma
IBD	Maladies inflammatoires de l'intestin
I.v	Voie intraveineuse
IAIHG	Groupe international d'hépatite autoimmune
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IPEX	Immunodysrégulation, polyendocrinopathie, entéropathie, lié à l'X
LPS	Lipopolysaccharides
LSEC	Cellules endothéliales sinusoïdes du foie
LCMV	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
MBP	Protéine basique de la myéline
MS	Sclérose en plaques
MOG	Glycoprotéine oligodendrocyte de la myéline
NF-AT	Nuclear factor of activated T-cells
NALT	Nasal associated lymphoid tissue
NK	Lymphocytes Natural Killer
NP	Nucléoprotéine du LCMV
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PRRs	Patterns recognition receptors
PD-1	Récepteur de mort cellulaire programmée 1
PLP	Protéine protéolipidique
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
SCID	Severe Combined Immunodeficiency mice
SAP	Promoteur du sérum amyloïde P
SFV	Virus de la forêt de Semliki
TTR	Promoteur de la transthyrétine
TMEV	Virus de Theiler encéphalomyélite murine

TLR	Toll-like receptor
TCR	Récepteur des cellules T
Th1	Lymphocytes auxiliaires de type 1
Th2	Lymphocytes auxiliaires de type 2
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
Tregs	Lymphocytes T régulateurs
TGF- β	Transforming growth factor- beta

Remerciements

Je voudrais remercier premièrement mon directeur de recherche, le Dr. Fernando Alvarez. Il m'a enseigné la patience et la détermination nécessaires pour performer dans le domaine de la recherche. Son raisonnement et sa capacité d'interprétation a grandement contribué à l'avancement de mon projet.

Un merci à Dr. Hugo Soudeyns, sans qui je n'aurais pas eu l'occasion de faire ma maîtrise dans le laboratoire du Dr. Fernando Alvarez.

Je remercie mes coéquipiers de laboratoire ainsi que les stagiaires : Pascal Lapierre, Kathie Béland, Catherine Habel, Gabriel Marceau, Joël, Cindy et Aurore. Ces personnes ont apporté une ambiance agréable et chaleureuse au laboratoire et m'ont permis de me sentir chez moi. Un merci particulier à Pascal Lapierre et Kathie Béland, pour l'apprentissage des différentes techniques, leur soutien et leur compréhension tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je tiens à remercier ma famille, spécialement ma petite sœur Mélanie, qui m'a donné la motivation et la détermination pour accomplir ma maîtrise.

Merci

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Système immunitaire

Le corps humain a acquis au cours de l'évolution un système pour contrer l'invasion des organismes pathogènes présents dans l'environnement : le système immunitaire. Ce dernier a co-évolué avec les microorganismes et a bâti des mécanismes de défense et de reconnaissance de soi afin de protéger l'organisme. Parmi ces systèmes, nous notons l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ensemble, ces deux systèmes assurent plusieurs rôles primordiaux qui sont: la reconnaissance immunologique, l'éradication de l'infection et la mémoire immunologique.

1.1.1 L'immunité innée

L'immunité innée est la première ligne de défense envers les microorganismes invasifs en assurant une réponse rapide et non spécifique. Elle occupe donc un rôle crucial dans la reconnaissance immunologique. Lorsque les barrières physiques (le mucus, la peau et son pH) sont brisées par les pathogènes, les macrophages sont les premières cellules à se rendre au site d'infection. Ils détruisent l'agent infectieux par phagocytose et sécrètent divers cytokines pro-inflammatoires et des chemokines (molécules chemoattractants). Ces molécules sont capables d'activer et de recruter d'autres éléments au site d'infection. Parmi ces éléments, nous retrouvons le système du complément, les lymphocytes «Natural killer» (NK), les lymphocytes T et B et la grande famille des granulocytes comprenant les neutrophiles, éosinophiles et les basophiles.

Si l'envahisseur est viral, les NK sont en charge d'éliminer les cellules infectées. Ils reconnaissent l'expression altérée du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH1) à la surface des cellules infectées et procèdent à leur élimination par la relâche de granules cytotoxiques: granzymes et perforines. Les NK possèdent à leur surface des récepteurs qui ont des rôles d'activateurs ou d'inhibiteurs. L'activation des NK dépend de l'équilibre entre ces deux types de récepteurs. Lorsqu'une cellule est infectée, elle aura une diminution de l'expression du CMH1 à sa surface. Ceci créera un déséquilibre lors de

l'interaction induisant l'activation des NK menant ainsi à la destruction de la cellule infectée.

Le système du complément est un regroupement d'un ensemble de protéines plasmatiques. Ces protéines peuvent être activées localement lors d'une inflammation et interagissent ensemble afin d'aider à l'élimination des pathogènes au site d'infection. Le système du complément remplit trois rôles: 1) il facilite la phagocytose par opsonisation des microorganismes, 2) il aide au recrutement des cellules immunitaires via certains composants qui ont des propriétés chemoattractants, et 3) il est capable d'induire la lyse cellulaire par la formation de pores sur la membrane plasmique.

Dans un contexte inflammatoire, les différents types de granulocytes tels que les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles remplissent chacun des rôles spécifiques. Les neutrophiles phagocytent des bactéries et des cellules apoptotiques, tandis les basophiles libèrent de l'histamine par dégranulation et induisent une inflammation locale.

La reconnaissance immunologique par les cellules de l'immunité innée se fait à l'aide de patrons structuraux et répétitifs retrouvés sur les microorganismes. Ces patrons se nomment «*pathogen-associated molecular patterns*» (PAMPs) et sont reconnus par les «*patterns recognition receptors*» (PRRs). Les «*Toll-like receptors*» (TLR) sont des bons exemples de PRRs. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules et dans les endosomes. Ils sont responsables de la reconnaissance de certaines structures bactériennes et virales telles que les lipopolysaccharides ou LPS (TLR4), les flagellines (TLR5), ARN double brin (TLR3) et simple brin (TLR7). L'activation des TLR induit la sécrétion de diverses cytokines et chemokines. En résumé, l'immunité innée est un mécanisme de défense rapide et non spécifique servant à éliminer les pathogènes avant que ces derniers ne s'établissent.

1.1.2 L'immunité adaptative

Comparativement au système inné, l'immunité adaptative monte une réponse spécifique via la présentation d'antigène par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et l'activation des lymphocytes T et B.

Les CPA, composées principalement des cellules dendritiques (DC), sont la clé de la liaison entre l'immunité innée et adaptative. Ces cellules phagocytent et présentent les antigènes en association avec CMH aux lymphocytes T. L'interaction entre le complexe CMH/peptide et le récepteur T (TCR) des CPA et des lymphocytes T CD4⁺ induit l'activation de ces derniers.

Selon l'origine de l'infection, une réponse à médiation cellulaire (Th1) ou une réponse plutôt humorale (Th2) peut être induite. Une réponse Th1 implique l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et la sécrétion des cytokines interleukine-2 (IL-2), interféron- γ (IFN- γ) et « *tumor necrosis factor-alpha* » (TNF α). Cette réponse permet d'éliminer une infection intracellulaire en tuant les cellules infectées par cytotoxicité. Dans le cas d'une invasion extracellulaire comme certaines bactéries ou parasites, une réponse humorale ou Th2 est induite. Dans cette circonstance, les lymphocytes T CD4⁺ activés secrètent de l'IL-10, IL-4, IL-5 et IL-13 pour activer les lymphocytes B qui vont se différencier en plasmocytes sécrétoires d'anticorps spécifiques aux microorganismes ciblés. En conséquence, le balance entre la réponse Th1/Th2 est influencée par le type d'organisme à combattre.

De plus, l'immunité adaptative est responsable de maintenir une mémoire immunologique. Cette mémoire est composée de lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et de lymphocytes B capables d'être réactivés et de monter une réponse rapide lors d'infections subséquentes par un même pathogène.

1.2 Tolérance (discrimination entre le soi et le non-soi)

Pour assurer la défense contre les microorganismes, les lymphocytes T de l'immunité adaptative doivent créer une grande diversité de récepteurs T par un phénomène appelé recombinaison somatique. Ce phénomène engendre un répertoire d'approximativement 25 millions de TCR avec différentes spécificités¹. De plus, ces récepteurs possèdent une plasticité qui leur permet une certaine flexibilité lors de la reconnaissance des pathogènes, augmentant encore plus leur diversité. Toutefois, le côté néfaste d'avoir ce potentiel de reconnaître un aussi grand nombre d'antigènes est l'existence d'une population de lymphocytes autoréactifs. Ces cellules sont aptes à reconnaître les antigènes du soi et induisent des maladies autoimmunes. Pour éviter ce problème, des mécanismes de tolérance sont mis en place afin d'éliminer ou de contrôler ces cellules autoréactives. L'ensemble de ces processus est classé en tolérance centrale et périphérique.

1.2.1 Tolérance centrale

La tolérance centrale se produit lors de la maturation des lymphocytes T dans le thymus. Les lymphocytes T naïfs subissent une sélection positive dans laquelle ils seront éliminés si leur TCR ne reconnaît pas le CMH. Par la suite, la sélection négative procède à l'élimination de tous les lymphocytes réagissant trop fortement avec des antigènes du soi. Ces antigènes sont présentés par les cellules dendritiques ou par les cellules épithéliales exprimant le facteur de transcription AIRE (*autoimmune regulator*)². AIRE est un gène primordial dans la tolérance envers le soi : sa mutation ou délétion cause une maladie autoimmune généralisée affectant plusieurs organes appelée polyendocrinopathie autoimmune de type 1 (APECED)³. Ces deux mécanismes de la tolérance centrale sont capables d'éliminer à eux seuls la plupart des lymphocytes non conformes ou autoréactifs.

1.2.2 Tolérance périphérique

La tolérance centrale ne peut être trop stringente car elle aurait comme effet de réduire grandement le répertoire de reconnaissance des lymphocytes T. En conséquence, des lymphocytes T potentiellement autoréactifs sont relâchés dans la circulation, malgré la sélection positive et négative. Ces lymphocytes T reconnaissent non seulement les pathogènes, mais aussi des autoantigènes par une réaction croisée. Afin de contrôler ces lymphocytes potentiellement autoréactifs, un autre système existe dans la périphérie: la tolérance périphérique. Ce système regroupe un ensemble de facteurs intrinsèques et extrinsèques qui agissent soit directement sur les lymphocytes ou fait intervenir un autre type de cellule régulatrice.

1.2.2.1 Facteurs intrinsèques

Parmi les facteurs intrinsèques nous retrouvons l'ignorance et l'anergie. La plus simple façon de prévenir l'activation des lymphocytes T autoréactifs est d'éviter l'accès à leur autoantigène. Ces derniers peuvent être séquestrés comme des composants intracellulaires ou présents dans des sites difficilement accessibles pour le système immunitaire tel que le système nerveux central. De plus, la quantité d'autoantigène disponible peut ne pas être suffisante pour atteindre le seuil d'activation des lymphocytes T⁴.

Lors de l'interaction entre le complexe CMH-peptide et le TCR, un phénomène d'anergie peut se développer. L'anergie est définie par un état non-fonctionnel ou une activation incomplète des lymphocytes T. Celle-ci est causée soit par un manque de costimulation via CD80 et CD86, soit par un signal d'inhibition fourni par le récepteur d'antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) ou par le récepteur de mort cellulaire programmée 1 (PD-1)⁵. L'importance de ces deux récepteurs dans la tolérance est illustrée par des souris déficientes pour chacun des deux récepteurs. Ces souris développent un syndrome lymphoprolifératif très sévère, suivi d'une autoimmunité massive qui attaque plusieurs organes à la fois⁶.

Enfin, un des facteurs intrinsèques le plus efficace pour l'élimination des lymphocytes T autoréactifs est l'induction d'apoptose. Cette dernière est activée par le mécanisme de mort cellulaire induit par activation (AICD, *activation induced cell death*) en utilisant les récepteurs Fas et son ligand. Tout comme pour les récepteurs CTLA-4⁶ et PD-1⁵, une mutation des gènes Fas engendre une lymphoprolifération massive⁷. Ceci démontre l'implication de ce récepteur dans le maintien de la tolérance périphérique.

1.2.2.2 Facteurs extrinsèques : Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs sont les facteurs extrinsèques les plus importants. Cette population de cellules reconnue comme des lymphocytes T CD4⁺, CD25⁺ et Foxp3⁺ représentent 5 à 10% des lymphocytes T CD4⁺ et ils sont importants dans le contrôle des lymphocytes T autoréactifs. L'implication des Tregs dans l'autoimmunité est prouvée par différentes études dans lesquelles leur déplétion engendre des maladies autoimmunes et des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD), incluant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse^{8,9}. De plus, il a été montré qu'un transfert de splénocytes déplétés en lymphocytes T CD4⁺ et CD25⁺ dans des souris syngéniques provoque l'apparition de plusieurs maladies autoimmunes, mais quand des lymphocytes régulateurs sont co-injectés aucune de ces maladies ne se développent¹⁰.

Plus précisément, le potentiel régulateur des Tregs est attribué à l'expression de Foxp3. Ce dernier est un régulateur transcriptionnel qui joue un rôle crucial dans le fonctionnement et le développement des Tregs. Ceci a été montré par des études dans lesquelles les patients qui possèdent des mutations dans la région «*forkhead*» du gène Foxp3 ont une maladie nommée IPEX (*immune disorder, polyendocrinopathy, enteropathy, x linked syndrome*)^{11,12}. L'IPEX est un syndrome avec des manifestations autoimmunes multiples. Il est caractérisé par l'apparition précoce du diabète de type 1 (DT1), d'entéropathie sévère, d'eczéma, d'anémie, de thrombocytopénie et d'hypothyroïdie et cause la mort chez la population pédiatrique dès les premières années de vie¹².

La suppression des lymphocytes T autoréactifs par les Tregs se fait par contact direct ou en utilisant des facteurs solubles. Plusieurs évidences supportent le rôle du récepteur CTLA-4 pour expliquer la capacité suppressive des Tregs. Premièrement, CTLA-4 est exprimé constitutivement à la surface des Tregs naturels¹³. Deuxièmement, le blocage de CTLA-4 chez les souris avec des anticorps monoclonaux provoque l'apparition de plusieurs maladies autoimmunes organe-spécifique^{13,14}. Finalement, une déficience dans l'expression de CTLA-4 dans les Tregs mène au développement de maladies autoimmunes et d'une lymphoprolifération. Ces symptômes sont similaires aux souris *foxp3* déficientes¹⁵. Le mécanisme d'action de CTLA-4 passe par la modulation négative des fonctions des CPA. En effet, il a été démontré que les Tregs provenant des souris sauvages sont capables d'inhiber l'expression des co-récepteurs CD80 et CD86 chez les cellules dendritiques^{15,16}. Par ailleurs, la liaison de CTLA-4 à CD80 ou CD86 induit l'activation du facteur de la transcription immuno-régulateur Foxo3 qui inhibe la sécrétion des cytokines par les cellules dendritiques¹⁷.

D'autres mécanismes de suppression faisant usage de facteurs solubles sont aussi utilisés par les Tregs. Afin de contrôler les cellules T autoréactives, les Tregs peuvent sécréter des cytokines immunosuppressives telles que les IL-10, TGF- β (*transforming growth factor*), et IL-35. Ces cellules régulatrices ont la capacité de priver les autres lymphocytes de cytokines essentielles comme IL-2¹⁸⁻²⁰. En résumé, la tolérance centrale et périphérique agissent ensemble afin d'éviter les maladies autoimmunes tout en maintenant un large répertoire de reconnaissance antigénique contre les pathogènes.

1.3 Le foie

Le foie est le plus gros organe du corps et en raison de son emplacement anatomique, il joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie générale. Connue pour ses nombreuses fonctions métaboliques de synthèse, de stockage et de détoxification, le foie est constamment exposé à une multitude d'antigènes alimentaires et de microorganismes provenant du système veineux gastro-intestinal et de la rate. Plus de 30%

(1 500ml/min.) du sang total passe à travers le foie à chaque minute²¹. Cette quantité de sang entre dans le parenchyme hépatique et passe à travers les sinusoides, qui sont de petits vaisseaux ramifiés. Le faible diamètre des sinusoides diminue grandement le débit sanguin permettant ainsi une interaction plus intime entre les lymphocytes T et les cellules hépatiques²² (figure 1). Pour ces raisons, le foie doit donc posséder des mécanismes le permettant de tolérer les antigènes provenant de la microflore intestinale, tout en montant une réponse immunitaire contre des microorganismes pathologiques.

1.3.1 Constitution et fonction

Le foie est composé en majorité d'hépatocytes (60%), mais aussi d'autres types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer, les cellules de l'épithélium biliaire, les cellules étoilées, les cellules dendritiques et les lymphocytes intrahépatiques. Tous ces types cellulaires remplissent des fonctions spécifiques dans le foie afin d'assurer son bon fonctionnement. Soixante-dix pourcent de la surface des hépatocytes est en contact avec le flux sanguin à l'aide des microvillosités de leurs membranes qui passent par les pores fenestrés des cellules endothéliales de la paroi des sinusoides²³. Les pores fenestrés jouent un grand rôle car ils permettent l'interaction entre les cellules du système immunitaire et les hépatocytes via l'espace de Disse (figure 1).

La constitution cellulaire immunitaire du foie diffère grandement de celle retrouvée dans la périphérie. En effet, contrairement au sang périphérique, le foie contient en majorité de lymphocytes non conventionnels catégorisés en deux populations : cellules NK et NKT (60%) qui ont un rôle primordial dans l'immunité du foie. Par ailleurs, les lymphocytes T et B ne représentent que 40% des cellules retrouvées dans le foie. On remarque aussi une plus grande fréquence de lymphocytes T CD8+ que de lymphocytes T CD4+. À part les cellules immunitaires, le foie contient aussi une population résidente de CPA qui sont les cellules de Kupffer, les macrophages dérivées de monocytes de la moelle osseuse, les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSEC) et les cellules dendritiques hépatiques résidentes²⁴.

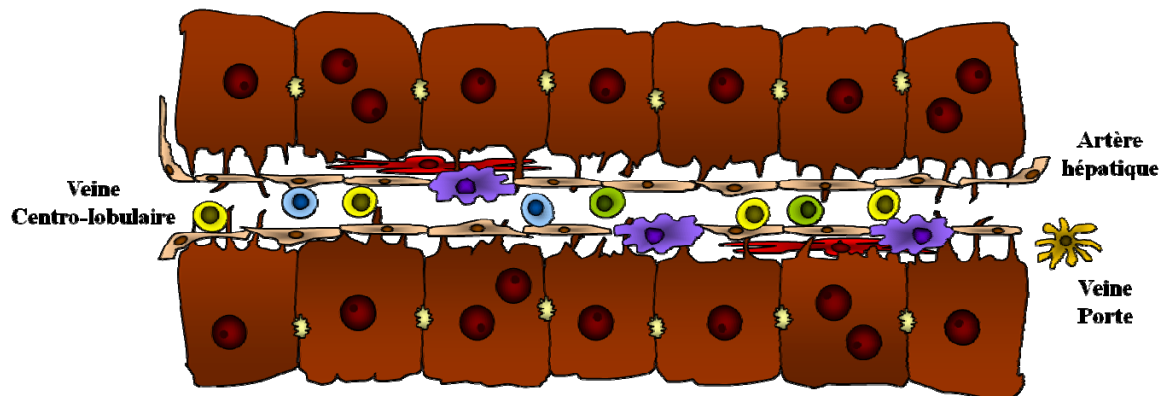


Figure 1 : Sinusoïdes hépatiques. Le sang traversant le foie passe à travers de petits sinusoides ralentissant le flux sanguin ce qui permet une plus longue interaction entre les lymphocytes et les CPA. Les hépatocytes, à l'aide de leurs prolongements passent à travers les pores fenestrés des cellules endothéliales tapissant les parois des sinusoides. Lymphocytes T (bleu), cellules NK (jaune), cellules NKT (vert), cellules de Kupffer (violet) et cellules de Ito (rouge). Figure adaptée de Lapierre et al²⁴.

1.3.2 La tolérance immune du foie

Plusieurs expériences en transplantation supportent l'idée que le foie est un organe de tolérance. Par exemple, la greffe simultanée d'un foie et d'un rein provenant d'un même donneur augmente la chance de survie des reins chez le receveur en comparaison à un greffe de rein seul²⁵. Ceci prouve que le foie a la capacité d'atténuer la réponse immunologique de l'hôte contre le greffon. Une autre étude a montré la nécessité des lymphocytes hépatiques dans la réussite d'un greffe de foie chez le rat. L'étude montre qu'une irradiation des lymphocytes hépatiques, mais pas des hépatocytes, engendre le rejet du foie. Tandis qu'avec un foie non irradié, l'organe survit indéfiniment²⁶.

Au niveau cellulaire, il a été montré que plusieurs lignées cellulaires isolées à partir du foie telles que les NK, NKT, les LSEC et les cellules de Kupffer ont le potentiel d'induire une tolérance. En effet, le transfert de NKT chez des souris NOD dans laquelle le nombre de NKT est réduit prévient l'apparition d'une encéphalomyélite autoimmune²⁷⁻²⁹. Par ailleurs, les souris qui ont une déficience CD1, donc incapables d'activer les NKT, manifestent une plus grande sensibilité aux infections bactériennes^{30,31}.

Les cellules de Kupffer produisant de TNF- α et IL-10, ont la capacité d'inhiber l'expression du CMHII chez les LSEC et les DC hépatiques et de réduire l'activation des lymphocytes T^{27,29}. De plus, la tolérance systémique aux antigènes dans la veine porte dépend des cellules de Kupffer car l'inhibition de ces cellules par du chlorure de gadolinium empêche le développement de la tolérance³². Cependant, les cellules de Kupffer jouent un rôle de premier plan dans l'immunité innée du foie. En effet, l'activation des cellules de Kupffer dans un contexte inflammatoire régule la différenciation des NKT et l'expansion des NK qui sécrètent à leur tour de l'IFN- γ ³³.

Dans le cas des LSEC, la présentation d'antigène dans un contexte non inflammatoire provoque la tolérance au lieu de l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+^{34,35}. Ces études montrent qu'une coculture des cellules CD8+ avec des LSEC n'induit qu'une faible sécrétion d'IL-2 et IFN- γ , ainsi qu'une réduction de la cytotoxicité et une diminution de la prolifération des lymphocytes T CD8+. Quand les LSEC se retrouvent dans un contexte inflammatoire, ils réduisent leur expression du CMHII et leur capacité tolérogénique²².

En conclusion, le foie occupe une place importante dans l'organisme car cet organe a la capacité non seulement d'induire une réponse immunitaire robuste contre les microorganismes pathogéniques mais aussi d'induire la tolérance envers les antigènes alimentaires ou provenant de la flore intestinale. Le choix entre ces deux mécanismes dépend du contexte d'inflammation dans le foie qui va être orchestré par les différents types cellulaires.

1.4 Hépatite autoimmune (HAI)

1.4.1 Historique

L'historique de l'hépatite autoimmune remonte à 1947 quand le groupe de Kelsall et al. a surnommé la maladie «hépatite chronique»³⁶. Trois ans plus tard, Waldenström et al. ont été les premiers à décrire une forme d'hépatite chronique chez les jeunes femmes³⁷. À

partir de cette époque, d'autres études sur la maladie ont mené à de multiples découvertes dont ceux des autoanticorps anti-nucléaire, ce qui a changé l'appellation de l'hépatite chronique à «hépatite lupoïde»³⁸. C'est en 1965 que le terme «Hépatite autoimmune» a été établi par Mackay et al. lors d'une conférence internationale³⁹. Entre les années 1970 et 80, on a identifié plusieurs anticorps chez les patients atteints d'HAI dirigés contre des protéines solubles du foie. Plus tard, les différents autoantigènes ciblés par les autoanticorps ont pu être mis en évidence.

1.4.2 Caractéristiques

L'HAI est une maladie chronique progressive du foie dont l'étiologie reste encore inconnue à ce jour. Cependant, nous pensons que cette maladie est multifactorielle impliquant des facteurs génétiques et environnementaux. Elle est caractérisée par une perte de tolérance envers certaines protéines du foie menant à des infiltrations lymphocytaires qui causent la destruction du parenchyme hépatique^{24,39-41}. L'évolution de la maladie est très fluctuante passant par des périodes d'activation et de rémission⁴⁰. Les traitements conventionnels actuellement disponibles sont l'utilisation d'immunosuppresseurs non-spécifiques afin de contrôler l'inflammation⁴²⁻⁴⁴.

À ce jour, on retrouve deux types d'HAI classés selon les autoanticorps présents dans les sérums des patients atteints de cette maladie. Dans le cas du type 1, nous retrouvons des anticorps anti-muscle lisse (anti-SMA) et/ou les anticorps anti-noyau (anti-ANA). Les patients avec l'HAI de type 2 ont dans leurs sérums des autoanticorps anti-microsome de foie et de rein de type 1 (anti-LKM1) et /ou des autoanticorps anti-cytosol de type 1(anti-LC1)⁴⁰ (Tableau 2).

1.4.2.1 Diagnostic

Le diagnostic de la maladie est difficile car plusieurs signes cliniques et biochimiques se manifestent de façon hétérogène et confondante. En effet, lors de la manifestation de la maladie, le patient peut montrer des symptômes non-spécifiques tels

que la fatigue, l'anorexie, léthargie, des douleurs abdominales et la nausée. Le médecin doit soupçonner la présence d'HAI lorsqu'il y a présence d'hépatomégalie, de splénomégalie et d'ictère⁴⁵. Pour y arriver, il doit exclure d'autres maladies du foie comme les hépatites B et C, la cirrhose biliaire primitive, la cholangite sclérosante primitive ou la maladie de Wilson. Il doit aussi se baser sur des critères plus spécifiques à l'HAI: une élévation des transaminases, une hypergammaglobulinémie de type IgG, la présence d'autoanticorps, la présence de maladie auto-immune extra-hépatique et des gènes de susceptibilité. Malheureusement, dans de nombreux cas, l'intervalle de temps entre l'apparition des premiers symptômes et la confirmation du diagnostic est trop long mettant ainsi à risque la vie des patients.

Pour cette raison, le groupe international d'hépatite auto-immune (IAIHG) a défini un système de diagnostic plus efficace⁴⁶. Dans ce système, l'IAIHG a émis différents pointages positifs ou négatifs selon certains paramètres précis servant au diagnostic d'HAI. Ces paramètres incluent le sexe du patient, le ratio de transaminases dans le sérum (ALT: AST/ GGT), le niveau d'immunoglobuline sérique, le titre des différents autoanticorps spécifiques pour l'HAI (anti-ANA, anti-SMA et anti-LKM1), et l'histologie du foie. D'autres critères non spécifiques sont aussi inclus dans ce système tel que l'absence de consommation d'alcool ou la prise d'autres médicaments susceptibles d'induire des dommages hépatiques. La présence d'une séropositivité pour d'autres autoanticorps (anti-SLA/LP, anti-actine, anti-LC1) doit être considérée. Selon le nombre de points accumulés, un patient est atteint très probablement d'HAI quand il est à 15 points et plus avant un traitement et ce pointage monte à 17 points s'il y a réponse au traitement immunosuppresseur (Tableau 1).

HAI	Autoanticorps	Autoantigènes	Maladies auto-immunes extra-hépatique
Type 1	SMA ANA	filament d'actine ADN centromères ribonucléoprotéines cycline A histones	colite ulcéreuse maladie de Crohn vascularite arthrite thrombocytopénie alvéolite fibrosante l'anémie hémolytique
Type 2	LKM1 LC1	CYP2D6 FTCD	entéropathie auto-immune thyroïdite diabète vitiligo syndrome lymphoprolifératif auto-immun

Tableau 1 : Association des deux types d'HAI avec leurs autoanticorps/autoantigènes ainsi que les différentes maladies autoimmunes extra-hépatiques qui leur sont associées.

1.4.2.2 Prévalence

La prévalence de l'HAI dans le monde est grandement influencée par l'emplacement géographique et la susceptibilité génétique des différents groupes d'individus. En se basant sur les données limitées, il y avait 1.9 cas par 100 000 habitants par année dans la population norvégienne⁴⁷ et 1 sur 200 000 personnes aux États-Unis⁴⁸. De plus, au sein de la population caucasienne d'Amérique du Nord et d'Europe du Nord, 20% des cas d'hépatite chronique sont dus à l'HAI, tandis que ce pourcentage est réduit à 5-10% chez les Brésiliens⁴⁹. L'HAI peut survenir à tout âge, mais elle est avant tout une maladie pédiatrique. En effet, 40% des cas diagnostiqués d'HAI de type 1 surviennent

avant l'âge de 18 ans et ce pourcentage monte jusqu'à 80 % dans le cas d'HAI de type 2^{40,45}. Une prédominance féminine est aussi notée dans l'HAI de l'ordre de 3 à 4 pour l'HAI de type 1 et de 8 à 9 : 1 pour le type 2⁴⁵.

1.4.3 Pathogenèse et classification

1.4.3.1 Hépatite auto-immune de type 1

L'HAI type 1 est caractérisée principalement par la présence de deux types d'autoanticorps non spécifiques capables de reconnaître plusieurs composants cellulaires. L'ANA a été le premier à être décrit³⁸ et il cible plusieurs composants du noyau dont l'ADN double brin⁵⁰, les lamines A, B et C⁵¹, les chromatines et les ribonucléoprotéines⁵². Un autre anticorps présent chez les patients atteints d'HAI de type 1 est le SMA, qui a été premièrement observé chez les patients avec l'HAI⁵³ mais aussi dans certaines maladies malignes et virales⁵⁴⁻⁵⁷. La cible principale du SMA est le filament d'actine⁵⁸.

D'autres autoanticorps peuvent aussi être retrouvés et servent pour la plupart à aider au diagnostic d'HAI de type 1. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les autoanticorps anti-cytoplasme de neutrophiles (anti-ANCA) et les autoanticorps contre le récepteur de l'asialoglycoprotéine (anti-ASGP-R). Le récepteur de l'asialoglycoprotéine est une glycoprotéine spécifique du foie, localisé aux membranes cellulaires. Les anticorps dirigés contre cet antigène sont retrouvés chez plus de 88% des patients avec HAI⁵⁹, mais aussi dans l'hépatite B et C, les maladies alcooliques du foie et la cirrhose biliaire primitive (PBC). Les ANCA sont retrouvés chez 65-96% des sérums des patients avec HAI de type 1^{60,61}. Les deux antigènes majeurs reconnus par les ANCA sont la myéloperoxydase et la protéinase 3⁴⁹.

Il existe un autre type d'autoanticorps qui peut être présent dans l'HAI (de type 1 et II). Cet anticorps est dirigé contre les antigènes solubles du foie (anti-SLA), et constitue un marqueur sérologique avec une spécificité de plus de 99%⁶² pour l'HAI. Cet autoanticorps est présent chez 11 à 44% des caucasiens adultes atteints d'HAI de type 1 en Amérique du

Nord et en Europe du Nord⁶²⁻⁶⁴ et dans 18 à 44% des enfants avec HAI de type 1 et 2⁶⁴. L'antigène reconnu par l'anti-SLA est une protéine de 422 acides aminés identifiée comme une ribonucléoprotéine de transfert (tRNP^{(ser)(sec)})^{65,66}. La présence d'anti-SLA chez les patients est associée à une durée de traitement plus longue, des rechutes plus fréquentes après le retrait des immunosuppresseurs et un plus haut taux de transplantation hépatique et de mortalité que chez les patients qui n'en développent pas⁶⁷⁻⁶⁹.

1.4.3.2 Hépatite auto-immune de type 2

Dans le deuxième type d'HAI, nous retrouvons des autoanticorps plus spécifiques et dont les autoantigènes ont été identifiés et bien caractérisés. L'anticorps anti-microsome de foie et de rein de type 1 (anti-LKM1) est l'autoanticorps spécifique pour le diagnostic d'HAI de type 2. Il a été décrit pour la première fois en 1973 par l'équipe de Rizzetto et al⁷⁰. Plus tard, l'autoantigène de l'anti-LKM1 a été identifié comme étant le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6), une protéine de 48 kD⁷¹. Des études approfondies sur CYP2D6 ont mené à la découverte de trois épitopes linéaires majeurs reconnus par l'anti-LKM1. La séquence CYP2D6₁₉₃₋₂₁₂ est reconnue chez 93% des patients, CYP2D6₂₅₇₋₂₆₉ à 85% et CY2D6₃₂₁₋₃₅₁ à 53%⁷². L'anticorps anti-cytosol de type 1 (anti-LC1) est considéré comme un marqueur secondaire d'HAI de type 2. Il est dirigé contre la formiminotransférase cyclodéaminase (FTCD), une enzyme cytosolique impliquée dans la conversion de l'histidine en acide glutamique. Les anticorps anti-LC1 reconnaissent plusieurs épitopes conformationnels sur la partie formiminotransférase⁷³ et des épitopes linéaires localisés dans la partie C-terminale. Deux épitopes majeurs sont reconnus aux positions 428-434 et 440-447 dans la FTCD humaine⁷⁴. Il faut noter que ces autoanticorps ne sont pas nécessairement retrouvés simultanément chez un même patient. Par exemple, dans 50% des patients atteints d'HAI de type 2, l'anti-LKM1 est le seul anticorps détectable. En comparaison, l'anti-LC1 est associé à l'anti-LKM1 dans 40% des cas, mais peut aussi être le seul marqueur sérologique dans 10% des patients^{45,75,76}.

Malgré l'efficacité de la détection des autoanticorps pour le diagnostic et la classification de l'HAI, leur rôle pathogénique n'a pas été élucidé, mais ne semble pas être important dans la pathogénèse de cette maladie car les autoantigènes reconnus sont des protéines intracellulaires.

Paramètres/caractéristiques	Pointage		
		>60g/jour	-2
Sexe femme	+2	Histologie du foie	
Ratio ALP:AST(ouALT)		Hépatite d'interface	+3
<1.5	+2	Infiltrat à prédominance lymphocytaire	+1
1.5-2.0	0	Rosettes sur cellules du foie	+1
>3.0	-2	Aucune de ces réponses	-5
IgG sérique (fois au dessus la normale)		Changement biliaire	-3
>2.0	+3	Autres changements	-3
1.5-2.0	+2	Autres maladies autoimmunes	+2
1.0-1.5	+1	Paramètres additionnels (optionels)	
<1.0	0	Séropositivité pour d'autre autoanticorps	
ANA, SMA ou LKM-1 (titre)		(ant-SLA/SP, actine, LC1, ASGPR, p-ANCA)	+2
>1:80	+3	HLA DR3 ou DR4	+1
1:80	+2	Réponse au thérapie	
1:40	+1	Complète	+2
<1:40	0	Rechute	+3
Positif pour AMA	-4		
Marqueurs d'hépatite virale		Interprétation	
Positif	-3	Pré-traitement	
Négatif	+3	HAI	>15
Historique d'utilisation de drogue		HAI probable	10-15
Positif	-4	Post-traitement	
Négatif	+1	HAI	>17
Consommation d'alcool		HAI probable	12-17
<25g/jour	+2		

Tableau 2 : Système de diagnostic du groupe international d'hépatite autoimmune.
Tableau adapté d'Alvarez et al.⁷⁷

1.4.3.3 Susceptibilité génétique

Comme plusieurs maladies autoimmunes, l'HAI est grandement influencée par des facteurs génétiques. Ces facteurs affectent la susceptibilité des individus au développement de la maladie et peuvent aussi avoir des répercussions sur la présentation des symptômes et la réussite du traitement.

Dans l'HAI de type 1, la susceptibilité est liée aux gènes DRB1 de l'HLA humain. Le DRB1*0301 est le principal l'allèle de susceptibilité, tandis que le DRB1*0401 est considéré comme un facteur secondaire. Par contre, ce dernier est un facteur de

susceptibilité indépendant au sein de la population caucasienne d'Amérique du Nord et d'Europe du Nord⁷⁸. En effet, plus de 85% des patients atteints d'HAI de type 1 ont le DRB1*0301 ou DRB1*0401 ou les deux⁷⁹. Cependant, ces allèles de susceptibilité sont différents dans d'autres nationalités. Dans la population japonaise, le principal allèle est le DRB1*0405^{80,81}. Chez les Argentins, la susceptibilité est aussi associée à DRB1*0405 chez les adultes, mais chez les enfants c'est l'allèle DRB1*1301 qui est impliqué^{82,83}. Le principal allèle de susceptibilité chez les Mexicains est le DRB1*0404⁸⁴ et chez les Brésiliens, nous retrouvons les gènes DRB1*13 et DRB1*03^{85,86}.

Peu d'études ont été réalisées sur la susceptibilité génétique pour l'HAI de type 2 à cause de la faible prévalence de la maladie. Chez la population brésilienne, par exemple, le gène DRB1*07 serait impliqué⁸⁶. Dans notre population pédiatrique (CHU Sainte-Justine), l'HLA-DRB1 est associé à l'HAI de type 1 et l'HLA-DQB1 à l'HAI de type 2⁸⁷. Dans les mêmes patients, le locus HLA-DR est associé à la production d'un type particulier d'anticorps et l'HLA-DQ est critique pour le développement de l'HAI de type 2⁸⁸.

Ces différences génétiques ont une influence sur la présentation de la maladie et la réponse aux traitements. Par exemple, les patients atteints d'HAI de type 1 avec l'allèle DRB1*0301 sont plus jeunes et répondent faiblement aux corticostéroïdes comparativement aux patients possédant l'allèle DRB1*0401. Par conséquent, le taux de rémission de ces patients est faible et la nécessité d'une transplantation est beaucoup plus élevée. Contrairement au DRB1*0301, les patients avec le gène DRB1*0401 sont plus vieux, ont une plus grande chance de développer d'autres maladies autoimmunes et répondent mieux au traitement avec un haut taux de rémission^{89,90}.

1.4.3.4 Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux ont été suggérés comme facteurs déclenchant de l'HAI. Ces facteurs peuvent provenir de plusieurs origines, tant d'infections virales que de produits chimiques. En effet, certains modèles murins d'HAI utilisent des produits chimiques comme la concanavaline A ou l'adjuvant de Freund pour le déclenchement

d'une hépatite⁹¹. Le principe repose sur l'activation non spécifique des lymphocytes T incluant les lymphocytes T autoréactifs qui vont induire des lésions au foie. D'autres études ont montré que l'infection par des virus hépatotropes peut induire l'HAI par la lyse des hépatocytes qui relâchent des autoantigènes intracellulaires normalement séquestrés⁴¹. Ceci permet l'activation de lymphocytes T autoréactifs présents au site d'inflammation et de produire une réponse immunitaire contre les autoantigènes reconnus. Une autre hypothèse nommée « mimétisme moléculaire » est aussi proposée dans laquelle une réaction croisée surviendrait à cause de similarité moléculaire entre une molécule du soi et un antigène étranger (principe décrit plus bas).

1.5 Modèles animaux d'hépatite autoimmune

Les traitements actuellement disponibles pour les patients atteints d'HAI consistent en une immunosuppression globale à l'aide d'une combinaison d'immunosuppresseurs. Afin de trouver d'autres alternatives de traitement plus spécifiques et ayant le moins possible d'effets secondaires, des modèles animaux ont dû être développés. Ils sont aussi nécessaires pour comprendre la pathogénèse, l'évolution et la perpétuation de cette maladie autoimmune. Depuis la découverte de l'HAI, plusieurs modèles murins ont été produits. Toutefois, comme on peut le constater dans la description qui suit, tous ces modèles ont certains défauts et ne représentent pas de façon fidèle les critères retrouvés dans l'HAI chez l'homme. Ces modèles manquent certaines caractéristiques typiques de la maladie soit sur le plan de la chronicité de la maladie, la prédominance féminine, la présence d'autoanticorps et/ou d'autoantigènes, l'élévation des transaminases, les niveaux d'inflammation intrahépatique ou l'organo-spécificité de l'inflammation. La difficulté d'obtenir un bon modèle murin dans le cas de l'HAI est en partie causée par la capacité de régénération rapide du foie chez les souris et les rats. En effet, il est connu que les foies de ces animaux ont la capacité de se régénérer et de retourner à une forme normale même après avoir supprimé les deux tiers de l'organe. De plus, l'équipe de Sandgren et al. a montré qu'une reconstitution complète du foie était possible à partir d'une quantité limitée

d'hépatocytes.⁹² Cette caractéristique peut expliquer en partie la difficulté à observer une atteinte hépatique, comme le développement d'une fibrose portale, chez la souris. L'hépatite est induite dans les modèles décrits par l'administration de substances chimiques ou biologiques ou dans d'autres cas par l'usage de souris transgéniques exprimant un néo-antigène dans le foie^{91,93-98}.

1.5.1 Modèles chimiques et biologiques

1.5.1.1 Modèle S-100

Un des premiers modèles d'HAI chez la souris est le modèle S-100^{94,95,99,100}. Ce modèle a été décrit premièrement par Mori et al., qui a réussi à induire une hépatite expérimentale suite à une immunisation intrapéritonéale des souris C57BL/6 avec le surnageant d'une préparation d'homogénat de foie syngénique. Ce surnageant a été préparé par centrifugation à 100 000g (S-100) en combinaison avec l'adjuvant de Freud complet (CFA). Plus tard, une caractérisation complète de ce modèle a été réalisée par Lohse et al.^{95,101}. Ils ont montré que l'hépatite engendrée n'était que transitoire avec une durée de moins de 6 mois. Le pic de l'hépatite et l'augmentation modérée des transaminases sont observables à partir de 4 semaines post-traitement. Une inflammation périvasculaire avec nécrose des hépatocytes est observée dans l'histologie des foies. L'influence du bagage génétique a aussi été montrée dans ce modèle car la souche C57BL/6 est plus susceptible à développer une hépatite après l'injection que les souches BALB/C et C3H⁹⁴. De plus, des autoanticorps dirigés contre les protéines solubles du S-100 ont été retrouvés¹⁰¹. Une autre étude menée par le même groupe a permis de montrer la présence de lymphocytes T régulateurs dans les rates des souris vaccinées⁹⁵. Ces cellules régulatrices sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T autoréactifs contre les protéines de S-100¹⁰². Ce modèle semblait être parfait pour l'étude de l'HAI. Toutefois, une autre étude montre que l'injection de CFA seul induirait une hépatite similaire à celle du S-100, rendant ainsi ce modèle invalide.¹⁰³

1.5.1.2 Concanavaline A

La concanavaline A (ConA) est une lectine mitogénique capable d'activer de façon non-spécifique les lymphocytes provoquant une relâche massive de cytokines. C'est l'équipe de Tiegs et al. qui fut la première à étudier l'effet direct du ConA chez les animaux⁹¹. Dans cette étude, une administration de 1.5mg/kg de ConA par voie intraveineuse (i.v.) chez les souris induit une augmentation des transaminases et une hépatite expérimentale dans les 8 heures suivant l'injection. L'augmentation des transaminases dans le sérum est dose-dépendante. L'effet du ConA est organe-spécifique car on ne retrouve pas de dommages extra-hépatiques. Un examen des foies à la microscopie électronique a permis d'observer une accumulation de macrophages en association avec des lymphocytes au bout de 4 heures post-traitement et une destruction du parenchyme hépatique après 8 heures. Selon les auteurs, l'hépatotoxicité pourrait être expliquée par le mécanisme d'action du ConA qui se lie au CMH des macrophages et active de façon non-spécifique des lymphocytes T induisant ainsi la destruction des hépatocytes. L'implication des lymphocytes T dans ce modèle est confirmée par l'absence de dommages hépatiques lors de l'injection du ConA chez les souris athymiques ou SCID (Severe Combined Immunodeficiency)⁹¹. De plus, un prétraitement avec des immunosuppresseurs tels que la cyclosporine ou le FK 506 réussit à prévenir l'hépatite induite par la ConA. Ce modèle animal présente certaines similitudes avec l'HAI, telles l'implication des lymphocytes T dans l'hépatotoxicité et l'utilisation des immunosuppresseurs comme traitement. Cependant, à cause de la différence observée dans l'histologie des foies et à défaut de trouver des autoanticorps/autoantigènes spécifiques, ce modèle ne représente pas de façon fidèle l'HAI retrouvée chez les patients.

1.5.2 Modèles transgéniques

1.5.2.1 Souris IFN- γ

L'équipe de Toyonaga et al. a développé un modèle de souris transgénique présentant une inflammation hépatique chronique via l'expression spécifique au foie d'IFN- γ ¹⁰⁴. L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire apte à activer les lymphocytes T. Son expression continue dans un organe spécifique doit donc engendrer la destruction de ce dernier. Dans ce modèle, l'expression d'IFN- γ est sous le contrôle du promoteur de la protéine sérique d'amyloïde (SAP), un promoteur spécifique du foie. Ces souris transgéniques présentent une augmentation graduelle des transaminases et d'IFN- γ dans les sérums. Ces derniers augmentent de façon proportionnelle avec les dommages hépatiques observés. L'hépatite commence à 3 semaines après la naissance par une légère inflammation intra-lobulaire. Au bout de 5 semaines, des infiltrations lymphocytaires au niveau des espaces portes sont observables. Finalement, les auteurs ont même observé de la fibrose au bout de la 26^e semaine. Ce modèle montre bien l'évolution d'une hépatite chronique et l'implication de l'IFN- γ dans la chronicité de l'HAI. Mais tout comme le modèle de la ConA, on ne retrouve pas d'autoanticorps ni d'autoantigènes spécifiques qui s'avèrent une caractéristique majeure de l'HAI.

1.5.2.2 Souris Alb-GP-33

Un modèle de souris transgénique a été généré par l'équipe de Vohringer et al. en exprimant l'épitope majeur CD8+ de la glycoprotéine 33 (Gp33) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) dans le foie des souris sous le contrôle du promoteur d'albumine (Alb-Gp33)¹⁰⁵. L'évaluation de l'expression du Gp33 dans différents organes a montré que la protéine n'était pas seulement exprimée dans le foie, mais aussi dans le thymus. Par conséquent, une délétion clonale de plus de 90% des lymphocytes T reconnaissant le Gp33 dans le thymus a été constatée par les auteurs. Comme la délétion était incomplète, l'équipe a voulu induire une hépatite autoimmune. Deux tentatives ont été

réalisées soit 1) en transférant des lymphocytes T transgéniques dont le TCR reconnaît spécifiquement le Gp33 ou, 2) en infectant les souris Alb-Gp33 avec le LCMV. Dans les deux cas, aucune hépatite n'a été induite, suggérant que les clones T étaient probablement dans un état d'ignorance envers la protéine Gp33. Un troisième essai d'induction d'hépatite a été mis en œuvre dans lequel un croisement des souris Alb-Gp33 avec une autre souris transgénique exprimant un antigène du virus de l'hépatite B (HBsAg) a été réalisé. Ces souris sont plus sensibles aux cytokines pro-inflammatoires. Après un transfert adoptif de lymphocytes T transgéniques et une infection au LCMV, seule une hépatite transitoire a été générée. En bref, il est évident que ce modèle ne reflète pas l'HAI, mais il pourrait surtout servir comme modèle d'étude pour les mécanismes de tolérance tels que l'ignorance.

1.5.2.3 Souris invalidée pour le TGF- β 1

L'équipe de Gorham et al. a développé un modèle de souris invalidée pour TGF- β sur un fond BALB/C (BALB/C-TGF- $\beta^{-/-}$)¹⁰⁶. L'invalidation a été induite par l'interruption de l'exon 6 du gène TGF β . Ce modèle illustre bien l'importance de l'influence génétique. En effet, les auteurs ont observé une plus grande susceptibilité des souris BALB/C-TGF- $\beta^{-/-}$ à développer une hépatite spontanée et chronique que les souris contrôles sur un fond 129/CF-1(129/CF-1-TGF- $\beta^{-/-}$). Les souris BALB/C-TGF- $\beta^{-/-}$ ont un taux de survie plus court et développent une plus grande inflammation hépatique caractérisée par de vastes régions dépourvues de cellules réparties sur l'ensemble des lobules. Ces régions sont le résultat de la destruction des hépatocytes par des infiltrats lymphocytaires. De plus, l'analyse des infiltrats suggère une réponse de type Th1 par la détection d'un haut taux de lymphocytes T CD4+ sécrétant une grande quantité d'IFN- γ , mais très peu d'IL-4. Cependant, l'inflammation n'était pas organe spécifique car on retrouve aussi des lésions dans les poumons et le cœur. Enfin, aucune inflammation hépatique n'était observable chez les souris doubles déficientes pour TGF- β et IFN- γ sur fond BALB/C (BALB/C-TGF- $\beta^{-/-}$ -IFN- $\gamma^{-/-}$), montrant ainsi le rôle important que joue l'IFN- γ dans l'inflammation hépatique.

Malgré toutes les similitudes retrouvées avec l'HAI, ce modèle murin ne montre pas une prédominance féminine qui est un facteur majeur pour le diagnostic de la maladie.

1.5.2.4 Souris TTR-NP

Un des modèles développés dans notre laboratoire par Djilali-Saiah et al. consiste à injecter des plasmides d'ADN contenant une nucléoprotéine (NP) du LCMV chez des souris transgéniques exprimant la NP comme néo-antigène. L'expression de cette nucléoprotéine est sous le contrôle du promoteur de la transthyrétine (TTR)⁹⁸. Ce promoteur est spécifique au foie et a été choisi pour empêcher que le néo-antigène soit exprimé dans le thymus comme c'était le cas dans le modèle d'Alb-GP33. Pour briser la tolérance et induire l'HAI, une injection intramusculaire de deux plasmides codant pour la protéine NP et l'interleukine-12 (IL-12) murin a été réalisée. L'hépatite engendrée présente plusieurs points communs avec l'HAI : une élévation des taux d'ALT, la présence d'autoanticorps contre la NP, une prédominance des sous-classes d'anticorps anti-NP IgG2 témoignant d'une réponse Th1, des CTL spécifiques contre la NP et une inflammation hépatique à l'analyse histologique.

1.5.2.5 Modèle de HAI de type II par xénoimmunisation

1.5.2.5.1 Principe (mimétisme moléculaire)

Plusieurs hypothèses sur les mécanismes environnementaux ont été émises afin d'expliquer l'origine des maladies autoimmunes. Parmi celles-ci, on retrouve l'induction des maladies autoimmunes par une infection virale. Étant donné que la capacité de reconnaissance de la diversité des antigènes issus des microorganismes pathogéniques par les récepteurs T (TCR) nécessite une certaine flexibilité, ce dernier a aussi le potentiel d'induire l'autoimmunité par réaction croisée induite par une similitude entre un antigène du soi et un autre du non-soi. Ce phénomène porte le nom de mimétisme moléculaire. L'hypothèse du mimétisme moléculaire a été premièrement décrite par l'équipe de Fujinami et Oldstone¹⁰⁷. Dans cette étude, l'équipe a montré une similitude de 6 acides

aminés consécutifs entre la polymérase du virus de l'hépatite B (HBVP) et la protéine basique de la myéline (MBP) qui est l'antigène majeur du soi reconnu dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). L'injection du HBVP chez des lapins induit l'EAE par une réponse TH1 et TH2 lors desquelles les anticorps et les lymphocytes sont capables de reconnaître à la fois le MBP et le HBVP. D'autres études similaires supportent la théorie du mimétisme moléculaire^{108,109}. De plus, ce principe a été démontré dans plusieurs modèles animaux, par exemple, l'implication du picornavirus neurotrope du virus de Theiler encéphalomyélite murine (TMEV) dans un modèle de la sclérose en plaques (MS)¹¹⁰, la myocardite-autoimmune associée au virus coxsackie¹¹¹ et la maladie autoimmune démyélinisante associée au virus de la forêt de Semliki (SFV)¹¹². Tous les éléments mentionnés ci-haut ont permis à notre laboratoire de produire un nouveau modèle d'hépatite autoimmune de type 2. Ce modèle consiste en trois injections intramusculaires de 100µg de 2 plasmides (pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD et pVR-IL-12) à intervalles de 2 semaines chez des souris femelles C57BL/6. Cette vaccination induira l'HAI de type 2 au bout de 7 à 8 mois. Le plasmide pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD code pour les épitopes majeurs des deux autoantigènes humains reconnus dans l'HAI de type 2 (CYP2D6 et FTCD). Une partie du CTLA-4 a aussi été intégrée dans la construction du plasmide. CTLA-4 est un récepteur inhibiteur, mais nous avons utilisé seulement sa partie sécrétoire favorisant la sécrétion de la protéine chimère, ainsi permettant une plus grande présentation par les cellules dendritiques en augmentant la liaison aux récepteurs B7⁹⁸. Le deuxième plasmide, pVR-IL-12, code pour l'interleukine 12 murine, une molécule pro-inflammatoire.

1.5.2.5.2 Signes biochimiques

Ce modèle murin présente la plupart des caractéristiques au niveau biochimique retrouvées chez les patients atteints d'HAI de type 2. Premièrement, une augmentation des niveaux d'alanine aminotransférase sérique est constatée après la vaccination avec des pics aux 4^e et 7^e mois. Au niveau de l'histologie du foie, une inflammation portale, périportale et

intralobulaire est observable au bout de 7 à 8 mois post-vaccination. Cette inflammation est constituée d'infiltrats lymphocytaires composés principalement de lymphocytes T CD4+, mais des lymphocytes T CD8+ et des macrophages sont aussi présents⁹⁶. De plus, des autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1 ont pu être détectés dans les mois suivant la xénoimmunisation. Une corrélation peut être établie entre les niveaux d'ALT, les titres d'autoanticorps et les niveaux d'inflammation dans les foies des souris⁹⁶.

1.5.2.5.3 Influences génétique et du sexe

Une autre étude a permis de démontrer que les gènes du CMH et non-CMH contribuent à la susceptibilité de l'HAI de type 2 dans ce modèle murin¹¹³. En effet, en tirant avantage de la différence des gènes du CMH et non-CMH entre trois souches de souris différentes (C57BL/6, 129/sv et BALB/c), la xénoimmunisation a permis de montrer que la souche C57BL/6 est beaucoup plus susceptible à développer l'HAI de type 2. Cette souche montre une plus importante inflammation du foie, une augmentation des taux d'ALT et des titres plus élevés d'autoanticorps dirigés contre le FTCD et CYP2D6 en comparaison avec les deux autres souches. Ceci confirme l'influence génétique retrouvée chez l'humain. Une troisième étude portant sur ce modèle a permis d'éclaircir les facteurs qui déterminent la prédominance féminine dans l'HAI de type 2¹¹⁴. En effet, l'étude a montré qu'il y a un plus grand nombre de Tregs dans les PBMCs, les rates et les foies chez les souris mâles que les femelles après xénoimmunisation. De plus, cette différence de sexe ne serait pas due à une influence hormonale car des mâles castrés supplémentés en 17beta-extradiol ne sont pas aussi susceptibles que les femelles.

1.5.2.6 Modèle Alb-HA/CL4-TCR

Récemment, le groupe de Dienes et al. a tenté de créer un modèle murin d'HAI en croisant des souris BALB/C transgéniques qui expriment l'hémagglutinine de l'influenza (HA) dans le foie sous le contrôle du promoteur hépatique d'albumine (Alb-HA) avec des souris CL-TCR dont les lymphocytes T CD8+ possèdent un TCR spécifique à l'HA (ALB-HA/CL4-TCR)¹¹⁵. Des résultats surprenants ont été obtenus avec ce modèle. Premièrement,

Alb-HA est exprimé uniquement dans le foie et les auteurs ont montré qu'il n'y a pas de délétion clonale des lymphocytes T CD8+ spécifiques pour l'HA dans le thymus. Deuxièmement, l'hépatite chronique engendrée (durée de plus de 7 mois) est d'intensité modérée et n'apparaît que chez les mâles. Ceci n'est pas représentatif de l'HAI chez l'humain où on observe une prédominance féminine. On observe aussi une accumulation accrue des Tregs dans le foie et ceci est associé à une augmentation des taux d'ALT. Ce modèle d'HAI comme les autres modèles mentionnés ci-haut manque d'importants critères qui définissent l'HAI comme la présence d'autoanticorps/autoantigènes et la prédominance féminine.

1.6 Traitements conventionnels

Le traitement conventionnel pour l'HAI consiste à l'utilisation d'immunosuppresseurs afin de contrôler l'inflammation. Deux grands objectifs sont visés lors d'une thérapie qui consiste dans un premier temps à l'induction d'une rémission qui est définie comme le retour à la normale des symptômes cliniques et biochimiques c'est-à-dire, des taux normaux de transaminases ainsi que l'amélioration ou la disparition de l'inflammation au foie. Par la suite, le défi est de maintenir cette rémission sur la plus longue période possible.

1.6.1 Immunosuppresseurs

Le traitement standard est une monothérapie de prednisone ou une thérapie combinée de prednisone et d'azathioprine⁴². La prednisone est utilisée en premier lieu pour atteindre la rémission et par la suite l'azathioprine est utilisée pour la maintenance de la rémission. La prednisone est un corticostéroïde synthétique qui, une fois dans l'organisme, est métabolisée dans sa forme active: la prednisolone. La liaison de la prednisolone avec les récepteurs des corticostéroïdes à la surface des cellules va induire l'internalisation du complexe. Une fois dans le noyau, ce complexe induit la transcription des gènes anti-inflammatoires et réprime la transcription des gènes pro-inflammatoires. Le mécanisme

d'action de l'azathioprine est fort différent, ce dernier étant un analogue des purines qui est métabolisé premièrement en 6-mercaptopurine et converti enzymatiquement en acide 6-thiourique, 6-méthyl-MP et 6-thioguanine. Ces composants agissent au niveau de la transcription de l'ADN en compétitionnant avec les purines conventionnelles. Ce mécanisme d'action a un fort impact sur les lymphocytes induisant leur suppression.

La monothérapie avec la prednisone seule ou la thérapie combinée avec prednisone et l'azathioprine ont la même efficacité au niveau du traitement de l'HAI¹¹⁶. Le choix de la thérapie dépend du profil du patient à traiter. En effet, la thérapie combinée est souvent recommandée pour les personnes âgées avec ostéoporose et chez des patients avec des maladies métaboliques (diabète, obésité, hypertension), tandis que la monothérapie est utilisée chez des patients avec des maladies hématologiques et chez les jeunes enfants⁴⁹. Ces thérapies sont efficaces car 87% des patients atteignent une rémission complète de la maladie en dedans de 3 ans de traitement. Le maintien de cette rémission après l'arrêt du traitement est un défi en soi car plus de 50% des patients font des rechutes 6 mois après la fin du traitement et ce pourcentage s'élève à plus de 70 % après 3 ans⁴⁹. Seulement 17 % des patients maintiennent une rémission après l'arrêt du traitement d'une durée d'environ 2 ans.

Il existe des cas où les patients ne répondent pas aux traitements conventionnels. Donc, la rémission n'est pas atteinte après 2 ans de traitement et les symptômes cliniques et signes biochimiques persistent durant le traitement. En plus, les patients peuvent développer une intolérance aux drogues utilisées. Ces personnes peuvent recevoir d'autres médicaments immunosuppresseurs comme la cyclosporine¹¹⁷ ou le Rituximab (anticorps monoclonal contre le récepteur CD20 des lymphocytes B)⁴³.

1.6.2 Effet secondaire de chacun des immunosuppresseurs

Une utilisation prolongée des immunosuppresseurs et en particulier des doses élevées de corticostéroïdes a des effets secondaires spécifiques très graves. Dans le cas de la prednisone, les effets secondaires indésirables sont l'acné, un gain de poids et de

l'hypertension jusqu'aux complications plus graves comme le diabète, l'ostéoporose, la psychose, la dépression et la cataracte. De plus, il est connu qu'une utilisation prolongée de prednisone ou d'autres corticostéroïdes induit une atrophie des glandes surrénales du patient.⁴⁰ Ceci est causé par la régulation négative de la production naturelle de corticostéroïdes par le corps. Il faut donc faire attention de ne pas arrêter abruptement le traitement, mais de réduire graduellement la dose⁴². En ce qui concerne l'azathioprine, les effets secondaires peuvent être des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales, une hépatotoxicité, une pancréatite, et la leucopénie¹¹⁸.

Des alternatives au traitement standard sont proposées afin d'améliorer la qualité de vie des patients en évitant les effets secondaires néfastes. La cyclosporine A a été proposée comme traitement de choix pour les patients qui sont résistants aux corticostéroïdes^{44,117}. La cyclosporine est un peptide lipophile de 11 acides aminés produit par *Tolypocladium inflatum* qui agit au niveau de la signalisation calcique et inhibe la transcription d'IL-2 via NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*)⁴⁹.

Des études ont déjà été menées avec la cyclosporine seule comme agent inducteur de la rémission ou en combinaison avec la prednisone et l'azathioprine^{43,44,119}. Ces études avaient toutes comme but d'apporter de l'amélioration aux traitements conventionnels en diminuant les doses et les effets secondaires des corticostéroïdes mentionnés ci-haut et en améliorant la qualité de vie des patients atteints d'HAI. La cyclosporine a des effets secondaires graves surtout avec un usage à long terme. Dans ce cas, une néphrotoxicité peut mener à une diminution de la fonction rénale. Il est donc nécessaire d'assurer un suivi des niveaux sanguins du médicament afin de le maintenir au plus bas niveau possible tout en maintenant son efficacité. Cependant, l'usage à court terme de la cyclosporine n'entraîne pas de graves problèmes, sauf l'hypertrichose et éventuellement une hypertension artérielle réversibles. L'efficacité de la cyclosporine est comparable au traitement conventionnel. Les résultats des études montrent que la rémission est atteinte chez 69% des patients après 6 mois et 95% après 1 an de traitement^{43,119}. Le taux de cyclosporine dans le sang doivent être entre 250-300 µg/ml dans les premiers 3 mois de traitement. Après 6 mois, la

prednisone et l'azathioprine sont administrés en remplacement de la cyclosporine aux doses de 0.3-0.5mg/kg/jour et de 1 à 2mg/kg/jour respectivement. En même temps, on diminue graduellement la dose de cyclosporine sur une période de 15 jours. Une fois que la cyclosporine est arrêtée, la diminution des doses de prednisone s'en suit, mais en gardant le même dosage d'azathioprine. Les effets secondaires sont moins nombreux dû à la courte durée du traitement par la cyclosporine et une baisse des doses de prednisone utilisées¹¹⁹.

Malgré le grand taux de succès des thérapies à bases d'immunosuppresseurs, beaucoup de patients atteints d'HAI ont toujours besoin d'une transplantation hépatique. En effet, la transplantation du foie devient nécessaire quand il y a la présence d'hépatite fulminante au diagnostic de l'HAI, une insuffisance hépatique irréversible ou une insuffisance hépatique progressive. En Europe, l'HAI représente plus de 4% des transplantations hépatiques⁴⁹. Des pourcentages similaires ont été observés dans notre population pédiatrique. Une étude impliquant le suivi sur 5 ans de 25 patients après une transplantation du foie a montré que le taux de réussite était de 92%¹²⁰.

En somme, les immunosuppresseurs utilisés pour le traitement de l'HAI tels que la prednisone, l'azathioprine et la cyclosporine induisent non seulement une immunosuppression responsable d'infections opportunistes, mais engendrent aussi de graves effets secondaires néfastes spécifiques à chacun des médicaments lorsqu'ils sont utilisés sur de longues périodes. Il faut, par conséquent, trouver d'autres alternatives aux traitements conventionnels moins nocifs pour les patients avec des cibles plus spécifiques. C'est dans cette perspective qu'au cours des 20 dernières années, des immunothérapies spécifiques ont été développées pour le traitement de diverses maladies incluant les maladies d'origine autoimmune.

1.7 Immunothérapies spécifiques pour le traitement des maladies autoimmunes

Les différentes immunothérapies pour le traitement des maladies autoimmunes qui ont été développées récemment peuvent être classées en deux types : 1) Induction de la tolérance par administration d'autoantigènes spécifiques par voie intranasale, 2) contrôle du processus d'inflammation par déplétion spécifique des sous-populations lymphocytaires. Cette voie fait référence aux usages des anticorps déplétants comme les anticorps anti-CD3 ϵ pour les lymphocytes T.

1.7.1 L'anticorps anti-CD3 ϵ et le récepteur CD3

Le récepteur CD3 est retrouvé à la surface des lymphocytes T en association avec le TCR. En plus de définir la population de lymphocytes T, ce récepteur joue un rôle crucial dans la transduction du signal émis lors de l'interaction TCR-CMH-antigène. Au niveau structural, le récepteur CD3 est composé de 3 hétérodimères formés à partir de 4 chaînes invariables de polypeptides : $\zeta\zeta$, $\gamma\epsilon$ et $\epsilon\delta$. Ces trois hétérodimères sont liés aux chaînes $\alpha\beta$ du TCR par la région transmembranaire. La transduction du signal induisant l'activation et la différenciation des lymphocytes T se fait à partir des motifs intracellulaires d'activation de l'immunorécepteur à base de tyrosine (ITAM : *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). L'internalisation ou la dégradation du complexe TCR-CD3 induit la perte de la capacité d'activation des lymphocytes T.

1.7.1.1 Historique des anticorps anti-CD3 ϵ

L'anticorps anti-CD3 ϵ ou OKT3 a été premièrement identifié en 1979 par l'équipe de Kung et al. alors qu'ils étaient à la recherche de mitogènes des lymphocytes¹²¹. Dans cette étude, Kung a utilisé la technique d'hybridome de Kohler et Milstein pour générer 3 anticorps nommés OKT1, OKT3 et OKT4. Les tests réalisés pour la réactivité de ces anticorps contre les lymphocytes périphériques ont montré que l'OKT3, une

immunoglobuline IgG2, était de loin l'anticorps le plus mitogénique. *In vitro*, l'OKT3 induit la prolifération et la sécrétion d'une grande quantité de cytokines¹²², tandis qu'*in vivo*, la relâche de cette grande quantité de cytokines engendre des effets secondaires chez les patients dès les premières heures après l'administration de l'anticorps. Les cytokines retrouvées dans les sérums des patients comprennent IL-2, IL-3, IL-6, IL-10, TNF- α et IFN- γ ^{123,124}. Ces effets secondaires se manifestent sous forme de symptômes de grippe caractérisés par de la fièvre, des frissons et des maux de têtes, mais ces symptômes sont d'une courte durée¹²³⁻¹²⁵. La mitogénicité de l'anti-CD3 ϵ est causée par sa partie Fc qui se lie aux monocytes induisant ainsi la relâche de cytokines¹²⁶.

L'anticorps anti-CD3 ϵ a été premièrement utilisé seul ou en combinaison avec des corticostéroïdes lors des transplantations afin d'éviter le rejet de greffe¹²⁷⁻¹²⁹. Dû à son effet mitogénique et à la forte réponse humorale dirigée contre l'anticorps, son utilisation est restée limitée. L'intérêt pour cet anticorps est revenu dans les 20 dernières années par la création des anti-CD3 dit « humanisés ». Ces nouveaux types d'anticorps dont seules les parties Fab sont conservées (F(ab')₂) ne sont pas mitogéniques¹³⁰⁻¹³².

L'administration de l'anti-CD3 ϵ affecte les cellules T sur plusieurs plans : 1) une immunosuppression partielle et transitoire au sein de la population de lymphocytes T et, 2) une modulation antigénique. Lors d'une thérapie par l'anti-CD3 ϵ , les patients ou les souris montrent une déplétion de plus de 50% de leurs lymphocytes dans le sang périphérique et dans les ganglions lymphatiques^{132,133}. Plusieurs mécanismes entrent en jeu dans ce phénomène de déplétion. Premièrement, l'anti-CD3 en se liant à son ligand peut opsoniser les lymphocytes et ainsi faciliter la phagocytose par les monocytes/macrophages et les DC. D'autres mécanismes tels que la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendant (ADCC), le complément et l'induction de l'apoptose sont aussi impliqués dans la lyse des lymphocytes T¹³⁴. Cependant, avec la nouvelle génération d'anti-CD3 sans la fraction Fc, la déplétion n'affecte que 20 à 30% des cellules T¹³⁵.

Dans la population de lymphocytes T résiduels après déplétion, la modulation antigénique est induite. Ce phénomène est provoqué par l'internalisation du complexe TCR-CD3 lors de la liaison de l'anti-CD3. Les lymphocytes T ayant perdu leurs TCR deviennent donc immuno-incompétents et ne peuvent être activés tant *in vivo* que *in vitro*. Nous retrouvons ces cellules chez les patients sous forme de CD3-CD4⁺ et CD3-CD8⁺^{133,136,137}. Toutefois la modulation antigénique ne persiste pas et les lymphocytes retrouvent leurs fonctions normales quelques heures après l'élimination des anticorps anti-CD3 de l'organisme¹³⁶.

1.7.1.2 L'anti-CD3ε et la tolérance

L'effet immunosuppresseur de l'anti-CD3 et son implication dans l'amélioration des greffes d'organes ont permis une commercialisation et une utilisation plus globale de cet anticorps. De plus, des recherches intenses ont montré que l'anti-CD3 a non seulement un potentiel immunosuppresseur mais aussi un effet tolérogénique.

Deux modèles expérimentaux ont fourni de fortes évidences sur la capacité de l'anti-CD3 à induire la tolérance. La première expérience consiste à un maintien d'une greffe cardiaque incompatible chez les rats qui ont été préalablement traités avec un anticorps anti-CD3 non-mitogénique. Ceci a résulté en une greffe permanente sans rejet. L'aspect tolérogénique de l'anti-CD3 est montré par l'acceptation d'une greffe de la peau de ces souris greffées du cœur provenant des mêmes donneurs, illustrant ainsi la tolérance aux alloantigènes¹³⁸.

1.7.1.3 Le diabète de type 1 (DT1) et l'anti-CD3ε

Parmi les maladies autoimmunes les plus étudiées, le DT1 représente un bon modèle pour les études d'immunothérapie. Ainsi, une vaste littérature existe où des essais de différentes immunothérapies ont été réalisées chez les souris diabétiques. Le diabète de type 1 est une maladie autoimmune caractérisée par une perte de tolérance envers les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. Ces cellules sont la source de la sécrétion

d'insuline, une hormone peptidique impliquée dans le maintien du taux normal de glucose dans le sang. L'infiltration du pancréas (l'insulite) par les cellules mononucléées composée majoritairement de lymphocytes T autoréactifs CD4⁺ et CD8⁺ diabétogéniques cause la destruction totale des cellules β . Le traitement le plus efficace actuellement disponible est l'injection d'insuline exogène afin de contrôler la glycémie. Chez les personnes diabétiques, plusieurs complications peuvent survenir suite à l'hyperglycémie. Parmi les complications les plus communes, on retrouve les troubles oculaires qui peuvent mener à la formation de cataractes, du glaucome et de rétinopathie périvasculaire. Une autre complication est la neuropathie qui consiste en la destruction des nerfs causée par une mauvaise circulation du sang et l'altération des parois cellulaires des nerfs par un haut taux de glucose. Plusieurs autres complications comme la sensibilité aux infections, la néphropathie (altération progressive de la fonction rénale) et des maladies cardiovasculaires peuvent aussi compliquer la santé des patients diabétiques. La recherche réalisée afin de comprendre la pathogénèse et les mécanismes du DT1, a été grandement facilitée par la disponibilité d'un bon modèle animal: les souris diabétiques non-obèses (NOD). Les résultats de ces recherches montrent que le diabète est une maladie multifactorielle influencée à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux. Malgré l'utilisation d'insuline exogène comme traitement pour le contrôle de la glycémie, son administration prolongée et les difficultés à obtenir des dosages appropriés sont aussi responsables des effets secondaires. Pour cette raison, des efforts ont été mis dans la recherche d'immunothérapies plus spécifiques afin de rétablir la tolérance.

L'équipe de Chatenoud et al. a été la première à utiliser l'anti-CD3 ϵ comme agent immunothérapeutique pour le traitement du DT1. Dans une de leurs premières études, ils ont montré que le traitement par l'anti-CD3 ϵ chez les souris NOD avec une posologie de 5 μ g/jour durant 5 jours consécutifs, induit la rémission chez les souris NOD avec DT1 établi¹³². Cette rémission est définie comme un rétablissement d'un niveau normal de la glycémie et une amélioration de l'insulite laissant seulement une insulite périphérique. Cette rémission peut durer plusieurs mois après le traitement¹³². Au niveau immunologique,

des expériences ont montré que les souris NOD tolérisées par l'anti-CD3 ϵ ne sont pas immuno-incompétentes. En effet, les souris NOD traitées conservent toujours leur capacité de rejeter la greffe de peau. Une analyse des lymphocytes T périphériques a montré que la déplétion de ces lymphocytes n'était que partielle et transitoire. Cependant, si le même traitement est appliqué chez des souris NOD pré-diabétiques (en prophylaxie), les anticorps anti-CD3 ϵ ne peuvent prévenir l'apparition du DT1¹³¹.

Depuis la découverte de l'effet thérapeutique de l'anti-CD3 ϵ pour le traitement du DT1, diverses études ont tenté d'élucider le mécanisme derrière cette rémission. Plusieurs d'entre elles appuient l'hypothèse du rôle des Tregs qui ont le potentiel de réguler les lymphocytes T autoréactifs¹³⁹. Ces études ont montré que l'injection de cyclophosphamide, un produit capable d'affecter spécifiquement les Tregs, arrive à briser la rémission chez les souris NOD tolérisées¹³¹. De plus, le DT1 est inhibé lors du transfert de splénocytes diabétogéniques en présence de Tregs, démontrant ainsi le potentiel régulateur de ces lymphocytes¹³⁴. Cependant, d'autres études argumentent que c'est le TGF- β qui maintient la rémission. En effet, la démonstration de la neutralisation des Tregs par l'usage d'anticorps anti-CD25 montre aucun effet sur la rémission¹⁴⁰ et l'inhibition du TGF- β arrive à prévenir la rémission ou précipite la rechute du DT1 chez les souris NOD montrant des signes de rémission¹³⁴. D'autres études sont nécessaires afin d'éclaircir le mécanisme précis de la rémission obtenue par le traitement d'anti-CD3 ϵ .

Comme mentionné plus haut, des anticorps anti-CD3 «humanisés», dont les régions Fc ont été mutées, furent créés afin de prévenir la mitogénicité de l'anticorps. L'anticorps ChAglyCD3 est dérivé de l'anticorps YTH 12.5 du rat et possède une mutation à la position 297 dans la partie Fc qui prévient la glycosylation. L'anticorps huOKT3 γ 1 Ala-Ala est dérivé de l'OKT3 et possède deux mutations aux positions 234 et 235 dans sa partie Fc. Ces mutations dans les deux anticorps réduisent grandement leur capacité de se lier aux récepteur Fc¹³⁴. Ces deux anticorps humanisés ont fait l'objet d'études cliniques pour la transplantation et le traitement de maladies autoimmunes. Une étude clinique de phase I qui a utilisé huOKT3 γ 1 pour le traitement des patients nouvellement diabétiques a obtenu des

résultats encourageants¹⁴¹. Soixante-quinze pourcent des patients traités avec huOKT3γ1 montrent une amélioration ou un maintien de la production d'insuline en comparaison avec les patients non-traités qui est de 16%¹³⁴. Tous les résultats accumulés jusqu'à ce jour concernant l'anticorps anti-CD3, tant au niveau de son efficacité dans la transplantation que sur le traitement des maladies autoimmunes comme le diabète de type 1 (patients et murin), prouvent que l'anti-CD3 est un candidat idéal pour rétablir la tolérance dans d'autres maladies autoimmunes.

1.7.2 Traitement intranasal

Une autre voie pour rétablir la tolérance est par l'administration d'autoantigènes par voie intranasale. Cette voie tire avantage du système lymphoïde nasal qui est composé essentiellement de deux structures : « *nasal associated lymphoid tissue* » (NALT) et le « *bronchus associated lymphoid tissue* » (BALT). Ces deux composants sont importants dans l'induction de l'immunité ou de la tolérance¹⁴².

1.7.2.1 L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Plusieurs études ont montré le potentiel de l'immunisation intranasale dans le traitement et la prévention de diverses maladies autoimmunes¹⁴³⁻¹⁴⁷. Toutefois, le modèle avec lequel il y a eu le plus d'études par cette voie d'administration est sans contredit le modèle d'EAE. L'EAE est une maladie inflammatoire autoimmune du système nerveux central. Elle a été premièrement décrite chez les singes en 1933¹⁴⁸, mais a été aussi étudiée chez d'autres animaux spécialement chez les rats et les souris. Cette maladie est caractérisée par une infiltration lymphocytaire du système nerveux central induisant une démyélination des neurones. Cette dernière engendre des paralysies variables allant d'une diminution du tonus de la queue jusqu'à une paralysie générale¹⁴⁹. L'EAE peut être induite chez les différents modèles murins par immunisation en combinaison avec un adjuvant, soit avec l'ensemble des protéines de la myéline, la protéine basique de la myéline (MBP), la glycoprotéine des oligodendrocytes qui produisent la myéline (MOG), la protéine

protéolipidique (PLP) ou par des peptides de synthèse contenant les épitopes de ces antigènes (AC1-9, MBP89-101, PLP139-151)¹⁵⁰.

La prévention de l'EAE par administration intranasale de peptides encéphalitogéniques a été montrée par le groupe de Metzler et al.¹⁴⁵. Dans cette étude, l'induction de l'EAE dans le modèle murin H-2^u est inhibée par l'administration intranasale d'Ac1-9. Ac1-9 est l'épitope T dominant reconnu dans ce modèle et représente la partie N-terminale du MBP. Dans une autre étude réalisée par le groupe d'Anerton et al.¹⁴³, l'équipe a montré que l'EAE induite chez les souris H-2^{uxs} possédant des lymphocytes T spécifiques pour Ac1-9, MBP89-101 et PLP139-151 peut être prévenue ou traitée par une administration d'un des trois peptides par voie intranasale. Ces souris tolérisées montrent une amélioration des symptômes associés à l'EAE et une diminution significative de la prolifération des lymphocytes T lorsqu'ils sont stimulés avec le peptide utilisé pour l'induction de la tolérance.

1.7.2.2 Mécanisme d'action : implication de l'IL-10

IL-10 est une cytokine immunosuppressive capable de limiter une réponse inflammatoire. Cette cytokine agit sur plusieurs types de cellules tels que les lymphocytes T et B, les NK, les mastocytes, granulocytes et les cellules dendritiques en inhibant la sécrétion de cytokines (IL-1 α , IL1 β , IL-6, IL-12, IL-18) et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et en diminuant l'expression de co-récepteurs des monocytes¹⁵¹. De plus, IL-10 joue aussi un rôle dans le fonctionnement et la génération des Tregs^{144,152,153}.

L'implication d'IL-10 dans l'EAE a été supportée par plusieurs études. Par exemple, une injection d'IL-10 via un virus recombinant inhibe l'apparition de la maladie¹⁵⁴. L'administration par voie intranasale de faible quantité d'IL-10 réduit la sévérité d'EAE¹⁴⁷. Par contre, la preuve irréfutable de l'implication de l'IL-10 est montrée dans une étude dans laquelle l'efficacité de l'induction de la tolérance par voie intranasale a été testée chez les souris déficientes pour IL-10. Les résultats de cette expérience montrent que sans IL-10 la protection contre l'EAE est inhibée¹⁵¹.

En résumé le rétablissement de la tolérance en exploitant la voie intranasale semble être prometteur pour le traitement des maladies autoimmunes. Toutefois, il faut noter que cette voie d'administration dépend fortement de l'antigène et de la dose utilisée pour le traitement.

1.8 Hypothèse et objectifs

Avec les graves effets secondaires causés par l'utilisation prolongée d'immunosuppresseurs comme l'azathioprine et la prednisone pour le traitement de l'HAI, des recherches vers d'autres alternatives de traitement sont nécessaires. Des immunothérapies plus ciblées et ayant moins d'effets secondaires ont été développées dans les dernières années pour le traitement de plusieurs maladies incluant certaines maladies autoimmunes. Nous avons donc choisi d'évaluer l'efficacité de deux immunothérapies pour le traitement de l'HAI de type 2 à l'aide de notre modèle murin de xénoimmunisation. Les deux immunothérapies choisies sont basées sur la déplétion des lymphocytes T par les anticorps anti-CD3 ϵ et le rétablissement de la tolérance en exploitant la voie intranasale avec l'autoantigène mFTCD.

1.8.1 Hypothèses

1) L'administration d'anticorps anti-CD3 ϵ aura comme effet une déplétion partielle et transitoire des lymphocytes T incluant les lymphocytes T autoréactifs contre les autoantigènes de l'HAI de type 2. Nous croyons que l'élimination des lymphocytes T autoréactifs va permettre le rétablissement des mécanismes de tolérance permettant de contrôler l'inflammation hépatique et ainsi prévenir ou traiter l'HAI de type 2 dans notre modèle murin.

2) L'application de grandes doses de la protéine mFTCD par voie intranasale induira la tolérance envers cet autoantigène. Cette tolérance permettra d'éviter l'activation des lymphocytes T spécifiques à la mFTCD et de prévenir ou de traiter l'HAI de type 2.

1.8.2 Objectif principal

Évaluer l'efficacité des deux immunothérapies sur la prévention et le traitement de l'HAI de type 2 dans notre modèle murin induit par xénoimmunisation. L'efficacité des traitements sera vérifiée en évaluant les niveaux d'ALT sériques et l'inflammation hépatique.

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

2.1.1 Synthèse des plasmides d'ADN pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD et pVR-IL-12 pour l'xénoimmunisation des souris C57BL/6

Le plasmide pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD a été préalablement cloné dans notre laboratoire⁹⁶. Le plasmide pVR-IL-12 nous a été donné par G. Prud'homme (Montréal, Québec, Canada)⁹⁸. Ils ont été utilisés pour l'induction de l'HAI de type 2 chez les souris femelles C57BL/6. Pour synthétiser une grande quantité de ces plasmides, une pré-culture de 20 ml de milieu Luria Bertani (LB) (1% peptone, 0,5% d'extrait de levure et 1% de NaCl) contenant de l'ampicilline (1µl/ml de culture) (Novopharm, Toronto, Canada) a été inoculée avec des bactéries congelées E.coli DH5 alpha contenant le plasmide à synthétiser. Après une incubation de 16 heures à 37°C avec agitation, la pré-culture a été diluée dans 2 litres de culture LB avec ampicilline dans un rapport de dilution 1 :500. Une autre incubation de 16 heures a été nécessaire pour l'obtention d'une quantité suffisante de DH5-alpha contenant notre plasmide d'intérêt. L'isolement et la purification du plasmide ont été réalisés selon les directives du manufacturier de la trousse «*d'endo free plasmid giga kit*» (Qiagen, Maryland, USA). L'ADN plasmidique ainsi obtenu a été dissout dans du tampon saline DPBS (*Dulbecco's phosphate buffered saline 1x*, Invitrogen, CA, USA) pour des fins d'utilisation biologique.

2.1.2 Migration sur gel d'agarose

Afin de s'assurer de la pureté des plasmides obtenus, une migration sur gel d'agarose a été nécessaire. Les plasmides ont été digérés par l'enzyme de restriction EcoRI durant 1 heure à 37°C et dosés par spectrophotométrie. Un microgramme d'ADN plasmidique et un standard d'ADN ont été déposés sur un gel contenant 1% d'agarose (Invitrogen, CA, USA) en présence de bromure d'éthidium (Sigma, MO, USA). Une migration de 1 heure à 400mA et 75 volts a été nécessaire afin d'obtenir une bonne

séparation. Un visionnement aux rayons UV nous a permis de confirmer la pureté du produit.

2.2 Induction d'HAI de type 2 par xénoimmunisation des souris femelles C57BL/6

Des souris femelles C57BL/6 (Charles River Laboratories Inc., QC, Canada) âgées de 6 à 8 semaines ont été vaccinées par voie intramusculaire dans le muscle *m. tibialis cranialis*. Un total de 3 vaccinations avec 100µg de chacun des plasmides (pCMV-CTLA-4-CYP2D6-FTCD et pVR-IL-12) dans 100µl de DPBS à l'intervalle de 2 semaines est nécessaire pour l'induction d'HAI de type 2⁹⁶. Un total de 92 souris ont été vaccinées pour l'étude des deux voies de traitement de l'HAI de type 2.

2.3 Traitement à l'anti-CD3ε

Les souris utilisées dans cette étude étaient toutes des femelles C57BL/6 xénoimmunisées. Le traitement d'anti-CD3ε (anti-mouse CD3ε, clone 145-2C11, eBioscience, CA, USA) consistait à injecter par voie intraveineuse 5µg d'anti-CD3ε/jour durant 5 jours consécutifs. Deux volets ont été choisis afin d'étudier l'impact de l'anti-CD3ε. Le premier volet portait sur l'effet prophylactique de cet anticorps sur l'HAI de type 2. Le deuxième volet était de traiter les souris avec HAI de type 2 déjà établi.

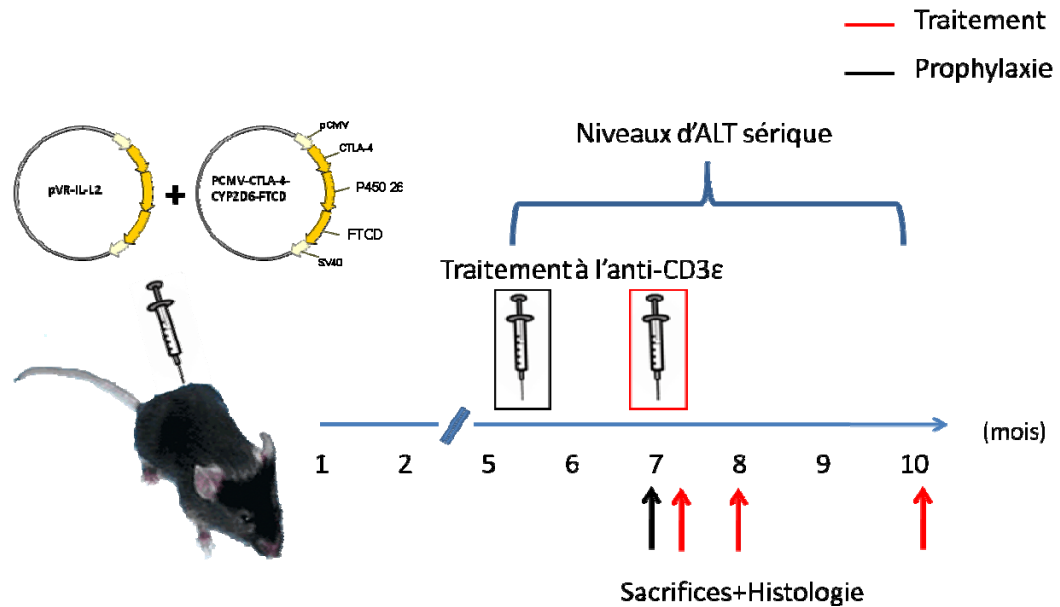


Figure 2 : Protocole de traitement de l’HAI de type 2 avec les anticorps anti-CD3 ϵ . Le traitement prophylactique avec l’anti-CD3 ϵ a été réalisé chez les femelles C57BL/6 à 5.5 mois post-vaccination et elles ont été sacrifiées à 7 mois (noire). Le traitement de l’HAI de type 2 avec l’anti-CD3 ϵ a été appliqué à 7 mois et les sacrifices ont eu lieu à 7.75, 8 et 10 mois post-vaccination (rouge).

2.4 Synthèse de la protéine mFTCD pour le traitement intranasal

La synthèse de la protéine mFTCD a été réalisée dans un premier temps avec 20 ml de pré-culture contenant de la kanamycine (10 μ l/ml de culture, Invitrogen, CA USA) inoculée avec des bactéries BL21 congelées transfectées avec le plasmide pET-30C-mFTCD. Après une incubation de 16 heures à 37°C avec agitation, 2 litres de culture LB avec kanamycine ont été inoculés avec la pré-culture dans un rapport de dilution 1 : 50. Après une heure d’incubation, de l’isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen, CA, USA) a été ajouté à une concentration finale de 1mM afin d’amorcer la synthèse de la protéine. Par la suite, la suspension bactérienne a été centrifugée à 2000 g et le culot congelé à -80°C pendant 16 heures. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 20ml de tampon de lyse NPI₁₀ (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl et 10mM d’imidazole) et 0.1 g de lysozyme/litre de culture a été ajouté (Sigma, MO, USA). Après sonication, une

incubation de 30 minutes à 4°C est nécessaire pour que le lysozyme puisse agir. Une centrifugation de 15 000g à 4°C pendant 30 minutes nous a permis de récupérer le surnageant bactérien qui contenait notre protéine d'intérêt. Une dilution du surnageant dans un rapport de dilution 1:1 a été réalisée avant l'étape de purification sur colonne. La purification de la protéine a été réalisée à l'aide des colonnes d'affinité « *Ni-NTA super flow columns* » (Qiagen, Maryland, USA). La colonne Ni-NTA a été préalablement équilibrée avec 10ml d'NPI₁₀ avant le passage du surnageant. Par la suite, la colonne a été lavée avec 40ml de NPI₂₀ (50mm NaH₂PO₄, 300mM NaCl et 20mM d'imidazole). La protéine mFTCD a été éluée dans 6 fractions de 1ml d'NPI₂₅₀ (50mm NaH₂PO₄, 300mM NaCl et 250mM d'imidazole).

2.4.1 Concentration de la protéine mFTCD

Une concentration des éluions contenant la protéine mFTCD a été nécessaire afin de pouvoir appliquer par voie intranasale une quantité minimale de liquide en respectant les lignes directrice du CCPA. Pour ce faire, des centricons ont été utilisés (Centrifugal filter Units, Milipore Corporation, Billerica, MA). Une centrifugation de 1660g à 25°C a été appliquée pour la concentration des éluions aux volumes et concentrations propices pour le traitement intranasal. Le tampon a été changé pour du NP (50mm NaH₂PO₄, 300mM NaCl) pour éliminer l'imidazole.

2.4.2 Migration sur gel de polyacrylamide et coloration au Bleu de Coomassie de la protéine mFTCD

La pureté de la protéine mFTCD concentrée a été confirmée par SDS-PAGE sur gel de 10% acrylamide/bis-acrylamide 37.5 : 1 (Bio-Rad, PA, USA) selon les indications du manufacturier. Les gels ainsi obtenus ont été incubés pendant 15 minutes dans une solution de fixation (25% isopropanol et 10 % acide acétique). Par la suite, ils ont été colorés dans une solution de Bleu de Coomassie 1% (40% méthanol et 10% acide acétique) jusqu'à l'apparition des bandes, puis passés dans une solution de décoloration (10% acide acétique) pour 1h et finalement séchés.

2.5 Traitement intranasal par mFTCD et groupes de souris expérimentaux

Le traitement intranasal que nous avons utilisé consistait à appliquer dans les narines des souris femelles C57BL/6 sous anesthésie générale par l'isoflurane (Baxter Corporation, ON, Canada), 100µg de mFTCD par jour durant 3 jours consécutifs. Les souris contrôles ont reçu 100µl de tampon NP. Au niveau du protocole expérimental, le traitement intranasal a été essayé en prophylaxie. Les souris ont été traitées à 5.5 mois et sacrifiées au 6^e mois post-vaccination.

2.6 Sacrifices : Isolation des lymphocytes hépatiques et spléniques

Lors des sacrifices, les souris ont reçu une dose de somnotol (120 mg/kg) et une ponction cardiaque a été réalisée avec une aiguille de 23G. Les rates et les foies ont été prélevés afin de procéder à l'isolation des lymphocytes.

2.6.1 Extraction des lymphocytes à partir de la rate

Les rates ont été coupées avec un scalpel et filtrées à l'aide d'une aiguille de 26G 3/8 pour enlever les débris fibreux. Les filtrats ainsi obtenus ont subi une lyse des globules rouges avec une solution de NH₄Cl pendant 5 minutes. Par la suite, deux lavages au RPMI 1640 sont réalisés avant de resuspendre dans 5 ml de RPMI complet (RPMI 1640, SFV 10%, β-mercaptoéthanol). Finalement, les splénocytes ont été comptées par hématimètre.

2.6.2 Extraction des lymphocytes à partir du foie

Les foies isolés ont été coupés par un scalpel et broyés, puis passés à travers d'un filtre de 100 µm. Une suspension contenant 3 mg de collagénase IV par foie (Sigma, MO, USA) a été ajoutée et incubée pendant 10 minutes à 37°C afin de briser les tissus fibreux dans les foies et ainsi augmenter le rendement des lymphocytes isolés. Les lymphocytes ont été séparés sur un gradient discontinu de Percoll (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Canada) par centrifugation à 1500g pendant 20 minutes. Les couches de lymphocytes obtenues ont été prélevées et lavées deux fois dans du DPBS. Une lyse des globules rouges

a été réalisée comme mentionné ci-haut pour l'isolement des lymphocytes de la rate. Par la suite, les lymphocytes intrahépatiques ont été resuspendus dans 1 ml de RPMI complet et comptés à l'hématimètre.

2.7 Quantification du taux d'alanine aminotransférase

Le sang des souris a été prélevé à partir de la queue à chaque mois post-vaccination et à chaque semaine post-traitement jusqu'au moment du sacrifice. Les niveaux d'alanine aminotransférase dans le sérum ont été mesurés à l'aide d'un appareil Beckman-Synchron CX9.

2.8 Histologie du foie

Une biopsie des foies isolés au moment des sacrifices (traitement anti-CD3 ϵ et intranasal) a été préalablement fixée au paraformaldéhyde et montée dans de la paraffine pour être coupée au microtome par le service de pathologie de l'hôpital Sainte-Justine et puis colorée à l'Hématoxyline phloxine safranine (HPS). Les coupes de foies obtenues ont été examinées pour l'évaluation du taux d'inflammation. Un score d'inflammation a été accordé à chaque biopsie selon l'échelle d'Ishak¹⁵⁵ en aveugle par au moins deux observateurs.

2.9 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été utilisée pour étudier quatre paramètres. Premièrement pour la détermination de l'efficacité du traitement à l'anti-CD3 ϵ par quantification des lymphocytes T CD3⁺ présents dans les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) des souris. Deuxièmement, cette méthode nous a permis de quantifier le taux de lymphocytes T régulateurs dans les foies des souris. Finalement, la cytométrie a aussi été utilisée pour le test de prolifération et de cytotoxicité du foie. L'analyse des données a été faite à l'aide du logiciel Flowjo v.8.7.

2.9.1 Efficacité du traitement par l'anti-CD3ε

Deux cents microlitres de sang ont été prélevés à partir de la queue à chaque semaine post-traitement dans des tubes de prélèvement contenant de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pour inhiber la coagulation (BD, Mississauga, ON). Ces tubes de sang ont été centrifugés à 1 000g pendant 10 minutes afin de recueillir le sérum pour la quantification d'ALT (voire ci-dessus 2.7). Les culots de sang restants ont subi une lyse des globules rouges. Les PBMC ainsi obtenues ont été marquées avec les anticorps anti-souris CD3ε couplés au FITC (clone : 145-2C11), l'anti-mouse CD8a couplé au APC (clone: 53-6.7), l'anti-souris CD4 couplé au PE (clone : GK1.5) et anti-souris CD45 couplé au PerCP-Cy5.5 (clone: 30-F11) (eBioscience, SD, USA) pendant 30 minutes à 4°C. Par la suite un lavage au DPBS contenant 5% de sérum fœtal bovin est fait avant de recueillir les résultats via le FACS Calibur (BD, Mississauga, ON).

2.9.2 Quantification des lymphocytes T régulateurs CD4+, CD25+ et Foxp3+

La quantification des Tregs parmi les lymphocytes du foie a été réalisée selon les indications du manufacturier de la trousse «*mouse regulatory T cell staining kit*» (eBioscience, SD, USA). En bref, les lymphocytes isolés du foie ont été préalablement marqués avec les anticorps anti-souris CD4 FITC (clone : RM4-5), anti-souris CD25 APC (clone : PC61.5) et perméabilisés. Par la suite, un marquage intracellulaire avec l'anticorps anti-souris Foxp3 PE (clone : FJK-16s) a été réalisé (eBioscience, SD, USA).

2.10 Test de prolifération avec les lymphocytes du foie

Le but de cette expérience était de voir si les lymphocytes du foie allaient proliférer en présence des autoantigènes utilisés lors des traitements (la protéine chimère CYP-2D6-FTCD et le mFTCD). Pour suivre la prolifération, les lymphocytes du foie ont été marqués au «*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Invitrogen» (CFSE, Invitrogen, CA USA). Trois cent mille lymphocytes isolés du foie par souris ont été resuspendus dans du DPBS contenant 5% de sérum fœtal bovin (DPBS 5% SFB). Le marquage a été effectué dans un

mélange 1:1 avec une solution de CFSE 10 μ M à 37°C pendant 10 minutes, suivi de deux lavages au DPBS 5% SFB. Par la suite, 100 000 lymphocytes/puits (100 μ l) ont été déposés dans trois puits. On a utilisé 100 μ g de protéines/1x10⁶ cellules pour la réalisation du test, 1 μ l de ConA/puit pour le contrôle positif et un contrôle négatif dans lequel la protéine et la ConA ont été exemptées. Les puits ont été complétés jusqu'à 300 μ l avec du RPMI complet avec 5% de surnageant d'EL4. Après une incubation de 4 jours à 37°C, les lymphocytes ont été marqués avec les anticorps anti-souris CD8a APC (clone: 53-6.7) et l'anti-souris CD4 PE (clone : GK1.5) (eBioscience, SD, USA) pendant 30 minutes à 4°C suivi d'un lavage. Par la suite, une coloration au 7-AAD (BD, Mississauga, ON) a été effectuée juste avant le passage au FACS Calibur. Les marquages CD4 et CD8 nous permettent de déterminer quelle population de lymphocytes a proliféré, tandis que la coloration au 7-AAD permet d'éliminer les cellules mortes lors de l'analyse.

2.11 Test de cytotoxicité au CFSE avec les lymphocytes du foie

Dans cette expérience, les cellules EL4, une lignée cellulaire de lymphome de souris, ont été marquées au CFSE et utilisées comme cellules cibles. Une fois marquées, ces cellules ont été incubées avec la protéine chimère ou le mFTCD pendant 16 heures à 37°C. Des ratios de 1:1, 5:1 et 10:1 sur une base de 10 000 cellules d'EL4 avec des lymphocytes du foie ont été réalisés. Des duplicata de chacun des ratios avec des EL4 marquées au CFSE avec ou sans protéine sont faites pour définir le bruit de fond. Les puits ont été complétés à 200 μ l avec RPMI contenant 5% de surnageant d'EL4. Le tout a été incubé pendant 4 heures à 37°C. À la fin de l'incubation, le contenu des puits a été marqué avec les anticorps anti-souris CD8a APC (clone: 53-6.7) et l'anti-souris CD4 PE (clone : GK1.5) pendant 30 minutes à 4°C suivi d'un lavage. Un autre marquage à l'annexine V a été réalisé avec la trousse «*annexin V apoptosis detection kit PerCP-eFluor*» (eBioscience, SD, USA) selon les indications du manufacturier. Le recueil des données a été effectué avec le FACS Calibur.

2.12 Évaluation des niveaux de TGFβ

Les niveaux de TGFβ dans les sérums des souris ont été évalués afin de vérifier s'il y avait une différence après le traitement à l'anti-CD3ε. Les sérums des souris prélevés à chaque mois post-vaccination et à chaque semaine post-traitement ont été testés. L'expérience a été réalisée selon les indications du manufacturier avec le trousse «*Human/Mouse TGF beta 1 ELISA Ready-SET-Go!* » (eBioscience, SD, USA).

2.13 Tests statistiques

Deux tests statistiques ont été utilisés pour l'analyse et l'interprétation des résultats que nous avons obtenus. Le test de T de Student a été utilisé afin de comparer les différences entre les groupes expérimentaux. Un test de T pairé a été utilisé pour évaluer l'impact du traitement à l'anti-CD3ε au niveau des ALT.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Traitement avec les anticorps anti-CD3 ϵ

3.1.1. Efficacité du traitement à l'anti-CD3 ϵ

L'efficacité a été évaluée à chaque semaine après le traitement à l'anti-CD3 ϵ en mesurant le pourcentage des lymphocytes T CD3 $^+$ dans le sang périphérique par cytométrie en flux. L'évaluation de la quantité de lymphocytes T CD3 $^+$ a permis de constater une déplétion partielle et transitoire de ces derniers dans le groupe de souris traitées. Cette déplétion était en moyenne de 50% en rapport aux souris non-traitées (test t de Student, $p < 0.05$). Le test de t de Student a été utilisé afin de comparer la diminution des lymphocytes T suite au traitement à l'anti-CD3 ϵ à un temps donné. Le pic de la déplétion se situait à la deuxième semaine post-traitement où la diminution a atteint 72%. Les lymphocytes T CD3 $^+$ sont revenus à des niveaux proches de la normale à partir de la 9^e semaine (figure 3).

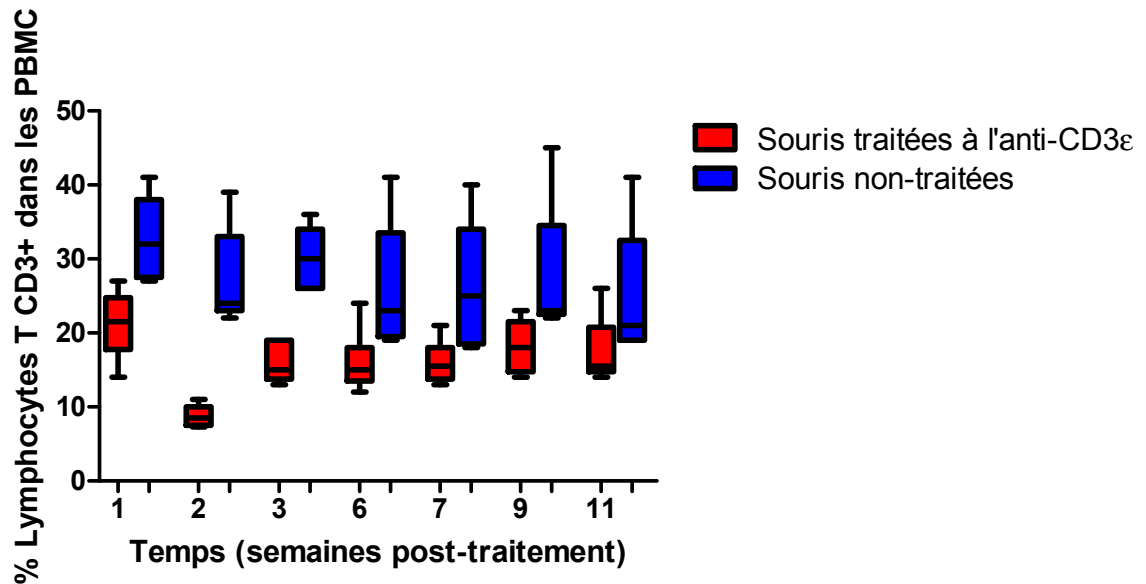


Figure 3: Évaluation de l'efficacité du traitement à l'anti-CD3 ϵ en quantifiant les lymphocytes T CD3+ par cytométrie en flux. Ce graphique montre le pourcentage des lymphocytes T CD3+ présents dans les PBMC entre les souris non-traitées (bleu) et les souris traitées à l'anti-CD3 ϵ (rouge). L'analyse a été effectuée à partir du sang de 11 souris (6 souris traitées à l'anti-CD3 ϵ et 5 non-traitées). Les pourcentages rapportés sont des ratios CD3+/CD45+. La différence entre les groupes a été calculée par un test t de Student ($p < 0.05$). La bande située dans les boîtes représente la médiane, l'extrémité inférieure représente le 1^e quartile et l'extrémité supérieure représente le 3^e quartile. Les lignes représentent l'étendue des données.

3.1.2 Traitement de l'HAI de type 2 par les anticorps anti-CD3 ϵ en prophylaxie.

Dans ce volet, l'expérimentation a été réalisée deux fois sur un total de 20 souris (10 traitées à l'anti-CD3 ϵ et 10 non-traitées).

3.1.2.1 Variation des niveaux d'ALT chez les souris traitées à l'anti-CD3 ϵ en prophylaxie

Pour savoir si le traitement à l'anti-CD3 ϵ était efficace pour diminuer le dommage hépatique, nous avons mesuré les niveaux d'ALT dans les sérums des souris. Les mesures

ont été prises avant le traitement à 5.5 mois et au moment du sacrifice à 7 mois post-vaccination. Dans le groupe non-traité, sept souris sur 11 (63%) ont montré une augmentation de leurs niveaux d'ALT et quatre souris (37%) n'ont pas eu de variation. Dans le groupe traité à l'anti-CD3 ϵ , quatre souris sur 11 (37%) ont montré une augmentation de leurs ALT, tandis que les sept autres souris (63%) ont vu leurs niveaux d'ALT diminuer après le traitement. Malgré une différence dans le nombre absolu des souris qui se sont améliorées, l'analyse de chacun des groupes avec un test de T pairé n'a révélé aucune différence statistiquement significative ($p=0.0574$ pour les souris non-traitées et $p=0.6073$ pour les souris traitées à l'anti-CD3 ϵ).

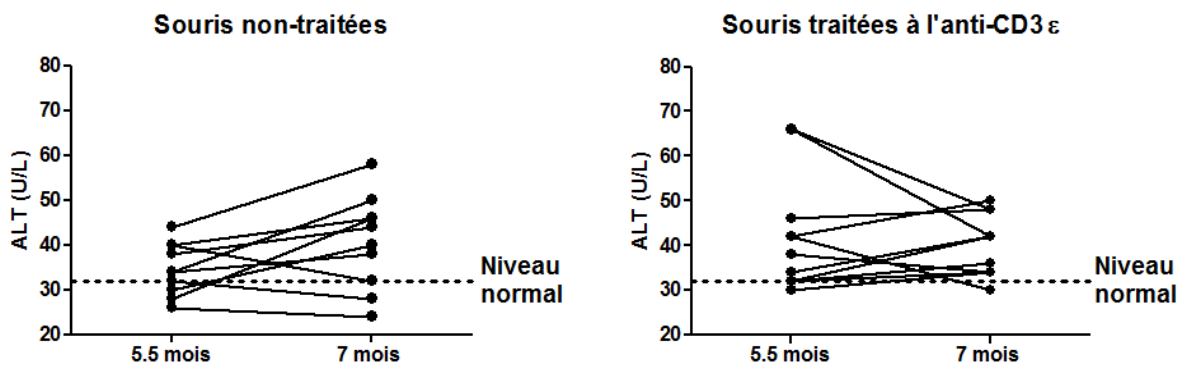


Figure 4 : Comparaison des niveaux d'ALT des souris traitées à l'anti-CD3 ϵ en prophylaxie. Les niveaux d'ALT de chacune des souris ont été comparés avant le traitement à l'anti-CD3 ϵ avec ceux du sacrifice. Le test de T pairé a été utilisé pour évaluer la différence dans chacun des groupes ($p=0.0574$ pour les souris non-traitées et $p=0.6073$ pour les souris traitées à l'anti-CD3 ϵ).

3.1.2.2 Histologie du foie

L'évaluation de l'inflammation hépatique permet de savoir si le traitement d'anti-CD3 ϵ appliqué en prophylaxie peut prévenir l'HAI de type 2. Les scores d'inflammation ont été évalués selon l'échelle d'Ishak et représentent la somme des scores d'inflammation portale, périportale et intralobulaire retrouvées dans le foie. L'inflammation des foies a été

comparée entre le groupe de souris non-traitées atteints d'HAI de type 2 (10 souris) avec le groupe de souris traitées à l'anti-CD3 ϵ (10 souris). La comparaison des scores d'inflammation n'a révélé aucune différence statistiquement significative entre les deux groupes expérimentaux ($p=0.8005$).

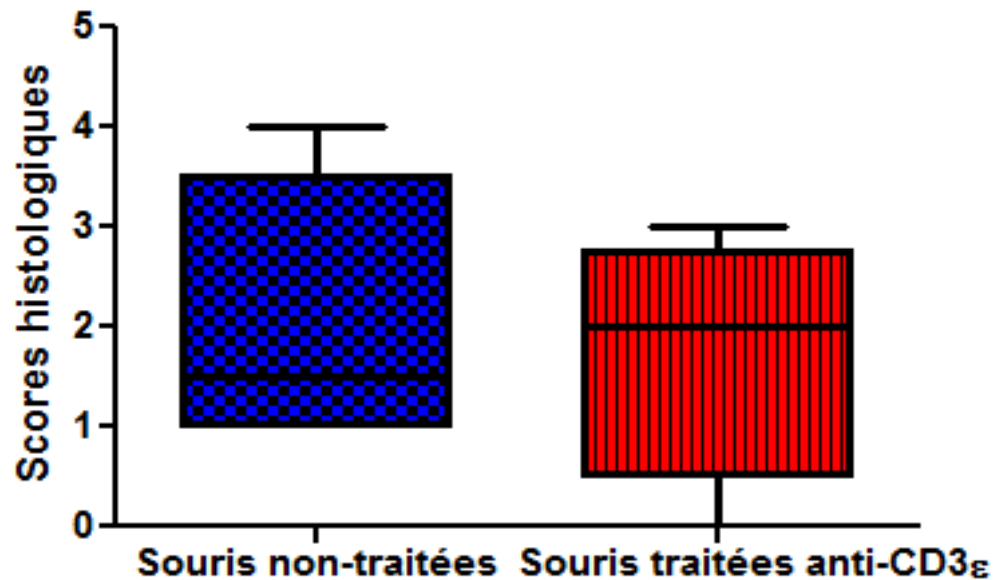


Figure 5 : Niveaux d'inflammation du foie des souris xénoimmunisées traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ en prophylaxie. L'inflammation des foies a été comparée entre 10 souris non-traitées (bleu) et 10 souris traitées à l'anti-CD3 ϵ (rouge). La différence entre les deux groupes a été évaluée avec un test t de Student ($p=0.8005$).

3.1.2.3 Niveaux des lymphocytes T régulateurs intrahépatiques

L'analyse des niveaux de Tregs dans le foie a été réalisée par le logiciel Flowjo. La population de lymphocytes T CD4 $^{+}$, CD25 $^{+}$ et Foxp3 $^{+}$ dans les lymphocytes intrahépatiques a été marquée et analysée par cytométrie en flux afin de dénombrer les Tregs. Le pourcentage rapporté dans la figure 6 représente le pourcentage de Tregs retrouvé au sein des lymphocytes T CD4 $^{+}$. La comparaison des niveaux de Tregs intrahépatiques

entre les deux groupes expérimentaux n'a révélé aucune différence. Le traitement à l'anti-CD3 ϵ en prophylaxie n'induit pas significativement plus de Tregs au foie ($p=0.988$) (figure 6).

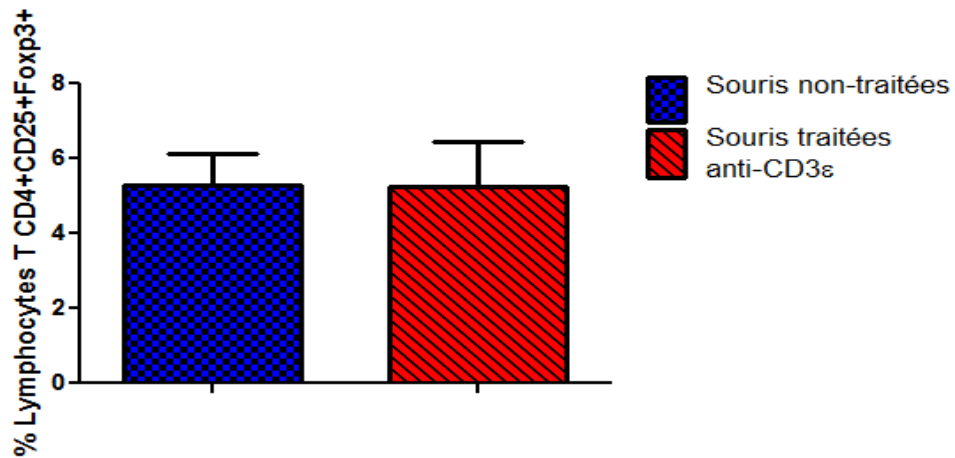


Figure 6 : Pourcentage de lymphocytes T régulateurs dans les foies des souris xénoimmunisées traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ en prophylaxie. Le pourcentage de Tregs a été évalué parmi les lymphocytes T isolés du foie par les marqueurs CD4+, CD25+ et Foxp3+. La différence entre les deux groupes a été évaluée avec un test t de Student ($p=0.988$).

3.1.3 Traitement de l'HAI de type 2 par les anticorps anti-CD3 ϵ

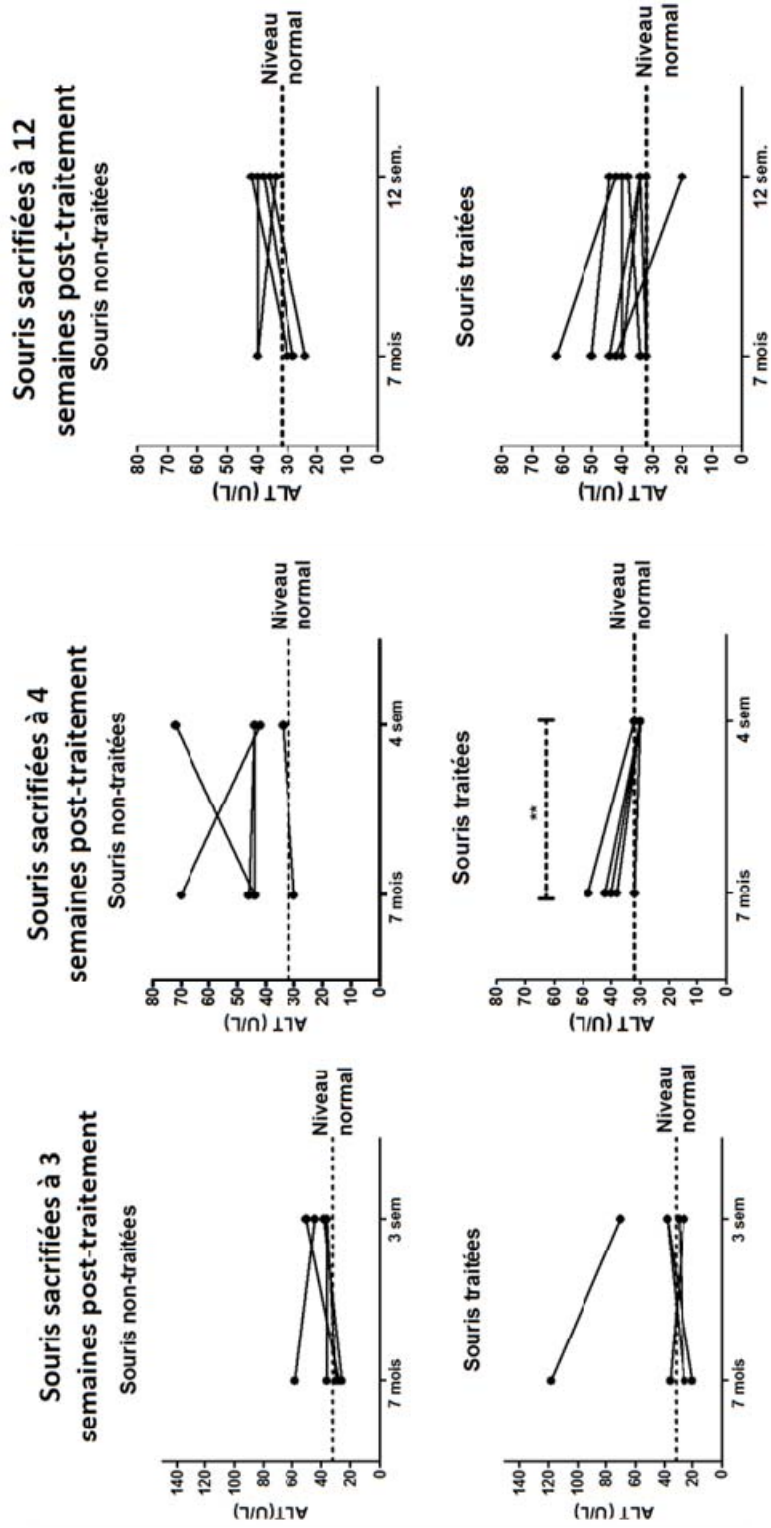
Dans ce deuxième volet, nous avons appliqué le traitement à l'anti-CD3 ϵ chez des souris avec HAI de type 2 établie. Des souris femelles C57BL/6 atteintes d'HAI de type 2, 7 mois après la vaccination, ont été traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ . Les sacrifices ont été réalisés à 3, 4 et 12 semaines après le traitement. Un total de 50 souris a été utilisé et l'expérimentation a été répétée deux fois pour le groupe de 3 et 4 semaines et une fois pour le groupe de 12 semaines. Dix neuf souris ont été sacrifiées à 3 semaines après le traitement à l'anti-CD3 ϵ (9 traitées et 10 non-traitées), vingt souris ont été sacrifiées à 4 semaines (10 traitées et 10 non-traitées) et 11 souris ont été sacrifiées à 12 semaines (6 traitées et 5 non-traitées).

3.1.3.1 Variation des ALT chez les souris atteintes d'HAI de type 2 et traitées avec l'anti-CD3ε

Dans le groupe de souris traitées à l'anti-CD3ε à 7 mois et sacrifiées à 7.75 mois post-vaccination (3 semaines post-traitement), deux souris sur cinq dans le groupe traité ont une diminution de leurs ALT (40%), tandis que 4 souris sur 5 ont plutôt une augmentation des ALT dans le groupe non-traité (80%).

Dans le groupe sacrifié à 8 mois post-vaccination (4 semaines post-traitement), nous remarquons que toutes les souris non-traitées présentent soit une augmentation ou des niveaux élevés d'ALT. En comparaison, on observe une normalisation des ALT dans toutes les souris traitées à l'anti-CD3ε. Le test de T pairé a révélé une différence significative dans ce groupe ($p=0.0143$).

Pour le groupe sacrifié à 10 mois post-vaccination, 4 souris sur 5 (80%) présentent une augmentation des ALT et une souris a une diminution dans le groupe non-traité. Dans le groupe traité à l'anti-CD3ε, 6 souris sur 9 ont des diminutions de leurs ALT (67%) et 4 souris sur 9 sont restées avec un faible taux d'ALT (figure 7).



Graphique 7 : Variation des ALT chez les souris atteintes d’HAI type 2 et traitées à l’anti-CD3ε. Une comparaison des ALT avant le traitement d’anti-CD3ε à 7 mois post-vaccination et aux moments des sacrifices a été réalisé. Un test de T pairé a révélé une différence significative dans le groupe de souris traitées et sacrifiées à 4 semaines post-traitement (test de t pairé de Student, p=0.0143).

3.1.3.2 Histologie des foies

À la fin des protocoles de chaque groupe de souris, le degré d'inflammation des foies a été évalué à l'aveugle et un score a été accordé selon l'échelle d'Ishak par 2 observateurs. Les souris atteintes d'HAI de type 2 montrent une infiltration massive de lymphocytes dans les zones portales et périportales avec la présence d'hépatite d'interface. La présence de nombreuses infiltrations intralobulaires est aussi observable dans ce groupe de souris (figure 8, a). En comparaison, les souris qui ont subi le traitement d'anti-CD3 ϵ montrent une nette diminution de l'inflammation hépatique avec la présence de petites zones d'infiltration portale et un plus faible nombre d'infiltrats intralobulaires (figure 8, b).

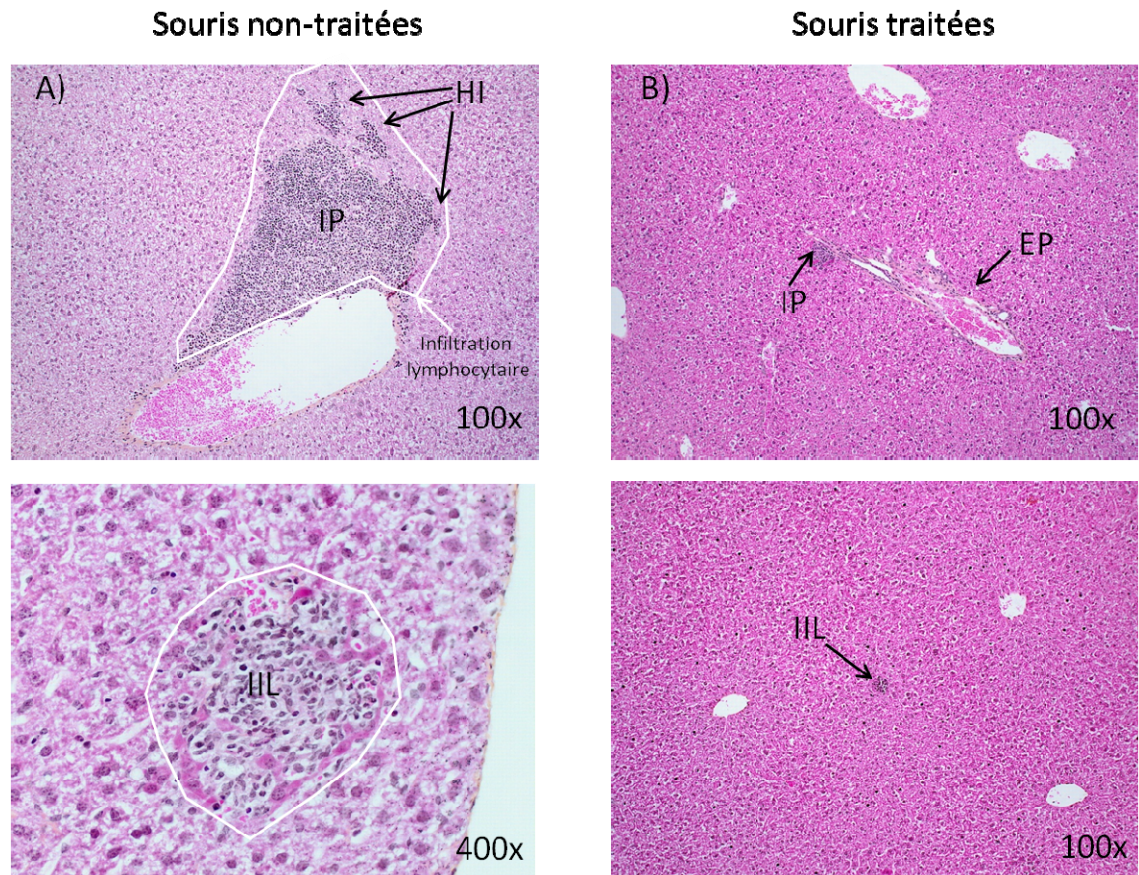


Figure 8 : Coupes histologiques des foies des souris atteintes d'HAI de type 2 et traitées avec les anticorps anti-CD3 ϵ . A) Les souris atteintes d'HAI de type 2 montrent la présence d'infiltration portale (IP) et d'hépatite d'interface (HI) avec un nombre élevé d'infiltration intralobulaire (IIL). B) Les souris traitées avec l'anti-CD3 ϵ montrent un faible taux d'infiltration intralobulaire et une plus petite zone d'infiltration portale.

3.1.3.3 Score histologique du foie des souris atteintes d'HAI de type 2 et traitées à l'anti-CD3 ϵ

Une évaluation des niveaux d'inflammation du foie dans les trois groupes de souris a été réalisée selon l'échelle d'Ishak. Nous avons observé une diminution significative de l'inflammation hépatique dans le groupe de souris sacrifiées à la 3^e semaine après le traitement à l'anti-CD3 ϵ (test t de Student, $p=0.0263$). Cette réduction statistiquement significative du dommage hépatique a disparu dans les groupes de souris sacrifiées à 1 mois

et 3 mois post-traitement. Cependant, l'inflammation hépatique chez les souris traitées dans ces deux groupes était toujours plus faible comparée aux souris non-traitées (figure 9).

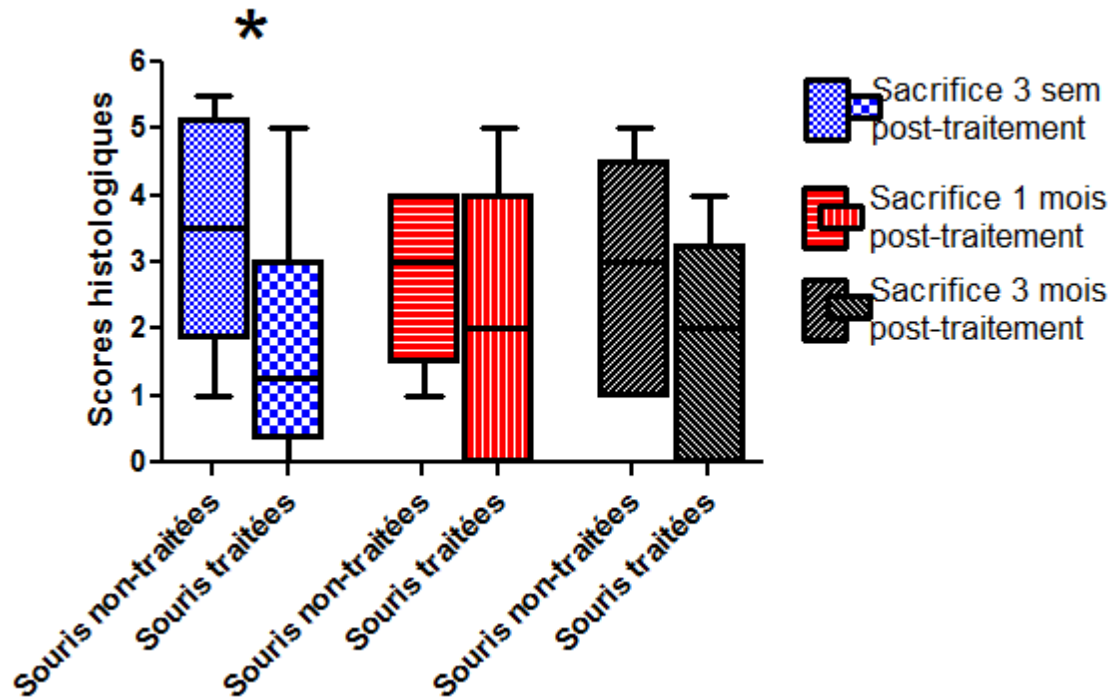


Figure 9 : Niveaux d'inflammation du foie des souris atteintes d'HAI de type 2 traitées par les anticorps anti-CD3 ϵ . Le graphique montre les niveaux d'inflammation des foies de 3 groupes de souris: celles sacrifiées après 3 semaines, (bleu, n=20), 1 mois (rouge, n=19) et 3 mois (noire, n=11) après le traitement à l'anti-CD3 ϵ (Test t de Student, p=0.0263).

3.1.3.4. Souris avec un score histologique égal ou inférieur à 1

Afin d'évaluer l'impact du traitement à l'anti-CD3 ϵ sur l'inflammation hépatique, nous avons regroupé les souris ayant un score histologique égal ou inférieur à 1. Un foie avec un score d'inflammation inférieure à 1 ne possède pas d'inflammation portale ni d'hépatite d'interface, mais contient seulement un faible taux d'inflammation intralobulaire. Avec les résultats obtenus, nous avons constaté que seules les souris traitées

à l'anti-CD3 ϵ avaient un score histologique inférieur à 1, tandis qu'aucune des souris non-traitées n'atteignait ce score. Les pourcentages sont de 40, 27 et 33 % pour les souris traitées et sacrifiées à 3 semaines, 1 et 3 mois post-traitement respectivement (figure 10).

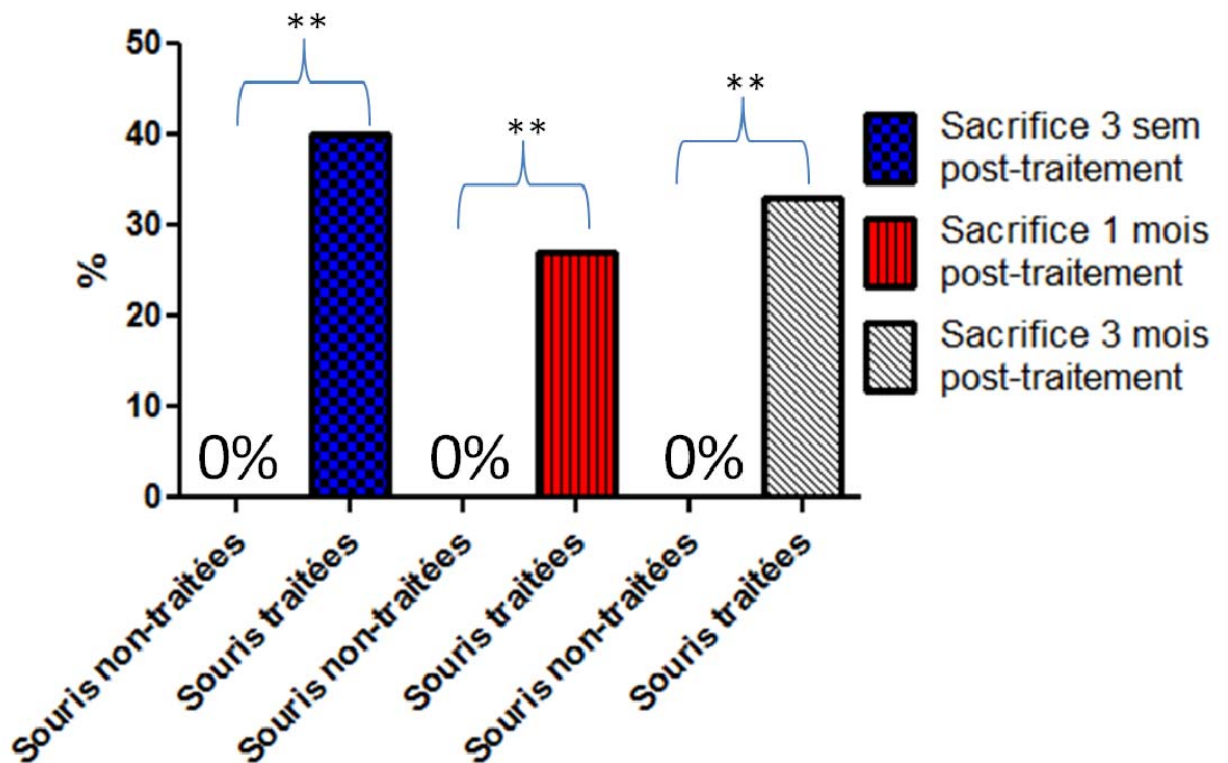


Figure 10 : Pourcentage de souris ayant un score d'inflammation inférieur à 1. Ce graphique montre le nombre de souris dans chacun des groupes qui ont un score d'inflammation inférieur à 1. Test t de Student ($p < 0.01$).

3.1.3.5 Niveaux de lymphocytes T régulateurs dans le foie

Après les sacrifices, la quantité de Tregs dans le foie a été évaluée dans les groupes de souris sacrifiés à 3 semaines ($n=18$, 9 traitées et 9 non-traitées) et 3 mois post-traitement ($n=13$, 9 traitées et 4 non-traitées). La comparaison entre ces deux groupes a révélé une

augmentation des Tregs chez les souris traitées et sacrifiées à 10 mois comparativement aux souris traitées et sacrifiées à 3 semaines (Test de t de Student, $p=0.0378$). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux groupes de souris non-traitées (figure 11).

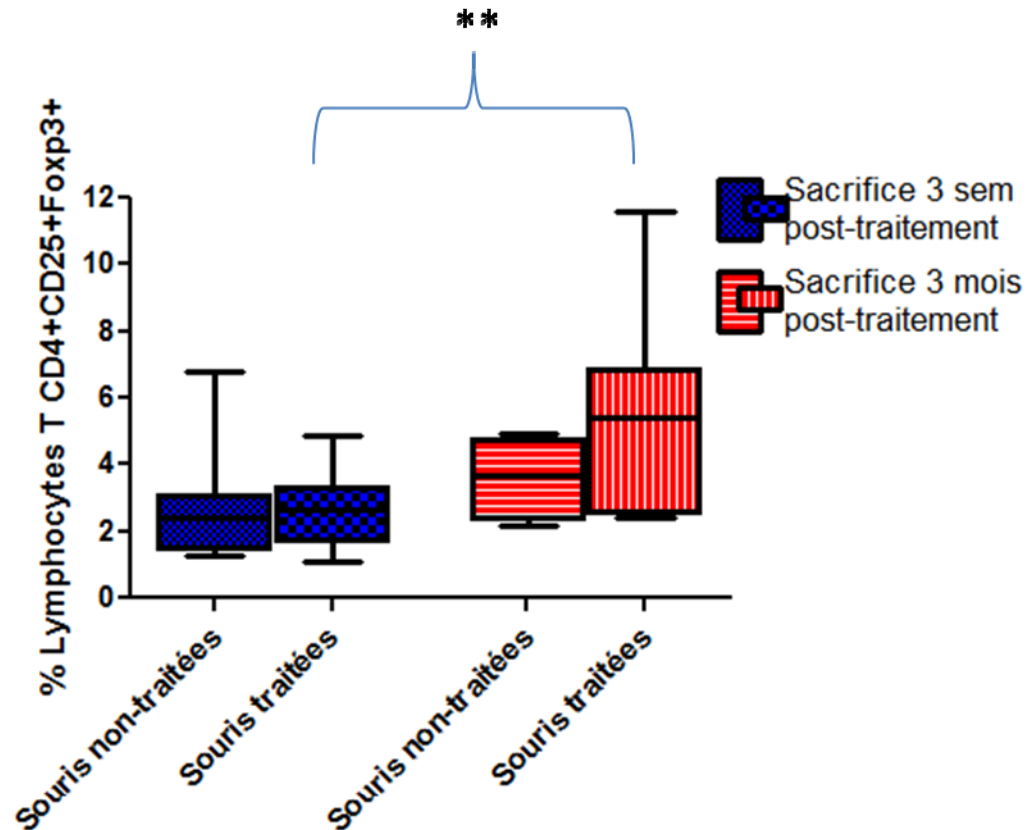


Figure 11 : Comparaison des niveaux de lymphocytes T régulateurs intrahépatiques entre les groupes de souris sacrifiées à 3 semaines et 3 mois post-traitement. Le pourcentage de Tregs a été évalué parmi les lymphocytes T isolés du foie par les marqueurs CD4+, CD25+ et Foxp3+. La différence entre les deux groupes a été évaluée avec un test t de Student ($p=0.0378$).

3.2 Traitement par voie intranasale avec la protéine mFTCD

3.2.1 Traitement de l'HAI de type 2 par voie intranasale avec la protéine mFTCD en prophylaxie

Le traitement par voie intranasale en prophylaxie a pour but de rétablir la tolérance envers l'autoantigène mFTCD et de prévenir l'apparition de l'HAI de type 2. Les souris vaccinées depuis 5.5 mois ont été traitées par voie intranasale. La posologie du traitement était de 100 μ g de mFTCD par jour par voie intranasale (50 μ g/narine) durant 3 jours consécutifs. Les souris ont été sacrifiées après 2 semaines.

3.2.2 Variation des ALT chez les souris xénoimmunisées traitées par voie intranasale avec la mFTCD en prophylaxie

Les niveaux d'ALT ont été comparés avant le traitement intranasal à 5.5 mois et au moment du sacrifice à 6 mois post-vaccination, soit 2 semaines post-traitement. Dans le groupe de souris non-traitées, seulement 3 souris sur 9 ont montré une augmentation de leurs ALT, tandis que les ALT des autres souris sont demeurées à des niveaux normaux. Le même phénomène s'est produit dans le groupe de souris traitées par voie intranasale (Figure 12).

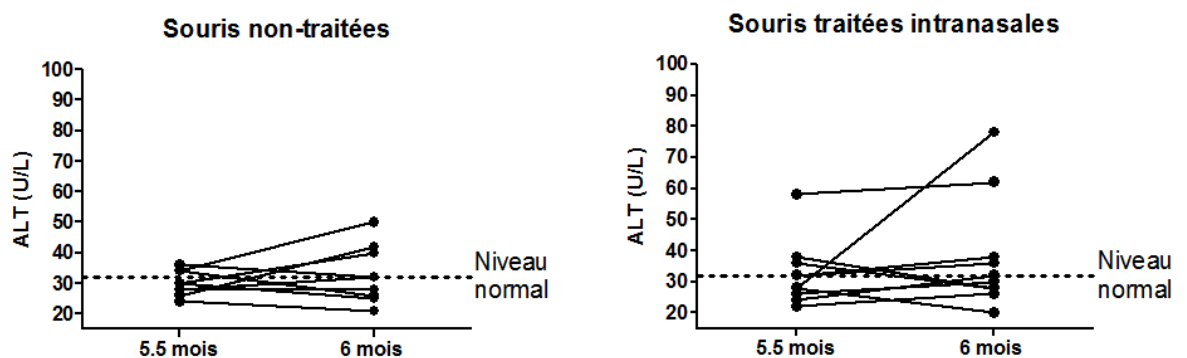


Figure 12 : Variation des ALT chez les souris xénoimmunisées et traitées par voie intranasale avec la mFTCD en prophylaxie. Les niveaux d'ALT de chacune des souris ont été comparés avant le traitement à l'anti-CD3 ϵ avec ceux du sacrifice. Le test de T pairé

a été utilisé pour évaluer la différence dans chacun des groupes ($p=0.3703$ pour les souris non-traitées et $p=0.3413$ pour les souris traitées intranasales).

3.2.3 Histologie des foies des souris xénoimmunisées et traitées par la voie intranasale en prophylaxie

L'inflammation du foie a été évaluée selon l'échelle d'Ishak et un score histologique a été attribué de façon aveugle par deux observateurs. La comparaison entre les deux groupes expérimentaux a révélé une diminution significative de l'inflammation hépatique chez les souris traitées par la voie intranasale (Test de t de Student, $p=0.0417$) (figure 13).

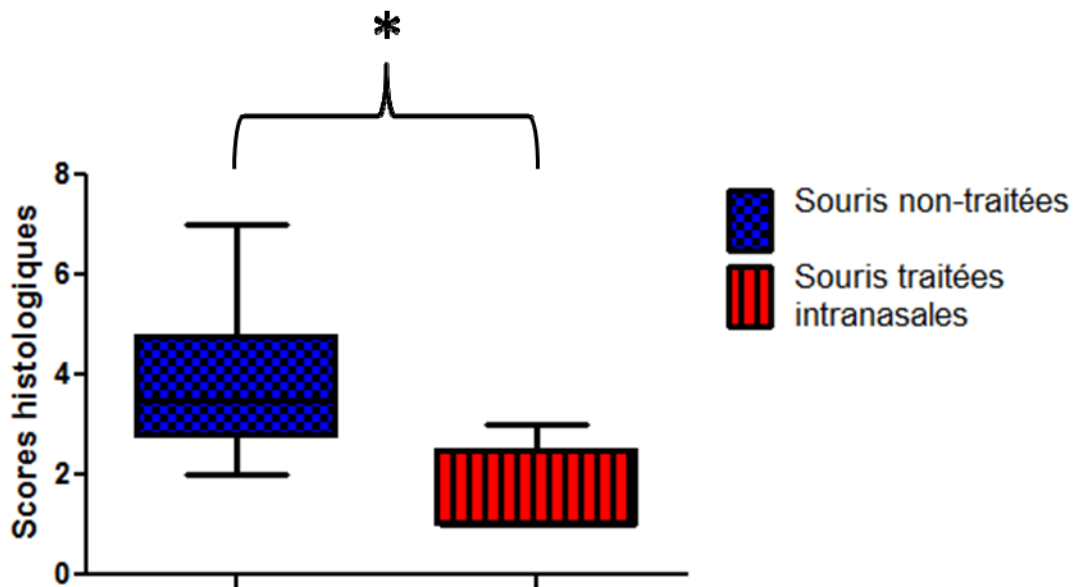


Figure 13 : Niveaux d'inflammation hépatique des souris xénoimmunisées et traitées par voie intranasale avec la protéine mFTCD en prophylaxie. L'inflammation des foies a été comparée entre le groupe de souris non-traitées (bleu) avec celles traitées intranasales (rouge). La différence entre les deux groupes a été évaluée avec un test t de Student ($p=0.0417$).

3.2.4 Pourcentage de Tregs intrahépatiques chez les souris xénoimmunisées traitées par voie intranasale.

L'analyse des niveaux de Tregs dans le foie a été réalisée par le logiciel Flowjo. La population de lymphocytes T CD4+, CD25+ et Foxp3+ dans les lymphocytes intrahépatiques a été marquée et analysée par cytométrie en flux afin de dénombrer les Tregs. Le pourcentage rapporté dans la figure 14 représente le nombre de Tregs retrouvé au sein des lymphocytes T CD4+. Les pourcentages de lymphocytes T régulateurs intrahépatiques dans les deux groupes expérimentaux ont été évalués et comparé après sacrifice. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée.

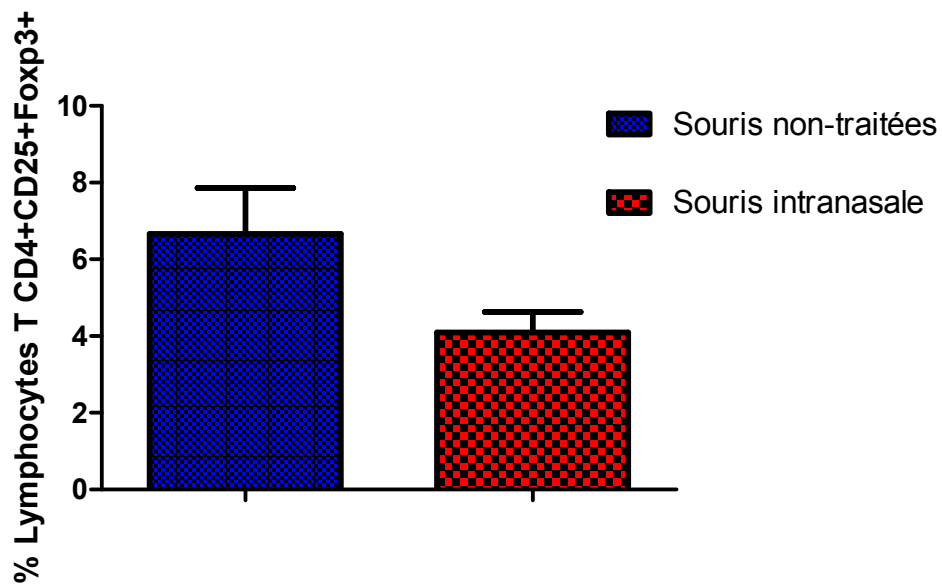


Figure 14 : Quantification des lymphocytes T régulateurs dans le foie des souris traitées par la voie intranasale. Le pourcentage de Tregs a été évalué parmi les lymphocytes T isolés du foie par les marqueurs CD4+, CD25+ et Foxp3+. La différence entre les deux groupes a été évaluée avec un test T de Student ($p=0.0542$)

Chapitre 4: Discussion

Les immunosuppresseurs utilisés pour le traitement de l'HAI induisent une immunosuppression non spécifique laissant place aux infections opportunistes. De plus, une utilisation prolongée de ces médicaments peut engendrer de graves effets secondaires qui détériorent la santé des patients. Le développement d'un modèle murin d'HAI dans le laboratoire nous offre la possibilité de développer des traitements plus efficaces. Le but de ce projet d'étude est de trouver des alternatives aux traitements conventionnels. Nous croyons que des traitements immunothérapeutiques plus ciblés et ayant moins d'effets secondaires amélioreraient grandement la qualité de vie des patients atteints d'HAI.

4.1 Traitement par l'anti-CD3ε

L'HAI de type 2 et le diabète de type 1 sont deux maladies autoimmunes qui présentent plusieurs caractéristiques similaires. Premièrement, ce sont des maladies médiées par les lymphocytes T qui causent la destruction d'un type cellulaire (hépatocytes et cellules β du pancréas). Les infiltrations inflammatoires retrouvées dans les deux maladies sont composées essentiellement de lymphocytes T CD4+, mais la présence d'autres cellules lymphocytaires comme les lymphocytes T CD8+ et les plasmocytes est aussi évidente^{48,96,156}. Deuxièmement, la hausse des niveaux d'alanine aminotransférase retrouvée dans l'HAI de type 2 peut être comparée à l'augmentation de la glycémie dans le diabète de type 1. Les deux sont causées par la destruction des cellules de l'organe ciblé dans chacune des maladies. Cependant, il y a une différence au niveau des traitements appliqués : dans le cas du DT1, le traitement consiste à contrôler les symptômes engendrés par la destruction du pancréas en diminuant la glycémie par l'utilisation d'insuline exogène. Pour l'HAI de type 2, les traitements servent plutôt à éliminer l'inflammation du foie en administrant des immunosuppresseurs non-spécifiques et permettre la régénération de l'organe. Malgré cette différence de traitement, l'HAI de type 2 et le DT1 ont un processus autoimmun commun qui est la reconnaissance d'autoantigènes par les lymphocytes T autoréactifs et la destruction des cellules ciblées par ces derniers. Le rôle des lymphocytes

T dans ces deux maladies occupe une place clé dans leur pathogénèse. Leur déplétion par des anticorps monoclonaux spécifiques pour des sous-populations lymphocytaires semble être un bon moyen de traiter ces maladies. L'anticorps anti-CD3 ϵ (OKT3) a été proposé comme traitement immunothérapeutique pour le DT1^{132,157,158} ainsi que pour plusieurs autres maladies autoimmunes¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. La capacité suppressive et tolérogénique de l'anti-CD3 ϵ fait de cet anticorps un bon candidat pour le traitement de l'HAI.

Nous avons appliqué la posologie mise au point par l'équipe de Chatenoud^{131,132} pour le traitement du DT1 (souris NOD) à l'HAI de type 2 dans notre modèle murin. Nous avons montré dans un premier temps l'efficacité du traitement en quantifiant les lymphocytes T CD3+ dans le sang périphérique. Une administration i.v. de 5 μ g d'anti-CD3 ϵ par jour durant 5 jours consécutifs induit une déplétion partielle et transitoire des lymphocytes T CD3+ (figure 3). Cette déplétion représente un avantage par rapport à l'immunosuppression non-spécifique induite par les traitements conventionnels car les souris traitées par l'anti-CD3 ϵ sont toujours immunocompétentes et sont capables de rejeter une greffe de peau¹³¹. Le même phénomène de déplétion est observable autant chez l'humain^{141,160}, avec les anticorps anti-CD3 ϵ humanisés, que chez les souris^{132,135}. Nos résultats montrent que le traitement d'anti-CD3 ϵ appliqué est efficace. La reconstitution lymphocytaire après la déplétion sera un aspect intéressant à étudier pour voir s'il y a un changement au niveau de la répartition des lymphocytes T dans les infiltrats lymphocytaires du foie et dans le sang périphérique. Pour ceux-ci, des marquages immuno-histochimiques des différentes populations lymphocytaires sur les coupes histologiques seraient envisageable. Ces résultats pourraient nous aider à expliquer la rémission que nous observons dans nos souris traitées à l'anti-CD3 ϵ .

À la lumière des résultats que nous avons obtenus, lorsque l'anti-CD3 ϵ est appliqué en prophylaxie, il ne prévient pas l'apparition de l'atteinte hépatique car un niveau similaire d'inflammation dans le foie a été retrouvé dans les deux groupes expérimentaux (figure 5). Cependant, le traitement semble avoir prévenu le dommage hépatique par une diminution des niveaux d'ALT chez les souris traitées (figure 4). Les lymphocytes T régulateurs ne

semblent pas être responsables de la diminution des ALT car une quantité similaire de ces lymphocytes est retrouvée dans le foie des deux groupes expérimentaux (figure 6). D'autres mécanismes sont donc responsables de cette diminution des ALT. Des résultats comparables ont été obtenus dans le DT1 où la prophylaxie d'anti-CD3 ϵ ne prévient pas l'apparition de la maladie¹³¹.

Au niveau clinique, seule la susceptibilité génétique prédisposera un individu à développer l'HAI au cours de sa vie. L'application du traitement prophylactique anti-CD3 ϵ chez les patients est donc limitée parce qu'il est actuellement impossible de déterminer avec certitude quelle population est à risque de développer une hépatite autoimmune. Cependant, les résultats de cette expérience nous permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'HAI de type 2.

En ce qui concerne le traitement avec les anticorps anti-CD3 ϵ chez les souris atteintes d'HAI de type 2, au niveau de l'inflammation du foie, nous avons réussi à induire une rémission définie comme une diminution significative de l'inflammation hépatique (figure 8-9) accompagnée d'une normalisation des niveaux d'ALT (figure 7). Afin d'évaluer l'efficacité de notre traitement pour la réduction de l'inflammation hépatique dans les souris traitées, le regroupement des souris ayant un score d'inflammation égal ou inférieur à 1, nous a permis de constater que seules les souris traitées montraient de tels scores (figure 10). Ce constat est une preuve de l'efficacité des anticorps anti-CD3 ϵ pour traiter l'HAI de type 2 dans notre modèle murin. Des résultats comparables ont aussi été retrouvés lors du traitement du diabète par l'anti-CD3 ϵ ¹³². Quand la posologie d'anti-CD3 ϵ est appliquée chez les souris NOD avec DT1 établi, une rémission est générée dans laquelle une normalisation des niveaux de glycémie et une diminution de l'insulite sont détectées. Elle est induite dans 64 à 80% des souris NOD traitées à l'anti-CD3 ϵ et peut durer plus de 4 mois. Cependant, malgré la normalisation de la glycémie, la persistance d'une insulite périphérique est toujours observable dans les pancréas des souris traitées¹³².

Il semble que la grande déplétion des lymphocytes T CD3⁺ dans le sang périphérique observée à la 2^e semaine post-traitement engendre une diminution significative de l'inflammation hépatique qui a été constatée une semaine plus tard soit à la 3^e semaine post-traitement. De plus, cette diminution de l'inflammation hépatique semble être associée à la normalisation des taux d'ALT observés à partir de la 4^e semaine post-traitement. À la lumière de ces résultats, nous avons exploré le mécanisme responsable de la rémission dans notre modèle. Nous avons choisi d'évaluer les niveaux des Tregs intrahépatiques (figure 11) car dans une étude sur le diabète autoimmun publiée par l'équipe de Chatenoud¹⁶¹ une augmentation significative des Tregs a été retrouvée dans les ganglions lymphatiques secondaires des souris NOD traitées par l'anti-CD3 ϵ . Notre évaluation des Tregs intrahépatiques a permis de détecter une augmentation significative des Tregs entre les deux groupes de souris traitées. Ces résultats suggèrent fortement que les Tregs sont responsables du maintien de la rémission.

Par la suite, nous avons évalué la capacité suppressive des Tregs sur les lymphocytes T isolés du foie (LIL, *liver infiltrated lymphocytes*) par des tests de prolifération et de cytotoxicité. En théorie, si les lymphocytes T autoréactifs sont tolérés par les Tregs, nous détecterons une moins grande prolifération et cytotoxicité des LIL dans les groupes de souris traitées à l'anti-CD3 ϵ . Malheureusement, les résultats que nous avons obtenus ne vont pas dans le même sens car aucune différence n'est observée dans les deux groupes expérimentaux pour les tests de cytotoxicité et de prolifération (données non-montrés). Cependant, nous croyons que ces deux tests ne sont pas assez sensibles pour détecter les différences et nécessitent encore d'être optimisés. Beaucoup de difficultés ont été rencontrées lors de la mise au point de ces deux méthodes. Premièrement, un des plus gros problèmes de travailler avec les LIL est la faible quantité isolée à partir du foie (environ 1.5 millions de lymphocytes par foie), limitant ainsi le nombre de tests que l'on peut réaliser. Nous avons mis au point des tests de cytotoxicité et de prolifération en utilisant une faible quantité de LIL, réduisant grandement la sensibilité de ces tests. Un moyen pour détourner ce problème est possiblement la combinaison des lymphocytes du

foie des souris provenant d'un même groupe (traitées et non traitées) pour avoir une quantité suffisante de cellules pour la réalisation des deux tests et ainsi augmenter leur sensibilité. De plus, une amélioration de la méthode de prolifération pourrait être apportée en incubant les lymphocytes du foie avec des APC isolées des rates de souris sauvages. Ceci nous permettra d'avoir une activation plus complète des LIL marqués au CFSE et d'augmenter la sensibilité du test. Pour le test de cytotoxicité, une incubation de seulement 4 heures n'était peut être pas suffisante pour détecter une différence de cytotoxicité entre les groupes expérimentaux. Une optimisation de ce test avec des périodes d'incubation plus longue pourrait sûrement augmenter la sensibilité du test.

Afin de confirmer l'implication des Tregs dans le processus de rémission, d'autres tests plus spécifiques doivent être effectués. Une des façons d'y parvenir est d'induire une déplétion *in vivo* des Tregs dans les souris en rémission à l'aide d'anticorps anti-CD25. En théorie, si les Tregs sont vraiment impliqués dans l'induction de la rémission, leur déplétion devrait inhiber l'effet protecteur de l'anti-CD3 ϵ ou devrait précipiter la rechute de l'HAI de type 2. Dans un même ordre d'idée, une injection d'une quantité de Tregs purifiés à partir de LIL isolés de souris traitées dans des souris avec d'HAI de type 2 établie devrait induire une rémission. Une autre façon d'évaluer si les lymphocytes T autoréactifs dans le foie sont tolérisés, serait de faire la coloration «*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*» ou Tunel sur des coupes histologiques. La coloration Tunel permet de marquer les cellules en apoptose. Si les lymphocytes T autoréactifs sont effectivement tolérants, on devrait observer moins d'hépatocytes en apoptose dans les zones d'infiltrat chez les souris traitées.

Nous avons aussi testé l'implication de TGF β dans le maintien de la rémission comme énoncé par le groupe de Chen et al.¹⁴⁰ qui prétend que la rémission induite chez les NOD est due à une augmentation du niveau de TGF β après le traitement par l'anti-CD3 ϵ . Nous avons testé les niveaux de TGF β dans les sérums des souris provenant du groupe sacrifié à 1 mois post-traitement. Chaque mois post-vaccination et chaque semaine post-

traitement a été comparé et évalué par ELISA pour le TGF β . Malheureusement, aucune différence de niveau de cytokine n'a été détectée (données non-montrées).

En somme, un traitement de courte durée et à faible dose d'anticorps anti-CD3 ϵ est suffisant pour induire une rémission d'une durée de plus de 3 mois chez les souris avec HAI de type 2 établi. Cette rémission est caractérisée par une diminution significative de l'inflammation hépatique accompagnée d'une normalisation des dommages hépatiques (niveau d'ALT). Elle apparaît chez plus de 40% des souris traitées et semble être orchestrée par les lymphocytes T régulateurs qui se sont accumulés dans le foie. Cependant, la même posologie d'anti-CD3 ϵ appliquée en prophylaxie ne s'avère pas être efficace pour prévenir l'apparition de l'HAI de type 2. L'ensemble de ces résultats suggère que les anticorps anti-CD3 ϵ sont un bon agent immunothérapeutique pour le traitement de l'HAI.

Cependant, d'autres recherches doivent être réalisées afin de confirmer l'efficacité de l'anti-CD3 ϵ et avant de pouvoir traiter l'HAI chez l'humain. Par exemple, est-ce qu'une plus forte dose influencera la durée de la rémission? Une étude a montré que la déplétion dépend de la dose d'anti-CD3 ϵ administrée. Une plus grande dose d'anti-CD3 ϵ induirait une plus forte déplétion après le traitement et les niveaux de lymphocytes T CD3+ prendraient plus de temps à revenir à la normale¹³¹. Toutefois, la durée de la rémission dans ces souris n'avait pas été examinée. Ce sera donc intéressant d'examiner cet aspect dans notre modèle murin d'HAI de type 2. Le seul effet secondaire connu pour l'anti-CD3 ϵ est sa mitogénécité, mais ce problème a été contourné en utilisant des anticorps anti-CD3 ϵ non-mitogéniques dans lesquels seules leurs parties Fab ont été conservées ((Fab)₂). L'application d'une plus forte dose de cet anticorps a induit une rémission similaire à celle retrouvée chez les souris NOD diabétiques traitées avec l'anti-CD3 ϵ mitogénique^{131,132,135}.

Enfin, des études intenses sur l'OKT3 ont permis la génération des anticorps anti-CD3 ϵ humanisés qui sont non-mitogéniques. Les anticorps huOKT3 γ 1Ala-Ala et ChAglyCD3 sont disponibles chez l'humain et sont utilisés déjà en essai clinique d'essai pour le traitement de divers maladies autoimmunes^{141,160,162,163} et dans la facilitation de la

prise de greffe^{127,164-167}. Les résultats obtenus dans ces études ont montré l'efficacité de ces deux anticorps dans le traitement et la prise de greffe sans effets secondaires majeurs. Vu l'avancé des études sur l'OKT3 et les formes humanisées de ces anticorps, le traitement de l'HAI avec les anticorps anti-CD3 ϵ sera facilement transférable chez l'humain.

4.2 Le traitement de l'HAI de type 2 par la voie intranasale avec la protéine mFTCD en prophylaxie

L'induction de la tolérance en utilisant la voie intranasale est une avenue non-invasive, donc forte intéressante pour le traitement de maladies autoimmunes. Le rétablissement de la tolérance envers des autoantigènes pourrait donc prévenir ou traiter ces maladies en rendant les lymphocytes T autoréactifs tolérants à l'autoantigène. L'avantage de la voie intranasale est son potentiel d'induire efficacement une tolérance envers la protéine ou peptide administré. Ceci a été démontré dans un modèle de souris d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), où les souris H-2^{uxs} possèdent des lymphocytes T spécifiques pour Ac1-9, MBP89-101 et PLP139-151. L'administration d'un des trois peptides par la voie intranasale arrive à induire une tolérance envers le peptide administré et à prévenir l'EAE¹⁴³.

Dans le but d'induire une tolérance ciblée et non-immunosuppressive de façon systémique, nous avons choisi d'utiliser la voie intranasale pour le traitement d'HAI de type 2 chez notre modèle murin. Dans ce volet d'expérimentation, nous avons exploré l'effet prophylactique de la mFTCD par la voie intranasale. La mFTCD est un des deux autoantigènes reconnus dans l'HAI de type 2^{40,48,168}. La tolérance envers cette protéine pourrait donc aider à la prévention de l'HAI de type 2. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que les souris traitées ont développé une inflammation hépatique beaucoup moins sévère que les souris non-traitées (figure 13). Malgré qu'il n'y ait pas de différence des niveaux des ALT (figure 12), nous pensons que ces derniers prendraient plus de temps à se normaliser comme on a observé chez les souris traitées à l'anti-CD3 ϵ où la normalisation des ALT survient une semaine après la diminution de l'inflammation

hépatique. Finalement, un examen des taux de lymphocytes T régulateurs intrahépatiques n'a révélé aucune différence entre les deux groupes expérimentaux. Ces résultats montrent certaines similitudes avec les résultats obtenus dans le modèle d'EAE^{169,170}, dans lequel un traitement avec le MBP complet chez les rats arrive à prévenir l'EAE en diminuant l'inflammation dans le système nerveux central. Ces résultats suggèrent que notre traitement intranasal avec la mFTCD pourrait prévenir l'HAI de type 2 dans notre modèle murin. Toutefois, d'autres groupes expérimentaux ainsi que d'autres expériences devraient être réalisés afin d'éclaircir l'efficacité et les mécanismes derrière cette prévention.

Premièrement, il faudrait savoir si cette diminution de l'inflammation hépatique observée chez les souris traitées persiste. Pour ce faire, d'autres groupes expérimentaux avec des temps de sacrifices différents doivent être réalisés. Ceci permettra aussi de savoir s'il y a une normalisation des ALT post-traitement. Pour explorer les mécanismes derrière la prévention, la littérature favorise l'hypothèse de l'IL-10 comme une cytokine médiatrice de la prévention de l'EAE^{151,171-173}. Nous pourrions donc évaluer les niveaux d'IL-10 dans nos souris traitées: en mesurant l'IL-10 avant et après le traitement à partir des sérums des souris par ELISA. Si l'IL-10 est bien la cytokine responsable de la prévention d'HAI de type 2 dans notre modèle murin, une augmentation de cette cytokine après le traitement intranasal devrait être détectée. Une autre façon plus spécifique est d'évaluer la sécrétion d'IL-10 par les splénocytes activés *in vivo* en comparant les deux groupes expérimentaux¹⁵¹. De plus, nous devons aussi tester la tolérogénicité des lymphocytes T isolés du foie et des rates par les tests de cytotoxicité et de prolifération. Si les LIL sont tolérisés par le traitement intranasal, ces lymphocytes devraient moins proliférer et engendrer moins de cytotoxicité que les souris non-traitées en présence de la protéine mFTCD¹⁷⁴.

Dans ce traitement par la voie intranasale, nous avons utilisé la protéine complète mFTCD. Comme la protéine intacte de la MBP pour la prévention de l'EAE, nous avons réussi à prévenir l'HAI de type 2 en diminuant l'inflammation hépatique. Cependant, il y a une vaste littérature concernant le traitement intranasal de l'EAE par l'usage de peptides

portant des épitopes majeurs reconnus par les lymphocytes T. Ces différents peptides peuvent à la fois prévenir et traiter l'EAE^{143,145-147,172,174}. Le traitement d'HAI de type 2 avec des peptides de la mFTCD portant les épitopes majeurs reconnus par les cellules T pourrait donc donner des résultats convaincants.

Finalement, une des expériences futures que l'on pourrait envisager est une combinaison des deux immunothérapies étudiées dans ce projet. Une étude publiée par l'équipe de Bresson et al. a montré que la combinaison de l'anti-CD3 ϵ avec l'application intranasale de pro-insuline induit une rémission chez un plus grand nombre de souris NOD avec DT1 établi. Cette rémission est caractérisée par une plus importante augmentation des Tregs insuline spécifiques sécrétant des grandes quantités de cytokines immunorégulatrices tels que l'IL-10 et TGF β ¹⁷⁵. L'application de cette combinaison pour le traitement de l'HAI de type 2 dans notre modèle murin aurait sûrement une plus grande efficacité sur le traitement de la maladie.

Chapitre 5 : Perspectives et Conclusions

Les deux immunothérapies mises à l'essai dans ce projet représentent les premiers traitements alternatifs réalisés dans un modèle murin d'HAI. L'ensemble des résultats que nous avons obtenus montre que le traitement par les anticorps déplétant anti-CD3 ϵ et l'induction de la tolérance par la voie intranasale sont deux voies de traitement prometteuses pour la prévention et le traitement de l'HAI de type 2.

Le traitement d'anti-CD3 ϵ permet une rémission en diminuant à la fois l'inflammation hépatique et le dommage hépatique lorsque le traitement est appliqué chez les souris avec HAI de type 2 établie. La déplétion partielle et transitoire induite par le traitement présente un net avantage sur les traitements conventionnels. De plus, avec l'élimination de l'effet mitogénique de cet anticorps en utilisant les parties (Fab)₂ ou les anticorps humanisées huOKT3 γ 1 Ala-Ala et ChAglyCD3, aucun effet secondaire n'apparaît lors de son utilisation. Le protocole de l'anti-CD3 ϵ a aussi l'avantage d'être de courte durée avec de faibles doses. Ce traitement permettra donc d'éviter les effets secondaires induits lors d'une utilisation prolongée des immunosuppresseurs et d'améliorer grandement la santé et la qualité de vie des patients atteints d'HAI. L'OKT3 représente donc un candidat idéal pour le traitement de l'HAI chez l'humain.

La tolérance par la voie intranasale avec la protéine mFTCD a permis de prévenir l'HAI de type 2 dans notre modèle murin en diminuant l'inflammation hépatique. Cette voie de traitement a aussi l'avantage d'être de courte durée et n'induit aucune immunosuppression. De plus, le traitement est simple à administrer et ne requiert pas d'hospitalisation. Ce simple traitement pourrait s'appliquer aux personnes susceptibles de développer l'HAI pour ainsi prévenir la maladie.

En somme, les immunothérapies représentent une voie alternative efficace et plus ciblée et ayant moins d'effets secondaires que les traitements conventionnels. Malgré les résultats encourageants que nous avons obtenus, des expériences supplémentaires doivent être réalisées afin de valider les deux voies de traitement. Dans le futur, d'autres

immunothérapies pourraient éventuellement être évaluées comme les anticorps anti-CD20 (rituximab), l'anti-CD4 ou la tolérance dermique.

Bibliographie

1. Arstila, T.P., *et al.* A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286, 958-961 (1999).
2. Klein, L. & Kyewski, B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* 12, 179-186 (2000).
3. An autoimmune disease, APECED, caused by mutations in a novel gene featuring two PHD-type zinc-finger domains. *Nat Genet* 17, 399-403 (1997).
4. Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R. & Heath, W.R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 188, 409-414 (1998).
5. Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den Broek, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-286 (2005).
6. Tivol, E.A., *et al.* Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547 (1995).
7. Fisher, G.H., *et al.* Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946 (1995).
8. Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6, 345-352 (2005).
9. Singh, B., *et al.* Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 182, 190-200 (2001).
10. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164 (1995).
11. Gambineri, E., Torgerson, T.R. & Ochs, H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 15, 430-435 (2003).
12. Wildin, R.S., Smyk-Pearson, S. & Filipovich, A.H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 39, 537-545 (2002).

13. Takahashi, T., *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 192, 303-310 (2000).
14. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192, 295-302 (2000).
15. Wing, K., *et al.* CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322, 271-275 (2008).
16. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10113-10118 (2008).
17. Dejean, A.S., *et al.* Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 504-513 (2009).
18. Shevach, E.M. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30, 636-645 (2009).
19. Vignali, D.A., Collison, L.W. & Workman, C.J. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532 (2008).
20. Tang, Q. & Bluestone, J.A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9, 239-244 (2008).
21. Sheth, K. & Bankey, P. The liver as an immune organ. *Curr Opin Crit Care* 7, 99-104 (2001).
22. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54-62 (2006).
23. Warren, A., *et al.* T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 44, 1182-1190 (2006).
24. Lapierre, P. & Alvarez, F. [The liver: an organ of the immune system?]. *Med Sci (Paris)* 23, 985-990 (2007).
25. Rasmussen, A., Davies, H.F., Jamieson, N.V., Evans, D.B. & Calne, R.Y. Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation* 59, 919-921 (1995).
26. Sun, J., McCaughan, G.W., Gallagher, N.D., Sheil, A.G. & Bishop, G.A. Deletion of spontaneous rat liver allograft acceptance by donor irradiation. *Transplantation* 60, 233-236 (1995).
27. Knolle, P., *et al.* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 22, 226-229 (1995).

28. Mars, L.T., *et al.* Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 168, 6007-6011 (2002).
29. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J.E. & Roncarolo, M.G. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 184, 19-29 (1996).
30. Behar, S.M., Dascher, C.C., Grusby, M.J., Wang, C.R. & Brenner, M.B. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189, 1973-1980 (1999).
31. Kumar, H., Belperron, A., Barthold, S.W. & Bockenstedt, L.K. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 165, 4797-4801 (2000).
32. Roland, C.R., Mangino, M.J., Duffy, B.F. & Flye, M.W. Lymphocyte suppression by Kupffer cells prevents portal venous tolerance induction: a study of macrophage function after intravenous gadolinium. *Transplantation* 55, 1151-1158 (1993).
33. Lauwerys, B.R., Garot, N., Renaud, J.C. & Houssiau, F.A. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *J Immunol* 165, 1847-1853 (2000).
34. Limmer, A., *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-1354 (2000).
35. Knolle, P.A., *et al.* Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116, 1428-1440 (1999).
36. Higgins, G., Kelsall, A.R. & *et al.* Ascites in chronic disease of the liver. *Q J Med* 16, 263-274 (1947).
37. Waldenstrom, J. The diagnostic importance of ACTH. *Acta Endocrinol (Copenh)* 5, 235-242 (1950).
38. Cowling, D.C., Mackay, I.R. & Taft, L.I. Lupoid hepatitis. *Lancet* 271, 1323-1326 (1956).
39. Mackay, I.R., Weiden, S. & Hasker, J. Autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci* 124, 767-780 (1965).
40. Alvarez, F. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Clin Liver Dis* 10, 89-107, vi (2006).
41. Beland, K., Lapierre, P. & Alvarez, F. Influence of genes, sex, age and environment on the onset of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 15, 1025-1034 (2009).
42. Summerskill, W.H., Korman, M.G., Ammon, H.V. & Baggenstoss, A.H. Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut* 16, 876-883 (1975).

43. Alvarez, F., *et al.* Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. *J Hepatol* 30, 222-227 (1999).
44. Debray, D., Maggiore, G., Girardet, J.P., Mallet, E. & Bernard, O. Efficacy of cyclosporin A in children with type 2 autoimmune hepatitis. *J Pediatr* 135, 111-114 (1999).
45. Gregorio, G.V., *et al.* Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology* 25, 541-547 (1997).
46. Johnson, P.J. & McFarlane, I.G. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 18, 998-1005 (1993).
47. Boberg, K.M., *et al.* Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 33, 99-103 (1998).
48. Vergani, D., Longhi, M.S., Bogdanos, D.P., Ma, Y. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *Semin Immunopathol* 31, 421-435 (2009).
49. Manns, M.P. & Strassburg, C.P. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 120, 1502-1517 (2001).
50. Davis, P. & Read, A.E. Antibodies to double-stranded (native) DNA in active chronic hepatitis. *Gut* 16, 413-415 (1975).
51. Wesierska-Gadek, J., Penner, E., Hitchman, E. & Sauermann, G. Antibodies to nuclear lamins in autoimmune liver disease. *Clin Immunol Immunopathol* 49, 107-115 (1988).
52. Penner, E., Kindas-Mugge, I., Hitchman, E. & Sauermann, G. Nuclear antigens recognized by antibodies present in liver disease sera. *Clin Exp Immunol* 63, 428-433 (1986).
53. Johnson, G.D., Holborow, E.J. & Glynn, L.E. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet* 2, 878-879 (1965).
54. Whitehouse, J.M. & Holborow, E.J. Smooth muscle antibody in malignant disease. *Br Med J* 4, 511-513 (1971).
55. Wasserman, J., Glas, U. & Blomgren, H. Autoantibodies in patients with carcinoma of the breast. Correlation with prognosis. *Clin Exp Immunol* 19, 417-422 (1975).
56. Holborow, E.J., Hemsted, E.H. & Mead, S.V. Smooth muscle autoantibodies in infectious mononucleosis. *Br Med J* 3, 323-325 (1973).
57. Andersen, P. & Andersen, H.K. Smooth-muscle antibodies and other tissue antibodies in cytomegalovirus infection. *Clin Exp Immunol* 22, 22-29 (1975).
58. Andersen, P., Small, J.V. & Sobieszek, A. Studies on the specificity of smooth-muscle antibodies. *Clin Exp Immunol* 26, 57-66 (1976).
59. Poralla, T., Treichel, U., Lohr, H. & Fleischer, B. The asialoglycoprotein receptor as target structure in autoimmune liver diseases. *Semin Liver Dis* 11, 215-222 (1991).

60. Mulder, A.H., *et al.* Prevalence and characterization of neutrophil cytoplasmic antibodies in autoimmune liver diseases. *Hepatology* 17, 411-417 (1993).
61. Targan, S.R., Landers, C., Vidrich, A. & Czaja, A.J. High-titer antineutrophil cytoplasmic antibodies in type-1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 108, 1159-1166 (1995).
62. Baeres, M., *et al.* Establishment of standardised SLA/LP immunoassays: specificity for autoimmune hepatitis, worldwide occurrence, and clinical characteristics. *Gut* 51, 259-264 (2002).
63. Ballot, E., Homberg, J.C. & Johanet, C. Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 33, 208-215 (2000).
64. 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* 35, 485-492 (2002).
65. Wies, I., *et al.* Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 355, 1510-1515 (2000).
66. Volkmann, M., *et al.* Soluble liver antigen: isolation of a 35-kd recombinant protein (SLA-p35) specifically recognizing sera from patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 33, 591-596 (2001).
67. Czaja, A.J., Shums, Z. & Norman, G.L. Frequency and significance of antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas in variant autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 35, 475-483 (2002).
68. Ma, Y., *et al.* Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease. *Hepatology* 35, 658-664 (2002).
69. Czaja, A.J., Donaldson, P.T. & Lohse, A.W. Antibodies to soluble liver antigen/liver pancreas and HLA risk factors for type 1 autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 97, 413-419 (2002).
70. Rizzetto, M., Swana, G. & Doniach, D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clin Exp Immunol* 15, 331-344 (1973).
71. 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* 168, 801-806 (1988).
72. Kerkar, N., *et al.* Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 170, 1481-1489 (2003).
73. Muratori, L., *et al.* Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 34, 494-501 (2001).

74. 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* 33, 1869-1878 (2003).
75. Abuaf, N., *et al.* Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 16, 892-898 (1992).
76. Maggiore, G., *et al.* Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 17, 376-381 (1993).
77. Alvarez, F., *et al.* International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 31, 929-938 (1999).
78. Strettell, M.D., *et al.* Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 112, 2028-2035 (1997).
79. Doherty, D.G., *et al.* Allelic sequence variation in the HLA class II genes and proteins in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 19, 609-615 (1994).
80. Seki, T., *et al.* HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 103, 1041-1047 (1992).
81. Seki, T., Kiyosawa, K., Inoko, H. & Ota, M. Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology* 12, 1300-1304 (1990).
82. Marcos, Y., *et al.* Two-locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology* 19, 1371-1374 (1994).
83. Fainboim, L., *et al.* Chronic active autoimmune hepatitis in children. Strong association with a particular HLA-DR6 (DRB1*1301) haplotype. *Hum Immunol* 41, 146-150 (1994).
84. Vazquez-Garcia, M.N., *et al.* MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 28, 985-990 (1998).
85. Bittencourt, P.L., *et al.* Different HLA profiles confer susceptibility to autoimmune hepatitis type 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 93, 1394-1395 (1998).
86. Bittencourt, P.L., *et al.* Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *Am J Gastroenterol* 94, 1906-1913 (1999).
87. 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* 40, 904-909 (2004).
88. Djilali-Saiah, I., *et al.* HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 45, 844-850 (2006).
89. Czaja, A.J., Carpenter, H.A., Santrach, P.J. & Moore, S.B. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 105, 1502-1507 (1993).

90. Czaja, A.J., *et al.* Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 25, 317-323 (1997).
91. Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 90, 196-203 (1992).
92. Sandgren, E.P., *et al.* Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell* 66, 245-256 (1991).
93. Rudner, L.A., *et al.* Necroinflammatory liver disease in BALB/c background, TGF-beta 1-deficient mice requires CD4+ T cells. *J Immunol* 170, 4785-4792 (2003).
94. Mori, Y., *et al.* Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice. *Clin Exp Immunol* 57, 85-92 (1984).
95. Lohse, A.W., Manns, M., Dienes, H.P., Meyer zum Buschenfelde, K.H. & Cohen, I.R. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology* 11, 24-30 (1990).
96. Lapierre, P., Djilali-Saiah, I., Vitozzi, S. & Alvarez, F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 39, 1066-1074 (2004).
97. Hardtke-Wolenski, M. & Jaeckel, E. Mouse models for experimental autoimmune hepatitis: limits and chances. *Dig Dis* 28, 70-79 (2010).
98. Djilali-Saiah, I., Lapierre, P., Vitozzi, S. & Alvarez, F. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 169, 4889-4896 (2002).
99. Mori, Y., *et al.* Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice: transfer of spleen cells sensitized with liver proteins. *Clin Exp Immunol* 61, 577-584 (1985).
100. Kuriki, J., *et al.* Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Gastroenterology* 84, 596-603 (1983).
101. Lohse, A.W., Brunner, S., Kyriatsoulis, A., Manns, M. & Meyer zum Buschenfelde, K.H. Autoantibodies in experimental autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 14, 48-53 (1992).
102. Lohse, A.W. & Meyer zum Buschenfelde, K.H. Remission of experimental autoimmune hepatitis is associated with antigen-specific and non-specific immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 94, 163-167 (1993).
103. Howell, C.D. & Yoder, T.D. Murine experimental autoimmune hepatitis: nonspecific inflammation due to adjuvant oil. *Clin Immunol Immunopathol* 72, 76-82 (1994).
104. Toyonaga, T., *et al.* Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 614-618 (1994).

105. Voehringer, D., *et al.* Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 165, 2415-2422 (2000).
106. Gorham, J.D., Lin, J.T., Sung, J.L., Rudner, L.A. & French, M.A. Genetic regulation of autoimmune disease: BALB/c background TGF-beta 1-deficient mice develop necroinflammatory IFN-gamma-dependent hepatitis. *J Immunol* 166, 6413-6422 (2001).
107. Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045 (1985).
108. Fujinami, R.S., Oldstone, M.B., Wroblewska, Z., Frankel, M.E. & Koprowski, H. Molecular mimicry in virus infection: crossreaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2346-2350 (1983).
109. Wucherpfennig, K.W. & Strominger, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705 (1995).
110. Olson, J.K., Croxford, J.L., Calenoff, M.A., Dal Canto, M.C. & Miller, S.D. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108, 311-318 (2001).
111. Gauntt, C.J., *et al.* Coxsackievirus-induced chronic myocarditis in murine models. *Eur Heart J* 16 Suppl O, 56-58 (1995).
112. Zhao, Z.S., Granucci, F., Yeh, L., Schaffer, P.A. & Cantor, H. Molecular mimicry by herpes simplex virus-type 1: autoimmune disease after viral infection. *Science* 279, 1344-1347 (1998).
113. 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* 26, 82-89 (2006).
114. 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 (2010).
115. Zierden, M., Odenthal, E.K. & Dienes, H.P. Effects and Regulation of Autoreactive CD8(+) T Cells in a Transgenic Mouse Model of Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology* (2010).
116. Soloway, R.D., *et al.* Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis. *Gastroenterology* 63, 820-833 (1972).
117. Fernandes, N.F., Redeker, A.G., Vierling, J.M., Villamil, F.G. & Fong, T.L. Cyclosporine therapy in patients with steroid resistant autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol* 94, 241-248 (1999).
118. Lohse, A.W. & Mieli-Vergani, G. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* (2010).

119. Cuarterolo, M., *et al.* Follow-up of children with autoimmune hepatitis treated with cyclosporine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43, 635-639 (2006).
120. Ratziu, V., *et al.* Long-term follow-up after liver transplantation for autoimmune hepatitis: evidence of recurrence of primary disease. *J Hepatol* 30, 131-141 (1999).
121. Kung, P., Goldstein, G., Reinherz, E.L. & Schlossman, S.F. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 206, 347-349 (1979).
122. Van Wauwe, J.P., De Mey, J.R. & Goossens, J.G. OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. *J Immunol* 124, 2708-2713 (1980).
123. Abramowicz, D., *et al.* Release of tumor necrosis factor, interleukin-2, and gamma-interferon in serum after injection of OKT3 monoclonal antibody in kidney transplant recipients. *Transplantation* 47, 606-608 (1989).
124. Ferran, C., *et al.* Cytokine-related syndrome following injection of anti-CD3 monoclonal antibody: further evidence for transient in vivo T cell activation. *Eur J Immunol* 20, 509-515 (1990).
125. Chatenoud, L., Legendre, C., Ferran, C., Bach, J.F. & Kreis, H. Corticosteroid inhibition of the OKT3-induced cytokine-related syndrome--dosage and kinetics prerequisites. *Transplantation* 51, 334-338 (1991).
126. Van Lier, R.A., Boot, J.H., De Groot, E.R. & Aarden, L.A. Induction of T cell proliferation with anti-CD3 switch-variant monoclonal antibodies: effects of heavy chain isotype in monocyte-dependent systems. *Eur J Immunol* 17, 1599-1604 (1987).
127. Cosimi, A.B., *et al.* Use of monoclonal antibodies to T-cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N Engl J Med* 305, 308-314 (1981).
128. Vigerel, P., *et al.* Prophylactic use of OKT3 monoclonal antibody in cadaver kidney recipients. Utilization of OKT3 as the sole immunosuppressive agent. *Transplantation* 41, 730-733 (1986).
129. Chatenoud, L., *et al.* In vivo cell activation following OKT3 administration. Systemic cytokine release and modulation by corticosteroids. *Transplantation* 49, 697-702 (1990).
130. Hirsch, R., Bluestone, J.A., DeNenno, L. & Gress, R.E. Anti-CD3 F(ab')₂ fragments are immunosuppressive in vivo without evoking either the strong humoral response or morbidity associated with whole mAb. *Transplantation* 49, 1117-1123 (1990).
131. Chatenoud, L., Primo, J. & Bach, J.F. CD3 antibody-induced dominant self tolerance in overtly diabetic NOD mice. *J Immunol* 158, 2947-2954 (1997).
132. Chatenoud, L., Thervet, E., Primo, J. & Bach, J.F. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 123-127 (1994).

133. Hirsch, R., Gress, R.E., Pluznik, D.H., Eckhaus, M. & Bluestone, J.A. Effects of in vivo administration of anti-CD3 monoclonal antibody on T cell function in mice. II. In vivo activation of T cells. *J Immunol* 142, 737-743 (1989).
134. Chatenoud, L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 3, 123-132 (2003).
135. Herold, K.C., *et al.* Prevention of autoimmune diabetes with nonactivating anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes* 41, 385-391 (1992).
136. Chatenoud, L., *et al.* Human in vivo antigenic modulation induced by the anti-T cell OKT3 monoclonal antibody. *Eur J Immunol* 12, 979-982 (1982).
137. Caillat-Zucman, S., *et al.* The OKT3 immunosuppressive effect. In situ antigenic modulation of human graft-infiltrating T cells. *Transplantation* 49, 156-160 (1990).
138. Plain, K.M., Chen, J., Merten, S., He, X.Y. & Hall, B.M. Induction of specific tolerance to allografts in rats by therapy with non-mitogenic, non-depleting anti-CD3 monoclonal antibody: association with TH2 cytokines not anergy. *Transplantation* 67, 605-613 (1999).
139. You, S., *et al.* Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6335-6340 (2007).
140. Chen, G., *et al.* Essential roles of TGF-beta in anti-CD3 antibody therapy: reversal of diabetes in nonobese diabetic mice independent of Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 83, 280-287 (2008).
141. Herold, K.C., *et al.* Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 346, 1692-1698 (2002).
142. Bai, X.F. & Link, H. Nasal tolerance induction as a potential means of immunotherapy for autoimmune diseases: implications for clinical medicine. *Clin Exp Allergy* 30, 1688-1696 (2000).
143. Anderton, S.M. & Wraith, D.C. Hierarchy in the ability of T cell epitopes to induce peripheral tolerance to antigens from myelin. *Eur J Immunol* 28, 1251-1261 (1998).
144. Groux, H., *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389, 737-742 (1997).
145. Metzler, B. & Wraith, D.C. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int Immunol* 5, 1159-1165 (1993).
146. Xu, L.Y., *et al.* Suppression of ongoing experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in Lewis rats: synergistic effects of myelin basic protein (MBP) peptide 68-86 and IL-4. *Clin Exp Immunol* 120, 526-531 (2000).

147. Xu, L.Y., *et al.* Combined nasal administration of encephalitogenic myelin basic protein peptide 68-86 and IL-10 suppressed incipient experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin Immunol* 96, 205-211 (2000).
148. Rivers, T.M., Sprunt, D.H. & Berry, G.P. Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58, 39-53 (1933).
149. Heber-Katz, E. The relationship between human multiple sclerosis and rodent experimental allergic encephalomyelitis. *Ann N Y Acad Sci* 756, 283-293 (1995).
150. Hafler, D.A. & Weiner, H.L. MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunol Today* 10, 104-107 (1989).
151. Massey, E.J., *et al.* Intranasal peptide-induced peripheral tolerance: the role of IL-10 in regulatory T cell function within the context of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Vet Immunol Immunopathol* 87, 357-372 (2002).
152. Roncarolo, M.G. & Levings, M.K. The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 12, 676-683 (2000).
153. Sundstedt, A., *et al.* Immunoregulatory role of IL-10 during superantigen-induced hyporesponsiveness in vivo. *J Immunol* 158, 180-186 (1997).
154. Willenborg, D.O., Fordham, S.A., Cowden, W.B. & Ramshaw, I.A. Cytokines and murine autoimmune encephalomyelitis: inhibition or enhancement of disease with antibodies to select cytokines, or by delivery of exogenous cytokines using a recombinant vaccinia virus system. *Scand J Immunol* 41, 31-41 (1995).
155. Ishak, K., *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 22, 696-699 (1995).
156. Pozzilli, P., Strollo, R. & Barchetta, I. Natural history and immunopathogenesis of type 1 diabetes. *Endocrinol Nutr* 56 Suppl 4, 50-52 (2009).
157. Steffens, S., *et al.* Short-term treatment with anti-CD3 antibody reduces the development and progression of atherosclerosis in mice. *Circulation* 114, 1977-1984 (2006).
158. Chatenoud, L. CD3-specific antibodies as promising tools to aim at immune tolerance in the clinic. *Int Rev Immunol* 25, 215-233 (2006).
159. Kohm, A.P., *et al.* Treatment with nonmitogenic anti-CD3 monoclonal antibody induces CD4+ T cell unresponsiveness and functional reversal of established experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 174, 4525-4534 (2005).
160. Keymeulen, B., *et al.* Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352, 2598-2608 (2005).
161. Belghith, M., *et al.* TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nat Med* 9, 1202-1208 (2003).

162. Utset, T.O., *et al.* Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol* 29, 1907-1913 (2002).
163. Herold, K.C., *et al.* A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54, 1763-1769 (2005).
164. Cosimi, A.B., *et al.* Treatment of acute renal allograft rejection with OKT3 monoclonal antibody. *Transplantation* 32, 535-539 (1981).
165. Friend, P.J., *et al.* Phase I study of an engineered aglycosylated humanized CD3 antibody in renal transplant rejection. *Transplantation* 68, 1632-1637 (1999).
166. Woodle, E.S., *et al.* Phase I trial of a humanized, Fc receptor nonbinding OKT3 antibody, huOKT3gamma1(Ala-Ala) in the treatment of acute renal allograft rejection. *Transplantation* 68, 608-616 (1999).
167. Hering, B.J., *et al.* Transplantation of cultured islets from two-layer preserved pancreases in type 1 diabetes with anti-CD3 antibody. *Am J Transplant* 4, 390-401 (2004).
168. Lapierre, P., Beland, K. & Alvarez, F. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 149, 107-113 (2007).
169. Bai, X.F., *et al.* Nasal administration of myelin basic protein prevents relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats by activating regulatory cells expressing IL-4 and TGF-beta mRNA. *J Neuroimmunol* 80, 65-75 (1997).
170. Li, H.L., Liu, J.Q., Bai, X.F., van der Meide, P.H. & Link, H. Dose-dependent mechanisms relate to nasal tolerance induction and protection against experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Immunology* 94, 431-437 (1998).
171. Sundstedt, A., O'Neill, E.J., Nicolson, K.S. & Wraith, D.C. Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *J Immunol* 170, 1240-1248 (2003).
172. O'Neill, E.J., Day, M.J. & Wraith, D.C. IL-10 is essential for disease protection following intranasal peptide administration in the C57BL/6 model of EAE. *J Neuroimmunol* 178, 1-8 (2006).
173. Bettelli, E., *et al.* IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 161, 3299-3306 (1998).
174. Burkhart, C., Liu, G.Y., Anderton, S.M., Metzler, B. & Wraith, D.C. Peptide-induced T cell regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for IL-10. *Int Immunol* 11, 1625-1634 (1999).

175. **Bresson, D., et al. Anti-CD3 and nasal proinsulin combination therapy enhances remission from recent-onset autoimmune diabetes by inducing Tregs. *J Clin Invest* 116, 1371-1381 (2006).**

