

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

**Étude de l'autoimmunité contre le foie induite par
mimétisme moléculaire**

par
Chantal Piché

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

Avril, 2008

© Chantal Piché, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'autoimmunité contre le foie induite par
mimétisme moléculaire**

présenté par :
Chantal Piché

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Françoise LeDeist PhD, présidente-rapporteuse
Dr Fernando Alvarez MD PhD, directeur de recherche
Dr Hugo Soudeyns PhD, co-directeur
Dr Marc Bilodeau PhD, membre du jury

Résumé

L'hépatite autoimmune (HAI) est une maladie d'étiologie inconnue qui est caractérisée par la destruction progressive du parenchyme hépatique. Afin de mieux définir cette atteinte autoimmune, les mécanismes régissant l'équilibre immunologique entre la tolérance et l'immunité du foie doivent être élucidés. Pour ce faire, un adénovirus recombinant exprimant les deux autoantigènes majeurs impliqués dans l'HAI de type 2, soit le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) et la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD), a été créé. L'impact de différentes doses d'adénovirus recombinants ainsi que du site d'injection sur la réponse immune ont été évalués. Nous avons montré que le site d'injection ainsi que la charge virale avaient une incidence sur le type (Th1/Th2) et l'intensité de la réponse immunitaire engendrée. Précédemment, il a été montré dans un modèle animal que trois vaccinations à ADN consécutives d'un plasmide codant pour le CYP2D6 et la FTCD pouvaient déclencher une HAI. La présente étude suggère qu'il est possible de prévenir le développement de ce processus autoimmun par une injection intraveineuse d'un Ad-CTLA-4-2D6-FTCD préalablement aux injections d'ADN. Il semble que l'expression des autoantigènes dans un contexte inflammatoire généré par l'adénovirus recombinant en combinaison avec une stimulation constante des clones T activés en périphérie induiraient une tolérance face à ces autoantigènes. De plus, ce processus s'avère spécifique à l'antigène puisque la présence d'une HAI chez les souris ayant été injectées avec l'Ad contrôle (Ad contrôle + ADN) a été observée. Somme toute, ce modèle a permis de mieux caractériser les processus menant au développement d'une réaction autoimmune contre le foie.

Mots-clés : Hépatite autoimmune (HAI), Tolérance hépatique, Adénovirus recombinant, Mimétisme moléculaire

Abstract

Autoimmune hepatitis (AIH) is a disease of unknown aetiology characterised by a progressive destruction of the hepatic parenchyma. In order to acquire a better understanding of this autoimmune process, the mechanisms governing the immunological balance between tolerance and immunity in the liver have to be identified. To do so, we generated a recombinant adenovirus expressing the two major autoantigens found in type 2 AIH, cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) and formiminotransferase cyclodeaminase (FTCD). The effects of viral load and injection site on the immune response were studied. Both the site of injection and amount of recombinant adenovirus were found to influence the phenotype (Th1/Th2) and magnitude of the immune response. In a previous murine model of AIH, three consecutive DNA vaccinations with a plasmid encoding for CYP2D6 and FTCD resulted in the onset of an AIH. In the present study, we observed that this autoimmune process can be prevented by an intravenous injection of Ad-CTLA-4-2D6-FTCD before DNA vaccination. It seems that the expression of the autoantigens in an inflammatory environment in combination with a constant stimulation of T-cell clones would yield to a tolerization toward these autoantigens. Moreover, this tolerization is antigen specific, since animals that received the control adenovirus (control Ad + DNA) developed AIH. In summary, this animal model allowed the characterisation of immune mechanisms involved in the development of liver autoimmunity.

Keywords : Autoimmune hepatitis (AIH), Hepatic tolerance, Recombinant adenovirus, CYP2D6, FTCD, Molecular mimicry

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 Mécanismes de tolérance.....	1
1.1.1 Tolérance centrale.....	1
1.1.2 Tolérance périphérique.....	3
1.1.2.1 Facteurs intrinsèques.....	3
1.1.2.2 Facteurs extrinsèques.....	4
1.2 Autoimmunité.....	5
1.2.1 Susceptibilité génétique.....	5
1.2.2.1 MAI monogéniques.....	6
1.2.2.1 MAI à traits complexes.....	8
1.2.2 Facteurs environnementaux.....	9
1.3 Immunologie du foie.....	11
1.3.1 Constituants du foie.....	12
1.3.1.1 Lymphocytes conventionnels.....	12
1.3.1.2 Lymphocytes non-conventionnels.....	14
1.3.2 Organe de tolérance.....	15
1.4 Maladies autoimmunes du foie.....	16
1.4.1 Cirrhose biliaire primitive.....	16
1.4.2 Cholangite sclérosante primitive.....	19

1.4.3 Hépatite autoimmune (HAI)	21
1.4.3.1 Diagnostic	22
1.4.3.3 Réponse à médiation cellulaire	25
1.4.3.4 Système de pointage.....	27
1.4.3.5 Susceptibilité génétique	28
1.4.3.3 Facteurs environnementaux	30
1.4.3.4 Traitements.....	31
1.5 Modèles animaux d'HAI.....	33
1.5.1 Injection du S-100	34
1.5.2 Concanavaleine A	34
1.5.3 Souris transgénique IFN- γ	35
1.5.4 Souris transgénique Alb-GP33.....	36
1.5.5 Souris invalidée pour le TGF- β 1.....	37
1.5.6 Souris transgénique TTR-NP	38
1.5.7 Xénoimmunisation avec des autoantigènes humains.....	38
1.6 Adénovirus	39
1.6.1 Biologie et pathogenèse	39
1.6.2 Vaccin et thérapie génique.....	40

2.2.1 Types cellulaires utilisés	48
2.2.2 Transfection	48
2.2.3 Sélection d'un clone isolé	49
2.2.4 Amplification	50
2.2.5 Purification des particules virales	52
2.2.5 Titration des particules virales	53
2.2.6 Immunobuvardage de type Western	53
2.2.7 Coloration de gel de polyacrylamide au Bleu de Coomassie.....	54
2.3 Modèle animal.....	55
2.3.1 Description des différents groupes de souris	55
2.3.2 Mesure de l'activité des alanines aminotransférases sériques	57
2.3.3 Dosage des anticorps par méthode ELISA.....	57
2.3.3.1 Détermination du titre des anticorps totaux	57
2.3.3.2 Dosage des classes isotypiques des immunoglobulines.....	58
2.3.4 Isolation des lymphocytes (hépatiques, spléniques et circulants).....	58
2.3.5 Test de prolifération	59
2.3.6 Cytotoxicité.....	59
2.3.7 Histologie	60
2.3.8 Analyses statistiques	60
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	62
3.1 Confirmation de l'expression des transgènes.....	62
3.2 Protocole d'injections des différents vecteurs adénoviraux.....	64
3.3 Évolution des niveaux de transaminases hépatiques.....	65
3.4 Histologie du foie et évaluation du niveau d'inflammation hépatique	67
3.5 Étude de la réponse humorale contre la protéine chimère	71
3.6 Détermination du type de réponse engendrée par les différents sites d'injection.....	73

CHAPITRE 4 : DISCUSSION	75
4.1 L'adénovirus est un vecteur de choix pour la transduction de plusieurs types cellulaires et une expression significative du transgène	76
4.2 La charge virale injectée est critique pour l'élaboration d'une réponse immunitaire robuste.....	77
4.3 L'adénovirus provoque une hépatite aiguë lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse	78
4.4 Analyse de l'intensité de la réponse humorale en fin de protocole par rapport à la présence d'une hépatite initiale.....	80
4.5 Étude des niveaux d'inflammation hépatique et de la polarisation de la réponse immunitaire (Th1 / Th2)	81
CHAPITRE 5 : CONCLUSION	87
BIBLIOGRAPHIE	88

Liste des tableaux

Tableau I: Différents cas de mimétisme moléculaire possibles rapportés pour plusieurs maladies autoimmunes.....	10
Tableau II: Description des quatre groupes de souris à l'étude.....	56
Tableau III : Quantification des adénovirus recombinants produits réalisée à partir du nombre de particules virales par ml et le nombre d'unités formatrices de plaques par ml.	63

Liste des figures

Figure 1: Système de pointage pour le diagnostic d'une HAI élaboré par le Groupe International sur l'HAII.	27
Figure 2 : Composantes structurales d'un adénovirus.....	42
Figure 3 : Construction du vecteur Ad-CTLA-4-2D6-FTCD.....	47
Figure 4: Confirmation de l'expression du transgène par immunobuvardage de type Western.....	62
Figure 5: Protocole d'injections des différents vecteurs adénoviraux.	64
Figure 6 : Évolution des niveaux de transaminases hépatiques.....	66
Figure 7: Échelle de pointage Ishak.	67
Figure 8 : Coupes histologiques de foie normal ou des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD.....	68
Figure 9 : Coupes histologiques du foie des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou l'Ad contrôle.....	70
Figure 10: Quantification des niveaux d'inflammation des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou l'Ad contrôle.....	71
Figure 11 : Médiane des titres d'anticorps totaux dirigés contre la protéine chimère 2D6-FTCD pour les différents groupes.....	72
Figure 12 : Type de réponse immunitaire engendrée selon le site d'injection des adénovirus recombinants.....	73

Liste des abréviations

AADC:	« Aromatic-L-amino acid decarboxylase » (Décarboxylase d'acide aminé L-aromatique)
ADCC:	« Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity » (Cytotoxicité dépendante de l'anticorps)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AIRE-1:	« Autoimmune regulator type 1 » (Régulateur de l'autoimmunité de type 1)
ALT:	Alanine aminotransférase
AMA:	« Antimitochondrial antibodies » (Anticorps anti-mitochondrie)
ANCA:	« Anti-neutrophil cytoplasmic antibody » (Anticorps anti-cytoplasme des neutrophiles)
PA:	Phosphatase alcaline
APS-I:	« Autoimmune polyendocrine syndrome » (Syndrome polyendocrinien autoimmun)
AST :	Aspartate aminotransférase
C4 :	« Complement component C4 » (Composante du complément C4)
CAR :	« Cocksackie-adenovirus receptor » (Récepteur du coxsackie-adénovirus)
CBP:	Cirrhose biliaire primitive
CFA :	« Complete Freund adjuvant » (Adjuvant complet de Freund)
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
ConA :	Concanavaleine A
CPA :	Cellule présentatrice d'antigène

CsCl :	Chlorure de césium
CSP:	Cholangite sclérosante primitive
DMEM:	« Dulbecco's Modified Eagle medium » (Milieu modifié Dulbecco's Eagle)
EBV :	« Epstein-Barr Virus » (Virus d'Epstein-Barr)
ELISA :	« Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay » (Dosage d'immunosorption liée à enzyme)
ELISPOT	« Enzyme-linked immunospot » (Essai ELISPOT)
GGT :	Gamma-glutamyl transférase
GP33 :	Glycoprotéine 33 du LCMV
CYP2D6:	Cytochrome P450 2D6
HEK293A:	« Human embryonic kidney cell 293A » (Cellules de rein embryonnaires humaines 293A)
HEL:	« Hen egg lysozyme » (Lysozyme d'œuf de poule)
IB :	Immunobuvardage de type Western
FTCD :	Formiminotransférase cyclodésaminase
HLA :	« Human leucocyte antigen » (Antigène de leucocyte humain)
IM :	Injection par voie intramusculaire
IPEX :	« Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome» (Syndrome lié au chromosome X, dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie)
IV:	Injection par voie intraveineuse
KO:	Knock-out
LCMV:	« Lymphocytic choriomeningitis virus »

	(Virus de la chorioméningite lymphocytaire)
LCHC1:	« Liver cytosol human clone 1 » (Clone 1 du cytosol hépatique humain)
LSEC:	« Liver sinusoidal endothelial cells » (Cellules endothéliales sinusoidales hépatiques)
MAI :	Maladies autoimmunes
Mic:	« MHC class I chain-related genes » (Gènes reliés à la chaîne du CMH de classe I)
MII :	Maladies inflammatoires de l'intestin
NKT :	« Natural killer T cell » (Cellule T tueuse naturelle)
NP:	Nucléoprotéine du LCMV
PBMC:	« Peripheral blood mononuclear cells » (Cellules mononucléaires du sang périphérique)
PBS:	« Phosphate buffer solution » (Solution tampon phosphate)
PD-1:	Molécule de mort cellulaire programmée 1
PDC-E2 :	« Pyruvate dehydrogenase E2 complex » (Sous-unité E2 du complexe de la pyruvate déshydrogénase)
UFP :	Unités formatrices de plaques
RIP :	« Rat insulin promoter » (Promoteur de l'insuline du rat)
SDS :	« Sodium dodecyl sulfate » (Dodécylsulfate de sodium)

- SDS-PAGE : « Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis »
(Électrophorèse sur gel polyacrylamide en condition dénaturante)
- SLPA : Syndrome lymphoprolifératif autoimmun
- SLE: « Systemic lupus erythematosus »
(Lupus érythémateux disséminé)
- TNF : « Tumor necrosis factor »
(Facteur de nécrose des tumeurs)
- Treg : Cellules T régulatrices
- tRNP^{(Ser) Sec} : « UGA-suppressor transfer RNA (tRNA)-associated protein
(Protéine associée à l'ARN de transfert suppresseur UGA)
- URSO : acide ursodésoxycholique
- VHC : Virus de l'hépatite C
- VHH : Virus de l'herpès humain
- VHS : Virus de l'herpès simplex
- VPH : Virus du papillome humain

À ma mère et ma famille,

Remerciements

Je voudrais profiter de l'occasion pour remercier en premier lieu mon directeur de recherche, le Dr Fernando Alvarez, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, pour m'avoir soutenue autant techniquement que moralement et guidée tout au long de ma formation. Je voudrais aussi remercier mon co-directeur, le Dr Hugo Soudeyns, pour m'avoir initiée au milieu de la recherche et m'avoir inculqué la passion de la recherche. Également, je ne pourrais remettre ce manuscrit sans remercier mes deux acolytes du laboratoire, Pascal et Kathie, qui sont devenus de très bons amis au cours du temps. Je voudrais les remercier pour tous leurs conseils, leur soutien et leur précieuse aide. À quand les prochains sacrifices sans fin?!? Je voudrais également remercier le Dr. Bernard Massie pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour la préparation des adénovirus recombinants et Claire Guilbault pour m'avoir guidée tout au long de cette préparation. Finalement, je voudrais remercier tous les autres membres présents ou passés du laboratoire ainsi que tous les gens du Centre de recherche du CHU Ste-Justine pour avoir fait de ma maîtrise une expérience de vie extraordinaire.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Nous sommes constamment confrontés à une panoplie de microorganismes de toutes sortes. Certaines barrières physiques, telles que la peau et les muqueuses, permettent d'éviter que ces microbes n'envahissent notre organisme. Cependant, il arrive parfois que celles-ci ne suffisent pas et c'est là qu'intervient le système immunitaire. Il y a tout d'abord la réponse innée qui entre en jeu et qui est non spécifique. Les cellules impliquées dans ce type de réponse reconnaissent des motifs conservés entre les microorganismes. Par la suite l'immunité acquise est impliquée et monte une réponse spécialisée contre l'envahisseur en reconnaissant, par exemple, des séquences peptidiques très particulières. Par conséquent, afin de répondre à la grande variété de pathogènes auxquels nous sommes confrontés, le système immunitaire est doué lui aussi d'une très grande diversité clonotypique. Cette plasticité est très efficace pour notre défense, mais elle pourrait également s'avérer catastrophique si elle amenait le système immunitaire à identifier des éléments du soi comme du non soi. C'est pourquoi plusieurs mécanismes de tolérance et de régulation ont été mis en place afin de maintenir l'homéostasie immunitaire, soit une balance entre l'immunité et la tolérance au soi.

1.1 Mécanismes de tolérance

1.1.1 Tolérance centrale

Au cours de leur maturation, les lymphocytes B et T doivent passer par plusieurs processus de sélection afin de s'assurer qu'ils n'engendreront pas de réponse immune contre des antigènes du soi. Bien que les deux types cellulaires soient générés dans la moelle osseuse (et dans le foie fœtal pour les B), leur développement ne se fait pas aux mêmes sites. En effet, les cellules B demeurent dans la moelle osseuse, alors que les thymocytes (des lymphocytes T immatures) migrent jusqu'au thymus pour s'y développer et devenir des lymphocytes T matures.

Dans un premier temps, les lymphocytes doivent produire et exprimer un récepteur à l'antigène fonctionnel avant d'accéder à tout processus de sélection. Le récepteur des cellules B est constitué d'une immunoglobuline membranaire qui fixe l'antigène en plus de

deux hétérodimères Ig- α /Ig- β qui permettent la transduction du signal une fois l'antigène lié au récepteur B (1). Les cellules T doivent, quant à elles, exprimer un complexe récepteur T (TCR)/CD3. Le CD3 est composé d'un homodimère $\zeta\zeta$ ou d'un hétérodimère $\gamma\eta$ associé à des hétérodimères $\gamma\epsilon$ et $\delta\epsilon$ (2) Les cellules T expriment également les co-récepteurs CD4⁺ ou CD8⁺.

Une fois les récepteurs à l'antigène fonctionnels exprimés, les thymocytes devront passer à travers deux processus de sélection (positive et négative) alors que les lymphocytes B ne subiront que la sélection négative. La sélection positive consiste à déterminer la capacité des thymocytes à se lier avec faible avidité à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (3). Les thymocytes ne pouvant satisfaire ce critère seront éliminés. Ensuite, les cellules B immatures et les thymocytes pré-sélectionnés au cours de la sélection positive seront soumis à la sélection négative ou délétion clonale (4). Celle-ci permet l'élimination des lymphocytes arborant un récepteur qui se lie trop fortement au CMH ou qui est spécifique à un antigène du soi (5-8) Lorsqu'un récepteur à l'antigène reconnaît un autoantigène, il peut requérir à un processus nommé « édition du récepteur », qui est majoritairement utilisé par les cellules B, et qui permet aux lymphocytes autoréactifs de réarranger leur récepteur afin qu'ils ne réagissent plus contre un antigène du soi (9, 10).

Deux éléments sont déterminants dans le devenir des clones T : 1) la concentration des antigènes dans le thymus (11, 12), et 2) l'affinité du récepteur pour l'antigène (13). Conséquemment, une concentration élevée d'un antigène dans le thymus combinée à une forte affinité du récepteur pour cet antigène mèneront à l'induction d'un signal qui induira l'apoptose du thymocyte concerné. Récemment, un facteur de transcription, régulateur d'autoimmunité (AIRE), a été identifié comme un élément clé dans l'induction de l'expression d'antigènes spécifiques d'organes au niveau des cellules épithéliales médullaires dans le thymus. AIRE est donc impliqué dans la sélection négative (14, 15). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que lorsque des souris transgéniques exprimant HEL (*hen egg lysozyme*) sous le contrôle de différents promoteurs sont croisées

avec une souche TCR-transgénique pour HEL, le degré de délétion clonale était proportionnel au niveau d'expression de l'antigène HEL dans le thymus (16).

Une importante contrainte au cours de la sélection négative est d'éviter une délétion trop stricte. Effectivement, l'élimination d'un trop grand nombre de clones B et/ou T réduirait dramatiquement le répertoire permettant de se défendre contre les pathogènes. De ce fait, il en résulte une délétion incomplète des clones autoréactifs à la fois au niveau du thymus et de la moelle. Il est donc essentiel qu'un autre mécanisme intervienne pour assurer la prise en charge des cellules qui sont potentiellement autoréactives : la tolérance périphérique.

1.1.2 Tolérance périphérique

Plusieurs moyens permettent d'éviter une réponse autoimmune et ceux-ci peuvent être divisés en deux catégories : 1) ceux qui sont intrinsèques aux lymphocytes (ex. ignorance et anergie) et 2) ceux qui leur sont extrinsèques (ex. cellules dendritiques/cellules B, cellules T régulatrices).

1.1.2.1 Facteurs intrinsèques

Un lymphocyte autoréactif peut ne jamais entrer en contact avec son antigène et il demeurera donc dans un état d'ignorance, par exemple parce que l'antigène est séquestré et donc jamais disponible. L'anergie peut être induite en périphérie chez un lymphocyte T soit par l'absence d'un signal de costimulation adéquat via CD28, soit par un signal d'inhibition via l'antigène 4 associé au lymphocyte T cytotoxique (CTLA-4) (17) ou par la molécule de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) (18). En effet, on sait que les cellules présentatrices d'antigène (CPA) qui se retrouvent dans les tissus lymphoïdes périphériques ou non lymphoïdes sont normalement dans un état de repos ou quiescentes. De ce fait, elles n'expriment que très peu ou pas du tout de molécules de costimulation, diminuant ainsi le risque d'une activation inadéquate (19). De plus, il a été démontré dans le cas des cellules T qu'une fois l'état d'anergie instauré, il est souvent considéré irréversible puisque les clones T anergiques n'ont plus la capacité de produire de l'IL-2 ni de proliférer (20). Pour

ce qui est des cellules B autoréactives, elles entrent également en anergie en absence de costimulation mais cette fois par les cellules T auxiliaires ou encore lorsqu'elles entrent en contact avec des autoantigènes solubles spécifiques de leur récepteur (20). Le rôle clé des molécules CTLA-4 et PD-1 dans le maintien de la tolérance a été découvert par la génération de souris knock-out (KO) chez qui l'un ou l'autre de ces gènes a été invalidé. Ces deux types de souris développaient un syndrome lymphoprolifératif similaire et très sévère, suivi d'une autoimmunité massive qui s'attaquait à une multitude d'organes et causait éventuellement la mort des souris (21).

1.1.2.2 Facteurs extrinsèques

Il est possible que certains lymphocytes T ayant une spécificité pour un antigène du soi ne soient pas éliminés dans le thymus pendant le processus de sélection. Au contraire, ces cellules T seraient plutôt sélectionnées positivement par sélection agoniste (forte affinité) lorsqu'ils entrent en contact avec leur autoantigène. Il a été démontré que trois principaux types de cellules se différencient potentiellement en cellules régulatrices : les lymphocytes T CD8 $\alpha\alpha$ de l'épithélium intestinal (22), les cellules T régulatrices (Treg) CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (23-25) et les cellules T tueuses naturelles (NKT). Ces dernières quittent le thymus et peuvent alors participer au maintien de la tolérance périphérique.

Tel que mentionné ci-haut, tout mécanisme a ses failles et la sélection négative n'est pas parfaite. En effet, il a été démontré que certaines cellules normalement condamnées à la sélection négative soient rescapées. Le milieu dans lequel « baignent » les cellules a une grande influence sur leur devenir. Si les cellules autoréactives se retrouvent dans un milieu avec une abondance de signaux pro-inflammatoires (cytokines), il est fort probable qu'elles reçoivent un signal d'activation plutôt que d'entrer en anergie par exemple. Il est également reconnu que les variations du niveau de certaines hormones, telles que l'œstrogène, pouvaient modifier dans le même sens l'état d'activation des lymphocytes autoréactifs et conséquemment empêcher leur élimination (26). Ces situations

indésirables peuvent mener à l'instauration d'une inflammation suivie d'une réaction autoimmunitaire.

1.2 Autoimmunité

Lorsque le système immunitaire réagit contre des antigènes du soi ou encore sur-réagit à des antigènes de l'environnement, il peut causer de graves dommages aux tissus ou aux organes visés. Ces réactions incontrôlées du système immunitaire, aussi appelées réactions d'hypersensibilité et maladies autoimmunes (MAI), constituent l'une des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde. Les maladies autoimmunes affectent entre 5 et 7 % de la population générale (27). Elles résulteraient de l'interaction de plusieurs facteurs : la susceptibilité génétique, l'influence de facteurs environnementaux menant au développement d'une MAI (exposition à un pathogène, au tabac ou encore les habitudes alimentaires) et enfin, à des événements aléatoires (16).

1.2.1 Susceptibilité génétique

Plusieurs études ont fait ressortir l'importance du bagage génétique dans la susceptibilité à développer une maladie autoimmune. En effet, il a été démontré qu'il existe un plus grand risque d'être atteint d'une maladie autoimmune chez les jumeaux monozygotes que chez les dizygotes, lorsque l'un des deux jumeaux est atteint (28). De plus, le fait d'avoir des proches atteints d'une MAI dans sa famille immédiate ou dans sa parenté augmente également les risques de développer une MAI, démontrant un rôle important de l'hérédité dans les MAI. Ceci a pu être vérifié dans plusieurs maladies, telles que le diabète, l'arthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques (16). Enfin, il semble que les patients souffrant d'une MAI seraient plus enclins à développer d'autres affections autoimmunes puisqu'ils possèderaient des variantes de gènes qui favoriseraient une susceptibilité accrue.

Certains gènes ont été identifiés comme capables de conférer une susceptibilité à une ou plusieurs maladies autoimmunes (29). La région du CMH est une région clé quant à

la susceptibilité ou à la protection conférée aux MAI. Des mutations dans d'autres gènes reliés à l'activation ou à la répression de la réponse immune sont souvent directement impliquées dans l'initiation ou l'aggravation d'une MAI. Parmi eux, mentionnons 1) les gènes codant pour les différents récepteurs et ligands engagés dans la « communication » entre les cellules du système immunitaire, tels que CTLA-4/CD28/B7 (30), PD-1 /PD-L1/PD-L2 (31, 32), etc., 2) les gènes codant pour des cytokines (33, 34) ou encore 3) les gènes responsables de l'apoptose (28). Cependant, bien que ces données soient utiles dans certains cas, il est difficile de tirer des conclusions à grande échelle en raison de l'hétérogénéité entre les populations. Conséquemment, un haplotype conférant une susceptibilité accrue pour une population donnée peut s'avérer non déterminant ou même offrir une protection dans une autre population (35, 36).

Les MAI peuvent être classées de plusieurs façons. Il existe des maladies autoimmunes monogéniques (dues au mauvais fonctionnement d'un gène en particulier) ou à traits complexes où une multitude de facteurs sont impliqués. Il est plutôt rare que les MAI soient dues à un seul gène et, conséquemment, elles sont d'autant plus difficiles à traiter puisque plusieurs facteurs, souvent inconnus, sont impliqués dans le développement de la maladie. Des exemples de maladies monogéniques et systémiques sont le syndrome polyendocrinien autoimmun de type 1 (APS-1) ou dystrophie autoimmune polyendocrinopathie-candidose-ectodermale (APECED), le syndrome lié au chromosome X, dérégulation immune, polyendocrinopathie, entéropathie ou plus couramment nommé IPEX et, enfin, le syndrome lymphoprolifératif autoimmun. Ces MAI résultent respectivement d'une défaillance au niveau de la tolérance centrale, de la tolérance périphérique et d'un défaut dans la mort par apoptose des cellules du système immunitaire.

1.2.2.1 MAI monogéniques

L'APS-1 consiste en une réaction autoimmune dirigée contre une multitude d'organes endocriniens en plus de plusieurs autres tissus. On constate le développement de plusieurs MAI, notamment de l'hypoparathyroïdie (89 %), une défaillance adrénocorticale primaire (70 %) et une candidose cutanée (73-100 %) (37-39). Des hépatites chroniques

actives surviennent dans 10-20 % des cas d'APS-1 (38, 39). Chez ces patients, plusieurs autoantigènes hépatiques ont d'abord été identifiés : le cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) (40, 41), le cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) (42) et la décarboxylase de l'acide aminé L-aromatique (43). Des mutations dans le gène AIRE sont responsables de ces manifestations. AIRE est exprimé majoritairement dans les cellules épithéliales médullaires du thymus, mais également à moindre niveau dans certains organes lymphoïdes (44). Le produit de ce gène est un des facteurs de transcription responsables de l'expression dans le thymus de la plupart des antigènes spécifiques d'organe, tels que l'insuline (îlots de Langerhans) (45) et la prostaglandine D (cerveau, épididyme) (14), permettant ainsi l'instauration d'une tolérance envers ces antigènes du soi (46).

Le syndrome de l'IPEX est quant à lui une maladie causée par des mutations dans la région « *forkhead* » du gène FOXP3. Foxp3 est un régulateur transcriptionnel de la famille des « *forkhead/winged helix* » qui jouerait un rôle crucial à la fois dans le développement et le fonctionnement des cellules T régulatrices. Ces mutations diminuent ou abolissent sa capacité de lier l'ADN. Les patients avec une déficience pour FOXP3 développent de nombreuses atteintes autoimmunes, telles l'entéropathie autoimmune, des dermatites, la thyroïdite et le diabète de type 1. Ces manifestations provoquent souvent la mort des patients dans les deux premières années de leur vie (47). Ces deux maladies, l'APS-1 et l'IPEX, nous confirment l'importance et la complexité des mécanismes de tolérance centrale aussi bien que périphérique.

Le SLPA est caractérisé non seulement par une lymphoprolifération, mais également par une cytopénie autoimmune, un taux élevé de lymphocytes T doubles négatifs (i.e. absence des co-récepteurs CD4⁺ et CD8⁺) (48), une hypergammaglobulinémie polyclonale et une susceptibilité accrue aux tumeurs malignes (49, 50). La détection d'autoanticorps est très fréquente chez les patients, atteignant jusqu'à 92 % des cas (51-54). En 1995, deux modèles murins (mutations des gènes *lpr*/FAS et *gld*/FASL), préalablement utilisés pour l'étude du lupus érythémateux disséminé (SLE – *Systemic lupus erythematosus*), ont été

reliés à ce syndrome pour la première fois (55-57). On retrouvait chez ces souris les caractéristiques typiques retrouvées chez les patients atteints du SLPA.

Le syndrome lymphoprolifératif autoimmun (SLPA) est majoritairement causé par une défaillance fonctionnelle de Fas ou FasL (55, 56), deux produits de gènes impliqués dans le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose (58, 59). Au cours d'une réponse immunitaire normale, les lymphocytes spécifiques aux pathogènes prolifèrent à un niveau suffisant pour permettre d'enrayer l'infection. Lorsque tout danger est écarté, il y a contraction de la réponse et les lymphocytes devenus inutiles sont éliminés. Cette élimination se fait notamment via l'interaction de Fas/FasL (60). Conséquemment, lorsqu'un des deux gènes est inopérants, ces lymphocytes activés ne sont pas éliminés, d'où le syndrome lymphoprolifératif. Une régulation anormale de Fas peut mener à deux processus d'autoimmunité. Tout d'abord, lorsqu'il y a un déficit de Fas, l'activité des lymphocytes autoréactifs n'est plus contrôlée et il y a développement d'autoimmunité humorale et cellulaire. Par contre, lorsque l'activité de Fas est plus grande que la normale, il y a une destruction massive des cellules cibles et développement d'une autoimmunité provoquée par les lymphocytes T cytotoxiques (61, 62).

1.2.2.1 MAI à traits complexes

Les maladies autoimmunes à traits complexes peuvent être classées selon l'organe ou le tissu atteint. Autrement dit, si elles s'attaquent à un organe en particulier, on dira que cette maladie est spécifique d'organe, alors que si elle cible plusieurs organes ou tissus à la fois, elle sera classée comme une maladie systémique. Un exemple de maladie autoimmune systémique serait le SLE, alors qu'un cas bien connu de maladie autoimmune spécifique d'organe serait le diabète insulino-dépendant (type 1). Les autoantigènes causant les MAI spécifiques d'organe peuvent être exprimés seulement dans l'organe cible (diabète autoimmun), mais peuvent également être ubiquitaires même si l'attaque autoimmune ne se fait que dans cet organe. Par exemple, chez les patients avec une HAI de type 1, on peut retrouver des autoanticorps dirigés contre des autoantigènes des muscles lisses et du noyau, ces autoantigènes n'étant nullement exclusifs au foie. Certaines hypothèses pourraient

expliquer les raisons pour lesquelles certains organes sont plus particulièrement visés : 1) l'accessibilité aux autoantigènes serait facilitée dans certains tissus/organes, ou 2) les différentes molécules exprimées à la surface des tissus/organes permettraient un recrutement sélectif des lymphocytes autoréactifs (63).

Des mécanismes de régulation distincts existent selon que la maladie est spécifique d'organe ou systémique. Des études réalisées sur les mécanismes d'induction de l'anergie en utilisant deux modèles de souris transgéniques ont été réalisées. Le premier modèle exprimait un antigène restreint à un organe, alors que le deuxième permettait plutôt l'étude du même antigène mais cette fois exprimé de façon ubiquitaire (antigène systémique). À l'aide de transferts adoptifs de cellules TCR transgéniques pour cet antigène, il a été démontré que le récepteur CTLA-4 était essentiel pour l'induction de l'anergie et donc le maintien de la tolérance dans un tissu en particulier, alors qu'il ne semblait pas impliqué au niveau de la tolérance face à un antigène systémique (64). Une étude réalisée chez l'homme a montré des résultats similaires. Cette étude a relevé une association entre des polymorphismes dans le gène CTLA-4 et des MAI spécifiques d'organe, alors qu'aucune association ne pouvait être faite pour des maladies autoimmunes systémiques (65). D'autres mécanismes de régulation existent pour l'instauration de la tolérance face à un antigène systémique. Il a été montré dans le modèle de souris transgéniques exprimant OVA de façon systémique que l'anergie des lymphocytes était plutôt associée à une diminution de l'expression du TCR et également à un blocage marqué dans le signal induit par la liaison du TCR à l'antigène (66, 67). Les auteurs suggèrent également qu'une exposition prolongée à l'antigène pourrait être responsable de la désensibilisation du TCR (68, 69)

1.2.2 Facteurs environnementaux

Plusieurs hypothèses ont été proposées quant à l'implication de composantes environnementales dans l'initiation des MAI. Tout d'abord, certains agents pathogènes ont souvent été associés avec des maladies autoimmunes. Ces derniers pourraient provoquer l'initiation d'une MAI de plusieurs façons. L'hypothèse du mimétisme moléculaire entre

une protéine du soi et celle d'un pathogène a souvent été soulevée. En effet, le mimétisme moléculaire consiste en une réaction croisée soit au niveau de la réponse soit humorale soit cellulaire, c'est-à-dire qu'un autoanticorps ou un lymphocyte T réagit à la fois contre le peptide étranger et l'autoantigène. Par exemple, un groupe de chercheurs a pu isoler des autoanticorps provenant de patients atteints du Syndrome de Guillain-Barré qui reconnaissent à la fois les gangliosides humains et les liposaccharides de *Campylobacter jejuni* (70). Beaucoup d'autres cas de mimétisme moléculaire ont été rapportés dans la littérature (Tableau I).

Maladies autoimmunes	Autoantigènes	Pathogènes associés	Type de réaction croisée
Syndrome de Guillain-Barré (70)	Gangliosides	<i>C. jejuni</i>	Autoanticorps
Diabète de type 1 (71)	Décarboxylase de l'acide glutamique	Virus du Coxsackie	Lymphocytes T autoréactifs
HAI de type 2 (72-74)	CYP2D6	VHS-1 VHC	Autoanticorps
	FTCD	VHH-6	
Sclérose en plaques (75)	Protéine basique de la myéline	EBV, Virus de l'influenza type A, VPH	Lymphocytes T autoréactifs

Tableau I: Différents cas de mimétisme moléculaire possibles rapportés pour plusieurs maladies autoimmunes. EBV, Virus d'Epstein-Barr; VHS, Virus de l'herpès simplex de type 1; VHC, Virus de l'hépatite C; VHH, Virus de l'herpès humain; VPH, Virus du papillome humain.

Une autre façon par laquelle une infection pourrait enclencher le processus autoimmun est l'activation polyclonale des lymphocytes autoagressifs (76). Lorsque les cellules infectées sont lysées par le pathogène ou par le système immunitaire, il y a relâche d'autoantigènes normalement séquestrés. Les cellules autoréactives présentes au site de l'inflammation peuvent être malencontreusement activées par l'environnement pro-inflammatoire et ainsi monter une réponse contre les antigènes du soi. Dans ces circonstances, les cellules autoréactives réagissent contre un nombre limité d'épitopes. Par la suite survient le phénomène de l'étalement épitopique (« *epitope spreading* ») où de nouveaux peptides sont générés à partir de l'autoantigène et présentés à d'autres lymphocytes qui n'avaient pas de spécificité pour le soi auparavant. Enfin, d'autres causes possibles ont été soulevées, telles que la présence d'hormones (œstrogène) (77), le traitement avec certains médicaments (pénicilline et céphalosporine et anti-TNF α) (78, 79) ou une défaillance des cellules T régulatrices (80).

1.3 Immunologie du foie

Le foie possède une multitude de fonctions, telles que la synthèse des protéines plasmatiques et de la bile, l'entreposage d'énergie sous forme de glycogène et la détoxification et l'élimination des sous-produits provenant de divers médicaments. De surcroît, le foie est un organe très particulier sous plusieurs aspects, que ce soit par sa structure ou encore par sa capacité de maintenir un environnement immunitaire homéostatique, en contrebalançant tolérance et immunité (81). Le foie reçoit tous les jours une quantité importante de sang provenant du tractus gastro-intestinal et qui contient une quantité importante d'antigènes. Ces antigènes sont dérivés de produits alimentaires et également des bactéries qui composent notre microflore intestinale normale. De plus, il peut aussi être confronté à divers pathogènes absorbés par l'intestin. Par conséquent, il doit être en mesure d'induire une tolérance envers les antigènes bénins pour éviter des réactions allergiques à certains aliments ou probiotiques mais également de réagir contre les pathogènes éventuels. Le foie doit donc posséder différents mécanismes de régulation.

Le foie est composé d'un endothélium discontinu recouvrant les sinusoides (82). Elles possèdent des fenestrations permettant aux cellules immunitaires du sang d'interagir directement avec les hépatocytes ou encore les cellules étoilées (*stellate cells*) dans l'espace de Disse à l'aide de prolongements cytoplasmiques (83). Ces interactions sont favorisées par la structure particulière des sinusoides. En effet, le sang provenant de l'intestin entre par la veine porte pour ensuite se frayer un chemin à travers les sinusoides. Le petit diamètre des sinusoides ralentit grandement le flux sanguin et facilite ainsi un contact prolongé lymphocytes/CPA (83). Plusieurs populations cellulaires peuvent agir comme CPA, notamment les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (LSEC –*Liver sinusoidal endothelial cells*), les cellules de Kupffer (macrophages), les cellules dendritiques et même les hépatocytes en présence d'un environnement pro-inflammatoire (84).

1.3.1 Constituants du foie

Le foie est constitué en majorité d'hépatocytes. Plusieurs autres types de cellules non-parenchymateuses résident également dans le foie, notamment les LSEC, les cellules de Kupffer, les cellules biliaires, les cellules étoilées et enfin les lymphocytes. On retrouve jusqu'à 10^{10} lymphocytes dans un foie humain, ce qui représente la deuxième population en importance de cellules non-parenchymateuses après les LSEC (83). Les lymphocytes comprennent les cellules NK, les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (conventionnels ou non-conventionnels) et les lymphocytes B. Les différentes populations de cellules immunitaires retrouvées dans le foie sont distinctes par rapport à celles présentes ailleurs dans le corps de par leur nature et leur abondance. Par exemple, le foie renferme un nombre inhabituellement élevé de cellules NK (20 %), NKT (30 %) et de lymphocytes T exprimant un TCR non-conventionnel, i.e. exprimant une combinaison de chaînes γ et δ (< 5 %) (85-87).

1.3.1.1 Lymphocytes conventionnels

Les cellules T conventionnelles incluent les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ qui expriment un TCR $\alpha\beta$ classique possédant un répertoire grandement diversifié. Les

antigènes présentés dans le contexte du CMH I sont reconnus par les cellules T CD8⁺, alors que les lymphocytes CD4⁺ reconnaissent plutôt les peptides en association avec le CMH de classe II.

Contrairement aux lymphocytes T CD8⁺ qui sont destinés à devenir des cellules cytotoxiques, les cellules T CD4⁺ peuvent se différencier en deux principaux types de cellules effectrices : Th1 ou Th2. Les cellules CD4⁺ de type Th1 favorise une réponse à médiation cellulaire en sécrétant de l'IFN- γ et du TNF- β . Ces cytokines favorisent non seulement une réponse de type Th1 (IFN- γ et TNF- β), mais également, inhibent l'activation des cellules B (TNF- β). Une réponse de type Th2 provoque plutôt la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Les cytokines impliquées dans le développement de ce type de réponse sont l'IL-4, l'IL-5 (active les cellules B) et l'IL-10 (inhibe l'activation des macrophages et des cellules CD4⁺ de type Th1) (88). L'environnement dans lequel les cellules CD4⁺ rencontrent leur antigène et se multiplient influence directement leur différenciation. Une infection avec un pathogène intracellulaire induit normalement une réponse de type Th1, alors qu'un pathogène extracellulaire, un parasite ou une toxine engendre une réponse de type Th2. Dans la plupart des MAI, on retrouve habituellement une réponse de type Th1, i.e. une réponse à médiation cellulaire (89).

Dans un foie sain, le ratio CD4⁺/CD8⁺ est inversé par rapport à celui du sang, avec une quantité plus importante de CD8⁺ (90). Un ratio démontrant une prévalence de CD4⁺ par rapport au CD8⁺ indique la présence d'une atteinte hépatique (91). Également le nombre de cellules effectrices surpasse celui des cellules mémoires contrairement à ce qui a été reporté pour les lymphocytes sanguins (83).

Chez l'humain, on retrouve dans un foie sain environ 1 % de cellules T régulatrices (92). Cette proportion est semblable chez la souris, soit autour de 2-4 % des lymphocytes intrahépatiques et 15-20 % des lymphocytes CD4⁺ (93). Il a été proposé que ces cellules puissent participer au maintien de la tolérance hépatique en absence de danger (93). Les Treg seraient également impliquées dans la perpétuation de certaines infections chroniques telles que l'hépatite C (92). Également, le groupe de Longhi et collègues a montré un rôle

des Treg dans le prolongement de la survie des lymphocytes CD4⁺ chez les patients atteints d'HAI comparativement aux sujets contrôles (94).

1.3.1.2 Lymphocytes non-conventionnels

Les cellules T non-conventionnelles regroupent principalement deux types cellulaires, soit les cellules NKT et les lymphocytes T exprimant un TCR $\gamma\delta$. Tout d'abord, les cellules NKT sont très abondantes dans le foie et composent environ 30 % des lymphocytes T intrahépatiques, alors qu'elles ne sont retrouvées qu'en très faible quantité dans le sang et d'autres organes lymphoïdes (85). Ces cellules immunitaires sont davantage reconnues pour leur action au cours de la réponse innée et elles auraient également un rôle dans la contraction de la réponse immunitaire. Il a même été rapporté par van der Vliet *et al.* que le nombre de cellules NKT seraient grandement diminué dans un bon nombre de maladies autoimmunes, incluant l'HAI (95). Les cellules NKT, tout comme les cellules NK, peuvent être activées par des lipides ou glycolipides présentés par une molécule ressemblant au CMH de classe I, la molécule CD1 (96). Dans le foie, la molécule CD1d est exprimée par les hépatocytes (97), les cellules de Kupffer (98), les cellules dendritiques (97) et enfin par les cellules de Ito (99).

On retrouve également dans le foie une abondance de lymphocytes arborant un TCR $\gamma\delta$ (86, 87). Habituellement rare, ce type de récepteur T est aussi retrouvé en quantité significative au niveau de l'intestin (86). Que ce soit dans le foie ou au niveau de l'intestin, on croit que ces lymphocytes participeraient à un certain maintien de la tolérance face à la panoplie d'antigènes étrangers qui traversent le système digestif chaque jour (100).

Il existe un autre type de cellules non-conventionnelles important : les cellules NK. Les cellules NK ont des fonctions très similaires à celles des cellules NKT, soit un rôle d'immunosurveillance. Ces cellules possèdent la capacité d'être cytolytiques et peuvent donc éliminer les cellules infectées ou encore les cellules malignes. Les cellules NK auraient également un rôle dans la prévention de la migration de métastases (101). Elles médient leur action via deux principaux types de récepteurs : d'activation avec le récepteur NKG2 ou d'inhibition via le récepteur KIR (*Killer inhibitory receptors*) (102). La décision

d'éliminer ou non la cellule avec laquelle la cellule NK interagit repose sur l'expression de la molécule du CMH I. Si l'expression est altérée ou diminuée, comme c'est souvent le cas pour des cellules infectées ou tumorales, le signal d'inhibition est levé et l'élimination de la cellule altérée survient. Par contre, si le patron d'expression du CMH I est normal, il y a maintien du signal d'inhibition et la cellule est épargnée (103)

1.3.2 Organe de tolérance

Plusieurs indices suggèrent que le foie serait un organe de tolérance. Mentionnons tout d'abord le principe de la tolérance orale. Tel que mentionné plus haut, le foie « filtre » plus de 2000 L de sang par jour, ce dernier renfermant une multitude d'antigènes étrangers. Il serait donc attendu qu'il puisse induire une certaine tolérance envers ces antigènes du non-soi. Plusieurs études ont démontré que l'induction d'une tolérance pouvait se faire par l'injection d'un antigène directement dans la veine porte (104).

Bien qu'il ait été montré que les hépatocytes étaient en mesure de sécréter des protéines pro-inflammatoires, telle que la protéine C réactive (CRP - *C-reactive protein*) et le complément (105), il existe en général un environnement riche en cytokines promouvant une tolérance. En effet, parmi les cellules résidentes du foie, on sait que les macrophages résidents (cellules de Kupffer) et les LSEC produisent de façon continue de l'IL-10 ainsi que du TGF- β , deux cytokines de type Th2 (105). Récemment, un article publié par Wiegard *et al.* a montré deux principes importants quant à la réponse immunitaire au niveau du foie. Tout d'abord, dans un contexte d'inflammation (dans ce cas-ci une infection au LCMV), les auteurs ont montré que lorsque les lymphocytes T naïfs étaient activés par les hépatocytes exprimant le CMH II, ils se différenciaient en cellules Th2. De plus, lorsque les hépatocytes venaient en contact avec des cellules T activées de type Th1, ils réduisaient grandement leur capacité de sécréter de l'IFN- γ . Les auteurs suggèrent qu'une faible expression d'un ligand (*Delta-like*) serait responsable de cet effet et que ceci pourrait expliquer la persistance de certaines infections du foie, telles que l'hépatite B et C (106). Plusieurs autres groupes ont confirmé que l'activation des

lymphocytes au niveau du foie était inefficace et que souvent les lymphocytes activés provenant de la périphérie devenaient souvent incompetents au cours d'une infection chronique (107-109). Enfin, il a été démontré que les cellules Th2 ont tendance à survivre alors que les lymphocytes avec un phénotype Th1 ont tendance à devenir non-fonctionnels (110). Bref, en regroupant les différentes caractéristiques des cellules résidentes du foie, il est possible d'affirmer que le foie est un organe très particulier où une tolérance relativement constante doit être maintenue.

1.4 Maladies autoimmunes du foie

Trois maladies autoimmunes du foie sont actuellement reconnues. Ces dernières sont la cirrhose biliaire primitive (CBP), la cholangite sclérosante primitive (CSP) et l'HAI (HAI).

1.4.1 Cirrhose biliaire primitive

La cirrhose biliaire primitive ou CBP est une maladie autoimmune progressive qui mène à la destruction des canaux biliaires intrahépatiques, causant ainsi une cholestase chronique et des dommages irréversibles au foie. L'incidence en Amérique du Nord se situe entre 19 et 35 cas par million par année (111), alors que dans l'est du Canada il y aurait environ 25 personnes atteintes par million d'habitants par année (112, 113). Comme c'est le cas pour l'ensemble des MAI, il y a 10 fois plus de femmes que d'hommes atteintes de CBP (114).

On retrouve dans la majorité des patients (90-95 %) la présence d'autoanticorps anti-mitochondrie (AMA), ces derniers étant considérés comme de bons marqueurs sérologiques de la CBP (114). Les autoantigènes ciblés par ces autoanticorps ont été identifiés : les sous-unités E2 du complexe de la pyruvate déshydrogénase ou PDC-E2 (les plus fréquemment reconnues), la chaîne ramifiée du complexe de la 2-oxo-acide déshydrogénase, le complexe de l'acide céto-glutarique déshydrogénase et, enfin, une protéine se liant à la dihydrolipoamide déshydrogénase (115, 116). Bien que ces antigènes

soient présents de façon ubiquitaire, la réponse autoimmune affecte principalement les cellules de l'épithélium biliaire. On retrouve également des autoanticorps anti-nucléaire dans environ la moitié des cas (114). De plus, on dénote un taux anormalement élevé d'immunoglobulines de type IgM chez une grande partie des patients atteint de CBP (114). Pour ce qui est de la réponse à médiation cellulaire, il est possible d'isoler des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ spécifiques contre la PDC-E2 à partir du sang ou du foie des personnes avec une cirrhose biliaire primitive. Plusieurs études semblent démontrer leur implication dans les dommages subis par l'épithélium des canaux biliaires (117, 118). Les facteurs menant au développement de la CBP sont inconnus. Plusieurs hypothèses classiquement émises pour les maladies autoimmunes ont été proposées, telles que le mimétisme moléculaire entre un agent pathogène et les autoantigènes (ex. *E. coli* ou *N. aromaticivorans*) (119) ou encore l'exposition à un agent chimique métabolisé par le foie (ex. pesticide ou détergent) (120, 121).

Trois critères principaux sont considérés au moment du diagnostic d'une CBP. Si 2 critères seulement sont présents, une CBP sera soupçonnée, alors que lorsque les 3 critères sont regroupés, un diagnostic de CBP peut être confirmé. Ces critères incluent la présence d'autoanticorps AMA, des niveaux d'enzymes hépatiques sériques élevés qui perdurent pour un minimum de 6 mois et une histologie démontrant une inflammation et une destruction partielle ou complète des canaux biliaires (122). L'histologie se caractérise principalement par une nécrose des canaux biliaires, une inflammation portale et parfois par la présence de granulomes (123, 124). Dans 50-60 % des cas, les patients avec CBP peuvent être asymptomatiques pendant plusieurs années (125). Lorsque les symptômes apparaissent, les patients souffrent le plus souvent de fatigue, de prurit (démangeaisons intenses) et parfois développent un ictère (126). D'autres caractéristiques fréquemment retrouvées au cours d'une CBP sont une hyperlipidémie, une hépatomégalie, de l'hypothyroïdie et une diminution de la densité osseuse. Également, comme la plupart des maladies autoimmunes, il est possible de retrouver d'autres manifestations autoimmunes concomitantes (127). Le traitement le plus couramment utilisé pour traiter la CBP est

l'acide ursodésoxycholique (URSO ou ursodiol) et, plus rarement, des corticostéroïdes, du methotrexate ou la cholchicine (128-130). En effet, plusieurs groupes dont celui de Poupon *et al.* ont démontré que le traitement des patients avec une CBP et AMA+ avec de l'acide ursodésoxycholique (URSO) améliorait à la fois le bilan biochimique et la survie des patients (131).

Il y a quelques décennies, l'espérance de vie des patients diagnostiqués avec une CBP sans transplantation hépatique n'était que d'environ 10 ans (132, 133). Près du quart de ces patients nécessitaient une transplantation suite à une défaillance hépatique (134). Cependant, il en est tout autrement aujourd'hui puisque le diagnostic survient plus souvent dans les stades moins avancés de la maladie (135, 136). Plusieurs facteurs ont été évalués pour tenter d'établir le pronostic des patients selon leurs bilans biochimique et histologique. L'utilisation de la présence et/ou du niveau d'autoanticorps sériques en tant que facteurs de risque est encore très controversée. Certaines études ont démontré que la présence d'anticorps anti-nucléaire et anti-muscle lisse, surtout l'isotype IgG3, serait associée à un pronostic défavorable, avec un risque accru de progresser vers une insuffisance hépatique (137-139). Une autre étude réalisée sur une cohorte de patients nord-américains avait préalablement conclu qu'il n'y avait aucune association entre le titre d'autoanticorps AMA et la progression de la maladie. Ils avaient tout de même trouvé une faible relation, mais non significative, entre le titre d'IgG3 et une progression plus rapide de la maladie (140). Enfin, il a été rapporté que la progression de la maladie variait selon le profil d'autoanticorps présents chez un patient. En effet, la présence d'anti-centromère serait associée à un risque accru d'hypertension portale, alors que celle d'anti-gp120 serait plutôt associée à une progression vers une insuffisance hépatique (141). Cependant, encore une fois, cette association a été mise en doute par une étude réalisée par Bogdanos *et al.* qui n'a pu confirmer ces résultats avec autant de conviction (142). Une composante ethnique et géographique pourrait expliquer ces différences. Finalement, d'autres études doivent être faites afin de déterminer hors de tout doute la place qu'occupent les autoanticorps dans l'évolution de la cirrhose biliaire primitive. D'autres facteurs de risque ont été proposés tels

qu'un historique familial de CBP, du Syndrome de Sjörger ou de lupus, avoir fumé la cigarette, avoir subi une amygdalectomie ou une cholécystectomie, avoir eu des grossesses multiples, etc (126). Étonnamment, il semble n'y avoir aucune susceptibilité accrue à la CBP associée aux différents allèles du CMH (143).

1.4.2 Cholangite sclérosante primitive

La cholangite sclérosante primitive ou CSP est une affection menant à une fibrose oblitérante des canaux biliaires intra- et extra-hépatiques provoquée par une inflammation persistante. Ce qui déclenche ce processus inflammatoire est jusqu'à ce jour inconnu et l'inflammation peut éventuellement mener à une défaillance hépatique. Chez les adultes aussi bien que chez les enfants, la CSP est souvent accompagnée de maladies inflammatoires de l'intestin (MII) (144, 145), principalement la colite ulcéreuse ou la maladie de Crohn (145). Ces patients ont souvent un historique familial de MII. Bien que moins de 5 % des patients soient atteints d'autres MAI (145), il est tout de même possible qu'un défaut génétique menant à un déficit au niveau de la régulation de la réponse immunitaire soit présent chez ces patients et leurs proches.

Il n'existe aucune caractéristique exclusive à la CBP, mais plusieurs facteurs sont souvent présents. Ceux-ci incluent un niveau élevé de γ -glutamyl transférase (GGT) et des transaminases (alanine aminotransférase - ALT et aspartate aminotransférase - AST), reflétant les dommages aux canaux biliaires et aux hépatocytes respectivement (145). De plus, on constate une hyperglobulinémie de type IgG (70 %) ou IgM (25 %) chez les enfants avec une CSP. Également, bien que ces anticorps ne soient pas spécifiques à la CSP, on retrouve parfois chez les patients des p-ANCA (*Perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibody*), des anticorps anti-nucléaire et anti-muscle lisse. Les p-ANCA associés à une cholestase, décelée par un taux sanguin plus élevé de bilirubine que la normale, sont typiquement retrouvés chez les patients atteints de CSP (146).

Les symptômes présents lors du diagnostic sont des douleurs abdominales, de la fatigue souvent accompagnée d'anorexie et d'une perte de poids, une hépatomégalie, une

splénomégalie, une ictère, un prurit et parfois de la fièvre (147). Une biopsie démontrant un œdème et une fibrose concentrique autour des canaux biliaires ainsi que la présence de cellules inflammatoires sont d'autres indices d'une CSP. Enfin, il y a fréquemment présence de sténose et d'une structure en « chapelet » (*beading*) des canaux biliaires chez les patients atteints de cholangite sclérosante primitive (146, 147).

Comme pour la CBP et l'HA1, la CSP est une maladie qui touche très peu de gens. Par exemple, on dénote environ 0,9 nouveaux cas sur 100 000 par année aux États-Unis (148). L'âge moyen au moment du diagnostic chez les enfants est d'environ 14 ans. Contrairement à une majorité de MAI, la CSP est plus fréquemment retrouvée chez les garçons que chez les filles, avec un rapport de 2 :1 (144). Par contre, une importante contribution génétique a été mise en cause pour la CSP. Différents haplotypes du HLA ont démontré une susceptibilité ou encore une protection : B8-TNF*2-DRB3*0101-DRB1*0301-DQA1*0501-DQB1*0201 et DRB3*0101-DRB1*1301-DQA1*0103-DQB1*0603 ou DRB4*0103-DRB1*0401-DQA1*03-DQB1*0302, respectivement (149).

Comme l'ensemble des MAI du foie, les dommages observés dans les cas de CSP seraient causés par la réponse à médiation cellulaire et non d'origine humorale puisqu'aucun anticorps spécifiquement dirigé contre un antigène des canaux biliaires n'a été répertorié.

Enfin, les traitements actuellement administrés aux patients sont des immunosuppresseurs généraux, soit des corticostéroïdes combinés à l'azathioprine. Un traitement à l'URSO peut améliorer les signes biochimiques, mais l'influence sur le pronostic est encore discutable (147). En effet, bien que la présence de lésions au niveau des canaux intralobulaires semble avoir un meilleur pronostic par rapport à celles retrouvées sur l'arbre biliaire extra-hépatique (150), l'espérance de vie médiane des patients avec une CSP est très courte, soit d'environ 12 ans (144). Une transplantation hépatique semble la solution ultime pour les patients ayant atteint un stade avancé de la maladie, celle-ci se traduisant souvent par une défaillance hépatique.

1.4.3 Hépatite autoimmune (HAI)

L'HAI a tout d'abord été surnommée « hépatite chronique » par Kelsall *et al.* (151) en 1947, puis « hépatite lupoïde » par Mackay et collègues (152) environ dix ans plus tard en raison de la présence dans le sérum des patients d'anticorps anti-nucléaire, caractéristiques du SLE. Les caractéristiques cliniques et histologiques ont été à l'origine du terme « HAI chronique active autoimmune ». Celle-ci était caractérisée par la présence d'autoanticorps non spécifiques d'organe ainsi qu'un taux élevé d'immunoglobulines sériques. Enfin, l'appellation « HAI » a été proposée par le Groupe international d'étude sur l'HAI dans les années 90 (153).

L'HAI est une maladie d'étiologie inconnue caractérisée par un bris de tolérance envers certaines protéines hépatiques. Il en résulte une infiltration massive de cellules immunitaires dans le foie, causant la destruction progressive du parenchyme hépatique. La prise d'immunosuppresseurs est utilisée pour contrôler la maladie puisqu'il n'existe aucun traitement spécifique jusqu'à ce jour. Dans 10-20 % des cas, une transplantation hépatique peut s'avérer nécessaire et ce, même lorsque le patient est sous traitement (154, 155). L'évolution de la maladie est caractérisée par de fortes périodes d'activité et de périodes de rémission. Elle comporte plusieurs caractéristiques typiques : une hypergammaglobulinémie, la présence d'autoanticorps circulants, de faibles niveaux du facteur C4 du complément ainsi qu'une forte prévalence des haplotypes HLA-B8, HLA-DR3 et HLA-DR4 (153). Deux types d'HAI existent selon le type d'autoanticorps détecté dans le sérum, soit le type 1 (anti-nucléaire et anti-muscles lisses) et le type 2 (anti-LKMI - *anti-liver-kidney microsome type 1* et anti-LC1 - *anti-liver-cytosol type 1*). Enfin, plusieurs évidences indiquent que l'HAI est une maladie plurifactorielle où il faut considérer à la fois l'âge et le sexe du patient, la génétique et les facteurs environnementaux.

La prévalence de l'HAI varie énormément selon la situation géographique, puisque la génétique et l'environnement dans lequel évoluent les populations leur sont propres. En Europe du Nord, elle touche environ 170 personnes par million d'individus.

Similairement, l'Europe de l'Ouest et l'Amérique du Nord comptent entre 50 et 200 cas par million de personnes (156). L'HAI de type 1 est la plus commune. Par exemple, environ 90 % des patients atteints d'HAI en Allemagne sont de type 1 (156).

L'HAI atteint surtout les femmes, avec une prépondérance de 4 :1 pour le type 1 et de 9 :1 pour le type 2 (147). Bien que l'HAI puisse être diagnostiquée à l'âge adulte, elle est davantage reconnue comme une maladie pédiatrique. L'âge moyen au diagnostic est respectivement de 10 ans et 6,5 ans pour les types 1 et 2 (157, 158).

1.4.3.1 Diagnostic

Les premiers signes cliniques fréquemment décelés au moment du diagnostic sont ceux d'une hépatite aiguë ou d'une maladie chronique du foie. Dans de plus rares cas, une hépatite fulminante est la forme de présentation (155, 159). Également, on retrouve souvent chez les patients (>40 %) d'autres MAI extrahépatiques telles le diabète de type 1, l'arthrite rhumatoïde, la thyroïdite autoimmune, ou encore la colite ulcéreuse pour ne nommer que les plus fréquentes. Des cas de MAI dans la famille immédiate des patients atteints d'HAI sont aussi fréquemment reportés (147, 158, 159). Certaines de ces MAI sont plus souvent associées à un type particulier d'HAI, alors que d'autres peuvent être présentes aussi bien avec le type 1 que le type 2 (147). La présence d'autres MAI chez les patients atteints d'HAI et leurs proches suggère que des composantes génétiques prédisposeraient à l'autoimmunité.

Le niveau des transaminases sériques (ALT et AST) peut atteindre jusqu'à 50 fois la normale (157, 158). Cependant, des niveaux normaux ou légèrement élevés de transférase γ -glutamyl et de phosphatase alcaline (PA) sont souvent rapportés (160). L'hypergammaglobulinémie retrouvée chez la majorité des patients est causée par une prolifération non-spécifique des lymphocytes B sécrétant des anticorps. Les taux d'IgG peuvent dépasser 30g/L dans certains cas d'HAI de type 1 (157, 158).

Les autoanticorps détectés dans le sérum des patients permettent de les associer à l'un ou l'autre des types d'HAI. Dans les cas d'HAI de type 1, on retrouve la présence

d'anticorps anti-nucléaire dans le sérum de près de 70 % des patients (161), qui sont dirigés contre une variété d'antigènes (ex. ADN, centromères, ribonucléoprotéines, cycline A, histones...) (162, 163) et/ou d'anticorps anti-muscle lisse, qui eux, sont dirigés particulièrement contre les filaments d'actine (164). Ces derniers sont normalement détectés à de hauts niveaux dans le sérum des patients avec HAI de type I (159).

Par contre, la présence d'anticorps anti-microsomes du foie et des reins (anti-LKM1) et/ou d'anticorps anti-cytosol du foie de type I (anti-LC1) est associée avec l'HAI de type 2. Les anti-LKM1 ont pour cible une protéine de 50kDa, le cytochrome P450 2D6, impliquée dans le métabolisme des médicaments et des xénobiotiques (165, 166). Les anti-LC1 sont dirigés contre la formiminotransférase cyclodésaminase (62 kDa) (167), une enzyme bifonctionnelle qui participe à la conversion de l'histidine en acide glutamique (168). Ces deux autoantigènes sont principalement exprimés dans le foie (168, 169). Dans la moitié des cas d'HAI de type 2, des anticorps anti-LKM1 sont les seuls marqueurs sérologiques détectés (157, 158, 164), alors que dans une moindre proportion (10 %), ce sont les anti-LC1 seulement (170). Par contre, il est possible de détecter les deux types d'autoanticorps simultanément dans environ 40 % des cas répertoriés (171). Les anti-LKM1 peuvent être présents dans d'autres maladies, telles que l'hépatite médicamenteuse, l'APECED/APS-1 et dans certains cas d'hépatites C et D chroniques (164). Également, des anti-LC1 sont détectés chez environ 12 % des patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC), avec ou sans la présence d'anti-LKM1 (172).

D'autres autoanticorps peuvent être détectés, bien qu'à des titres beaucoup plus faibles, tels que les anticorps anti-antigènes solubles du foie (anti-SLA - *anti-soluble liver antigen*). Les anti-SLA reconnaissent notamment une protéine d'environ 50kDa associée à l'ARN de transfert suppresseur UGA ou tRNP^{(Ser)Sec} (173-175). Également, des anticorps anti-récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGP-R - *anti-asialoglycoprotein receptor*) sont retrouvés surtout chez les cas d'HAI type 1 (75 %), alors qu'il ne sont présents que chez 40 % des cas de type 2 (176). De plus, il a été noté que les autoanticorps dirigés contre le récepteur de l'asialoglycoprotéine sont de bons marqueurs de l'inflammation, puisque leur

titre corrèle avec l'activité de la maladie. Cependant, puisque certains de ces autoanticorps sont très souvent absents chez les patients ou encore détectés chez des sujets sains, ils ne peuvent pas être considérés de bons marqueurs pour mener au diagnostic d'une HAI.

1.4.3.2 Réponse humorale

La réponse humorale chez les patients atteints d'HAI a été longuement étudiée et est donc très bien caractérisée comparativement à la réponse T. Les patients atteints d'HAI de type 2 reconnaissent principalement cinq épitopes linéaires, soit le CYP2D6₁₉₆₋₂₁₈, le CYP2D6₂₅₄₋₂₇₁, le CYP2D6₃₂₁₋₃₅₁, le CYP2D6₃₇₃₋₃₈₉ et le CYP2D6₄₁₀₋₄₂₉. Le plus important est le CYP2D6₂₅₄₋₂₇₁ (72, 177-180). De plus, il a été démontré que l'épitope conformationnel CYP2D6₃₁₆₋₃₂₇ pourrait s'avérer être une cible préférentielle des anti-LKM1, bien que certaines études aient établi que l'entièreté de la partie C-terminale contribuerait à l'immunogénicité de la protéine (181).

Pour ce qui est des sites immunogéniques ciblés par les anti-LC1, il a été démontré que les 146 acides aminés de la portion C-terminale de la protéine FTCD étaient suffisants pour détecter tous les patients séropositifs, ce qui laisserait croire qu'au moins un épitope majeur reconnu par tous les patients se trouve dans cette région de la protéine (179). Par contre, un autre groupe de chercheurs a obtenu des résultats qui diffèrent de ceux trouvés par Vitozzi *et al.* En effet, dans leur cohorte de patients avec une HAI de type 2, 40 % des sérums reconnaissent à la fois la région N- (aa 1-339) et C-terminale (aa 332-541), 35 % la portion N-terminale seulement et 35 % ne reconnaissent aucune des deux. Aucun des sérums ne réagissait qu'avec la partie C-terminale seulement (182). Ces différences pourraient être expliquées par l'espèce utilisée pour l'étude. Le groupe de Vitozzi *et al.* a procédé à l'étude à l'aide de la FTCD humaine, alors que le groupe de Muratori *et al.* a plutôt utilisé la protéine du rat. Enfin, tout comme pour les anti-ASGP-R, les niveaux des anti-LC1 corrélaient avec les niveaux d'ALT sériques et donc avec l'activité de la maladie (183). De ce fait, ces derniers pourraient donc être utilisés pour suivre l'évolution de la maladie ainsi que l'efficacité du traitement immunosuppresseur (184, 185).

Le rôle des autoanticorps dans le processus pathologique de l'HAI reste un sujet de controverse, puisqu'aucune étude n'a pu apporter d'éléments démontrant clairement leur implication. Deux mécanismes impliquant les anticorps ont été proposés pour expliquer la lyse des cellules hépatiques. Premièrement, il y a la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC - *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) qui consiste à la liaison d'un anticorps spécifique à l'antigène. Par la suite, des cellules immunitaires ayant un potentiel cytotoxique se lient à la région Fc de l'anticorps via leurs récepteurs membranaires et induisent la lyse de la cellule cible (186). Les cellules immunitaires pouvant participer à l'ADCC sont les cellules NK, les macrophages, les monocytes, les neutrophiles et les éosinophiles. Le deuxième mécanisme proposé est la lyse médiée par le complément. Il existe trois voies d'activation du complément (classique, lectine et alterne), mais seulement la voie classique implique une liaison antigène/anticorps et peut conséquemment être considérée dans la lyse des hépatocytes (187). La plupart des autoantigènes impliqués dans l'HAI sont intracellulaires, bien qu'il y ait controverse quant à la localisation du CYP2D6 (188-191). Or, pour que les phénomènes de lyse mentionnés ci-haut puissent survenir, les antigènes doivent obligatoirement être exposés à la surface de la cellule. Jusqu'à ce jour, un seul antigène pourrait être impliqué dans le déclenchement de la réponse immune, le récepteur de l'asialoglycoprotéine, puisqu'il a été démontré qu'une portion de la protéine reconnue par les autoanticorps serait exposée à la surface (192). Par contre, il semble moins probable que la lyse survienne par l'activation de la voie classique du complément puisque chez un nombre important de patients, il y a une déficience en composantes du complément, notamment le facteur C4 (193)

1.4.3.3 Réponse à médiation cellulaire

Chez les patients atteints d'HAI, peu de choses sont connues sur la réponse à médiation cellulaire. Des cellules T contre le CYP2D6 et le récepteur de l'asialoglycoprotéine ont notamment été isolées de biopsies hépatiques ainsi que du sang périphérique des patients atteints d'HAI. Dans ce cas, elles se sont avérées être des lymphocytes T CD4⁺ de type Th1 qui pouvaient sécréter de l'IFN- γ et du TNF- α (192, 194,

195). Plusieurs épitopes du CYP2D6 sont reconnus par les lymphocytes isolés de patients atteints d'HAI. Parmi eux, mentionnons les épitopes CYP2D6₃₀₅₋₃₆₄ et CYP2D6₄₁₀₋₄₄₄ qui ont été identifiés à partir du sang périphérique (196). Un fait très intéressant à propos de ces épitopes est qu'ils se retrouvent dans la même région antigénique que les séquences reconnues par les lymphocytes B. Une autre étude réalisée par le groupe de Longhi *et al.*, mais cette fois en isolant des lymphocytes T CD8⁺ intrahépatiques, a montré que l'épitope majoritairement reconnu par ces derniers était le CYP2D6₂₄₅₋₂₅₄ (197).

Malgré le peu de connaissance sur la réponse T, il existe tout de même de plus en plus d'évidences convaincantes sur le rôle de la réponse à médiation cellulaire dans la maladie. Tout d'abord, on sait que certains patients infectés par le VHC développent une réaction autoimmune contre le foie. On retrouve des anticorps anti-LKM1 chez 2-10 % des patients infectés par le VHC (74, 198), alors que 12 % des patients possèdent des anticorps anti-LC1 (172). Des chercheurs ont montré qu'il existait une réponse croisée au niveau de la réponse à médiation cellulaire entre un épitope du VHC (Core₁₇₈₋₁₈₇) et des autoantigènes membres de la famille des cytochromes P450 (CYP2A₆₈₋₁₇ et CYP2A₇₈₋₁₇) (199). Ceci est une preuve supplémentaire que le mimétisme entre un agent infectieux et un autoantigène pourrait déclencher un processus autoimmun au niveau du foie. Un autre exemple de l'implication de la réponse immune à médiation cellulaire est le modèle animal créé par le groupe de Kuriki *et al.* Ce modèle animal consistait à immuniser des souris avec un homogénat de foie syngénique couplé à un adjuvant. Ils ont réussi à reproduire l'atteinte autoimmune au foie par transfert adoptif des splénocytes des souris immunisées à des souris syngéniques irradiées (200). Ensuite, une corrélation entre l'activité de la maladie des patients atteints d'HAI et l'intensité de la réponse des lymphocytes T CD8⁺ a été établie (197). Enfin, il s'avère que les patients atteints d'HAI posséderaient moins de cellules Treg que la normale et que ces dernières auraient un déficit fonctionnel. Ainsi, les cellules T autoréactives CD4⁺ et/ou CD8⁺ ne seraient plus sous l'immunosurveillance des lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ et c'est pourquoi il y aurait perpétuation de la réponse autoimmune (201).

Paramètres	Pointage
Genre	
Féminin	+2
Masculin	0
Biochimie du sérum	
Ratio de l'élevation alcaline phosphatase vs aminotransférase sérique	-2
> 3,0	0
1,5-3,0	+2
< 1,5	
Globuline, γ-globuline ou IgG totales dans le sérum	
Nombre de fois la normale	
> 2,0	+3
1,5-2,0	+2
1,0-1,5	+1
< 1,0	0
ANA, SMA ou LKM-1	
Titres obtenus par immunofluorescence sur tissus murins	
> 1 :80	+3
1 :80	+2
1 :40	+1
< 1 :40	0
AMA	
Positif	-4
Négatif	0
Séropositivité pour d'autres autoanticorps définis	
pANCA, anti-LC1, anti-SLA-LP, anti-ASGPR, anti-sulfatide	+2
Marqueurs d'hépatite virale (VHA, VHB, VHC)	
Positif	+3
Négatif	-3
Historique d'usage de drogues	
Oui	-4
Non	+1
Alcool (consommation moyenne)	
< 25 g/jour	+2
> 60 g/jour	-2
Facteurs génétiques (HLA DR3 ou HLA DR4)	
Oui	+1
Autres maladies autoimmunes	
Oui	+2
Histologie du foie	
Hépatite d'interface	+3
Infiltrat à prédominance lymphocytaire	+1
Cellules hépatiques en rosette	+1
Aucune des situations ci-dessus	-5
Changements biliaires	-3
Autres changements	-3
Réponse à la thérapie	
Complète	+2
Rechute	+3

Figure 1: Système de pointage pour le diagnostic d'une HAI élaboré par le Groupe International sur l'HAI. Figure adaptée d'Alvarez *et al.* J Hepatol 1999 (160)

1.4.3.4 Système de pointage

Afin de faciliter le diagnostic d'une HAI, un système de pointage a été développé par le Groupe International sur l'HAI. Ce système, qui s'est avéré très efficace pour le diagnostic, avec une sensibilité de 97-100 % (158, 160, 202), permet d'attribuer un certain nombre de points (positifs ou négatifs) selon une grille de paramètres bien établis, en considérant par exemple les niveaux d'autoanticorps sériques, la consommation quotidienne d'alcool, l'existence de certains marqueurs d'une infection virale, le sexe et la génétique du patient (153) (Figure 1). Un pointage au-delà de 15 avant traitement ou de 17 en cours de traitement nous assure d'un cas d'HAI. Par contre, si un patient obtient un pointage entre 10-15 ou entre 12-17 avant ou après un traitement immunosuppresseur respectivement, le diagnostic en est un d'HAI « probable ».

L'histologie est une caractéristique importante dans le diagnostic d'une HAI et permet de définir la gravité de la maladie. L'échelle d'Ishak est couramment utilisée

pour quantifier le degré d'inflammation hépatique et celle-ci se base sur la présence des

critères suivants : 1) hépatite périportale ou d'interface, 2) nécrose focale, 3) nécrose focale ou inflammation intralobulaire, et enfin, 4) inflammation portale (203). Dans la majorité des biopsies prélevées chez des enfants atteints d'HAI, il y a présence d'inflammation portale et lobulaire d'intensité modérée à sévère ainsi que d'une hépatite d'interface. Également, on retrouve la présence de nécrose en ponts dans plus de la moitié des cas (158, 202). Enfin, dans certains cas d'hépatite jugés sévères, l'histologie peut démontrer un parenchyme transformé par la présence de rosettes et de cellules géantes multinucléées (202).

1.4.3.5 Susceptibilité génétique

L'HAI est considérée comme une maladie polygénique, où plusieurs gènes ont été identifiés comme facteurs de prédisposition. Les gènes les plus importants seraient les gènes du CMH, plus précisément les gènes « *human leucocyte antigen* » (HLA). Il existe trois régions majeures du CMH : I, II et III. La région du CMH I code pour les HLA-A, -B et Cw. Celle du CMH II, quant à elle, code pour les HLA-DR, -DQ et -DP et enfin, la région CMH III est responsable de la production de protéine impliquées dans la réponse immunitaire, telles que le facteur de nécrose des tumeurs- α et - β (Tumor necrosis factor - TNF- α et TNF- β), certaines composantes du complément (C2, C4A, C4B et Bf), la protéine de choc thermique et Mic- α et Mic- β (159, 204). Chez les Caucasiens, les gènes HLA-A1, HLA-B8 et HLA-DR3 ont été associés à l'HAI de type 1. De plus, lorsque tous ces allèles sont présents chez un même individu, le risque de développer une HAI de type 1 est encore plus élevé (205). En plus de ce risque accru, les patients ayant un haplotype HLA A1-B8-DR3 sont significativement plus jeunes et répondent moins bien aux traitements. Conséquemment, ils ont plus de chances de rechute durant le traitement et ont plus souvent besoin d'une transplantation hépatique (156). Également, d'autres MAI ont été associées avec le HLA-DR3, telles que la maladie de Graves, la myasthénie grave et le SLE (205). Enfin, un autre allèle, le HLA-DR4, est associé avec l'HAI de type 1. Cet allèle a également été relié à la présence d'autres MAI concomitantes, soit la thyroïdite autoimmune, la maladie de Graves, la colite ulcéreuse et l'anémie pernicieuse (206). Dans

la population japonaise (35, 207, 208) et la population mexicaine (209), le HLA-DR4 semble être relié à une plus grande susceptibilité à l'HAI de type 1. Chez les Argentins caucasiens, le HLA-DR4 est également associé à une susceptibilité à l'HAI. Cependant un autre allèle, le HLA-A11, conférerait également un risque accru d'être atteint d'une HAI de type 1(36).

Pour ce qui est de l'HAI de type 2, il semble qu'il n'y ait pas d'association avec HLA DR3 ou DR4 au sein d'une cohorte allemande (210). Par contre, l'allèle HLA DRB1*07 semble être un facteur de risque plus important de développer une HAI de type 2 puisqu'il a été retrouvé aussi bien chez les Allemands que chez les Brésiliens. D'autres allèles ont été identifiés comme facteurs de risques, soit une combinaison des HLA DRB1*15 et DQB1*06 pour les Allemands et le HLA DRB1*03 dans la population brésilienne (211, 212). Une autre étude a également démontré une association entre le HLA-DQB1*0201, HLA-DRB1*03 et HLA-DRB1*07 et la susceptibilité à l'HAI de type 2 dans une cohorte pédiatrique caucasienne (213, 214).

Ensuite, un autre gène de susceptibilité dans la région du CMH a été identifié, le facteur C4 du complément. Tel que mentionné précédemment, le facteur C4 est retrouvé à de faibles niveaux chez les patients avec une HAI. Le groupe de Vergani *et al.* a décelé une association entre une mutation délétère dans le gène C4 qui corrélait avec la faible quantité de C4 retrouvée dans le sérum des patients et donc à un facteur de risque plus élevé de développer la maladie (193, 215, 216).

Bien que les gènes du CMH semblent jouer un rôle important dans la susceptibilité à l'HAI, d'autres gènes hors CMH seraient également impliqués, notamment la molécule CTLA-4 et le facteur de transcription AIRE. CTLA-4 est un récepteur exprimé entre autre à la surface des cellules T et qui sert à réguler négativement la réponse immunitaire lorsque l'infection est sous contrôle et pour éviter une activation prolongée des lymphocytes. Un déséquilibre de liaison a été noté dans la transmission d'un certain polymorphisme dans une population pédiatrique (Canadien français et Français) atteinte d'HAI de type 1, alors qu'aucune association n'a pu être faite pour le type 2 (217). Cependant, il ne semble pas

que la molécule CTLA-4 soit associée à l'HAI dans toutes les populations puisque le groupe de Bittencourt *et al.* n'a trouvé aucune différence entre le groupe contrôle et les patients avec une HAI de type 1 ou de type 2 dans une cohorte brésilienne (218). Finalement, plusieurs études ont établi qu'aucune association n'existait entre le gène AIRE et l'HAI de type 1 ou 2 (214, 219, 220). Cependant, une de ces études suggère que la présence de certains polymorphismes dans le gène AIRE et d'une HAI chez un patient pourraient laisser présager le développement éventuel des symptômes associés à l'APECED (220)

1.4.3.3 Facteurs environnementaux

Comme c'est le cas pour plusieurs maladies, les facteurs environnementaux sont souvent mis en cause pour le déclenchement d'une maladie. L'étude de jumeaux monozygotes a permis de démontrer que l'environnement dans lequel les individus évoluaient avait un impact sur le développement ou non d'une maladie. Puisque les jumeaux monozygotes possèdent exactement la même constitution génétique, ce facteur peut être écarté et un ou plusieurs éléments de l'environnement peuvent être pointés du doigt. Dans le cas de l'HAI, deux événements majeurs ont été proposés comme éléments déclencheurs de la réaction autoimmune : une infection préalable par un virus hépatotrope ou encore une hépatite médicamenteuse (147, 156).

Dans les cas d'infection virale, aucune preuve définitive n'a pu être apportée puisque souvent, lorsque l'HAI est diagnostiquée, il ne reste plus de traces de l'infection. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le déclenchement de l'HAI, soit le mimétisme moléculaire, la modification ou la relâche de protéines du soi séquestrées par le virus, une activation polyclonale des lymphocytes ou encore l'activation de lymphocytes par une relâche massive de cytokines.

Le mimétisme moléculaire peut survenir lorsqu'un anticorps ou une cellule T dirigés contre un peptide étranger (ex. bactérien ou viral) peut également réagir contre une protéine du soi qui est très similaire. Un tel cas a été détecté chez des patients infectés par le VHC et positifs pour la présence d'anticorps anti-LKM1. En effet, les anti-LKM1

retrouvés dans le sérum de ces patients pouvaient réagir contre deux protéines du VHC, soit NS3 et NS5a. De plus, l'épitope reconnu par les autoanticorps isolés de ces patients infectés chroniquement avec le VHC est situé dans la même région qu'un des épitopes majeurs reconnu par les patients atteints d'HAI de type 2 (74). De plus, un autre cas de mimétisme moléculaire avec une autre protéine du VHC (la protéine E1) a également été reporté par Bogdanos *et al.* dans une cohorte similaire de sujets atteints d'hépatite C et ayant des anti-LKM1. Cependant, pour que la détection de cette réaction croisée soit possible, les patients devaient posséder un haplotype particulier, soit le HLA B51 (221). De plus, une similitude entre l'épitope majeur des anti-LKM1 et une protéine du virus de l'VHS type 1, IEP175, a été rapportée (72, 222). De la même manière, un cas de mimétisme moléculaire entre la protéine FTCD et la protéine 101K du HHV-6 a été suggéré par Lapierre *et al.* (73). L'hypothèse de mimétisme moléculaire a été vérifiée dans plusieurs modèles animaux d'HAI (223, 224), mais également dans d'autres cas de maladies autoimmunes comme par exemple le diabète de type 1 (225, 226) et l'encéphalomyélite allergique expérimentale (227).

Pour ce qui est des cas d'HAI induite par les médicaments, plusieurs cas d'hépatite ont été décelés surtout chez de jeunes femmes qui étaient traitées par la minocycline. Cet antibiotique utilisé notamment contre l'acné provoquait également l'apparition d'un syndrome apparenté au lupus avec les caractéristiques qui y sont habituellement associés (anticorps anti-nucléaire, p-ANCA et certains autoanticorps dirigés contre des protéines hépatiques) (228, 229). Heureusement, les symptômes disparaissent généralement avec l'arrêt du traitement. De telles manifestations pourraient être expliquées par une modification des différents antigènes du soi par le médicament. Selon cette hypothèse, les protéines modifiées deviendraient des néoantigènes qui seraient nouvellement reconnus par le système immunitaire, induisant ainsi la réponse autoimmune (159).

1.4.3.4 Traitements

Puisqu'il n'existe pas encore de traitement spécifique contre l'HAI, la prise d'immunosuppresseurs est préconisée. Chez l'adulte, il a été montré que dans 75 % des cas,

l'état des patients traités avec des immunosuppresseurs s'améliorait (230). De plus, le taux de survie après 10 ans se situe entre 80-93 % (231). Cependant, si les patients ne subissent aucun traitement immunosuppresseur, leur chance de survie est grandement diminuée. Effectivement, le taux de survie après 5 ans est de 50 %, alors qu'après 10 ans, il n'est que de 10 % (232-234).

Le traitement le plus couramment utilisé est l'administration de prednisone et/ou d'azathioprine. La prednisone est un corticostéroïde synthétique qui intervient à plusieurs niveaux dans l'instauration de la réponse immunitaire, notamment en diminuant la perméabilité vasculaire et en inhibant l'adhérence et l'activation des cellules immunitaires. Quant à l'azathioprine, elle est un analogue des purines et conséquemment elle empêcherait la prolifération cellulaire en inhibant la synthèse des purines ou encore endommagerait leur ADN en s'y incorporant à la place des « vraies » purines (235). Les doses varient selon l'intensité de la maladie, allant de 0,3 à 1,0 mg/kg/jour pour la prednisone et de 1,0 à 3,0mg/kg/jour pour l'azathioprine (147).

Bien que les corticostéroïdes soient le traitement le plus utilisé, ceux-ci permettent de provoquer une panoplie d'effets secondaires indésirables chez les patients. Fréquemment, ils doivent être administrés à hautes doses afin de contrôler l'inflammation et conséquemment, ils provoquent une diminution du taux de croissance chez l'enfant, une intolérance au glucose, un faciès cushingoïde, une prise de poids, de l'ostéoporose, des vergetures sur l'abdomen ou les hanches, des problèmes psychiatriques, de l'hypertension, des infections opportunistes et enfin, des cataractes (236). Conséquemment, des alternatives thérapeutiques ont été proposées. L'une d'elles est l'utilisation de la cyclosporine, qui est couramment utilisée comme immunosuppresseur dans la greffe hépatique, et qui s'avère efficace dans le contrôle de la maladie en plus d'occasionner peu d'effets secondaires lorsqu'utilisée pendant une courte période de temps (202). La cyclosporine est habituellement prescrite comme traitement primaire, d'une durée d'environ 6 mois, pour ensuite être remplacée par de faibles doses de prednisone et d'azathioprine (202).

Au cours des études, certaines caractéristiques retrouvées chez les patients atteints d'HAI ont été associées à un mauvais pronostic. Celles-ci incluent le jeune âge du patient, la présence d'anticorps anti-LKM1, de hauts niveaux de bilirubine totale et enfin un score histologique élevé au moment du diagnostic (158). De plus, la plupart des patients se présentant avec une hépatite fulminante n'ont habituellement pas ou très peu de réponse au traitement (155).

1.5 Modèles animaux d'HAI

Le traitement actuel contre l'HAI consiste en une immunosuppression générale étant donné nos connaissances très restreintes sur la maladie. Afin de permettre le développement d'un traitement plus efficace, spécifique et avec le moins d'effets secondaires indésirables, il est essentiel de comprendre les mécanismes régissant le développement et la perpétuation de la réaction autoimmune. Pour ce faire, le développement d'un modèle animal est essentiel. Plusieurs tentatives ont été réalisées jusqu'à maintenant pour créer un modèle efficace, mais aucun n'est parvenu à regrouper l'ensemble des caractéristiques cliniques présentes chez les patients atteints d'HAI. Afin d'obtenir un modèle animal optimal, le plus grand nombre des caractéristiques typiques de l'HAI devrait être rassemblé, notamment la présence d'autoanticorps dirigés contre les antigènes hépatiques, une inflammation lymphoplasmocytaire chronique dans le foie qui mènerait éventuellement à une fibrose hépatique et enfin, la démonstration de l'implication de certains facteurs génétiques. Plusieurs différents types de modèles d'HAI ont été générés en utilisant divers concepts, comme par exemple la surexpression d'antigènes hépatiques, la conception de souris transgéniques ou invalidées pour un gène particulier (KO) ou encore l'utilisation de composantes qui activent ou suppriment la réponse immune telles des cytokines (ex. TGF- β) ou des molécules agissant comme adjuvant (Ex. Concanavaline A).

1.5.1 Injection du S-100

Un des premiers modèles générés et également l'un des plus étudiés est sans aucun doute celui du S-100 (200, 237-239). Celui-ci est produit par l'injection de la fraction du surnageant 100 000g d'un homogénat de foie syngénique en combinaison avec l'adjuvant complet de Freund (CFA – *Complete Freund's adjuvant*) (239). Ces souris ont développé une hépatite d'une durée de 6 mois suite à une seule injection, avec une élévation modérée des transaminases. Le niveau des transaminases et l'histologie démontraient un pic de la réponse au cours de la 4^e semaine suivant l'injection avec une infiltration périvasculaire et des signes évidents de nécrose hépatique. Lohse et collègues ont également montré une influence du bagage génétique dans le développement de la maladie, les souris C57BL/6 étant plus susceptibles à la maladie que les BALB/C et les C3H. Des autoanticorps et des cellules T autoréactives spécifiques contre des antigènes du S-100 ont été détectés. Également, les auteurs ont pu démontrer la présence de cellules régulatrices parmi les splénocytes, qui pouvaient supprimer la fonction des cellules autoréactives *in vitro*, démontrant ainsi un rôle important des cellules T suppresses pour prévenir l'induction de l'hépatite (240). Ce modèle semblait bien prometteur jusqu'à ce qu'une étude subséquence ait dévoilé que l'injection de CFA seul provoquait l'apparition d'inflammation non spécifique notamment dans le foie, les poumons et la rate et n'était donc pas spécifique d'organe (241).

1.5.2 Concanavaline A

Dans les années 90, un autre modèle couramment utilisé pour l'étude de l'hépatite aiguë est celui de la Concanavaline A (ConA). La ConA est une lectine mitogène provenant d'un extrait de plante qui, lorsqu'injectée, engendre une activation polyclonale, et donc non spécifique, des cellules T qui génèrent par la suite une inflammation hépatique. En plus de l'activation directe des lymphocytes (242), la relâche de cytokines par les lymphocytes activés activerait les cellules environnantes par effet de proximité (phénomène connu sous

l'appellation « *bystander effect* » dans la littérature anglaise). La ConA participerait à l'induction de la cytotoxicité des cellules T, de servir de point d'attache entre les cellules cibles et les cellules effectrices, permettant ainsi à ces dernières de médier leurs effets (243). La mort des hépatocytes serait cellules T dépendante, puisqu'aucun dommage n'est détecté chez des souris SCID (ni B ni T) et athymiques (242, 244-246). L'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD4⁺ a permis de déterminer plus précisément un rôle essentiel de ces cellules dans les dommages hépatiques. De plus, il a été démontré que les cellules de Kupffer, les cellules NK et NKT seraient également nécessaires puisque leur déplétion prévient l'apparition d'une hépatite (242, 247). Il semble que l'atteinte hépatique n'ait pas d'association avec le bagage génétique puisque les deux lignées de souris étudiées (BALB/c et C57BL/6) étaient aussi susceptibles l'une que l'autre (242, 248). Les auteurs ont également démontré qu'ils pouvaient prévenir l'inflammation en traitant préalablement les souris avec des immunosuppresseurs (cyclosporine A et FK506) couramment utilisés pour traiter certaines maladies autoimmunes, incluant l'HAI (202).

Bien que ce modèle comporte certaines caractéristiques générales de l'HAI, il n'est pas très représentatif de la complexité de cette maladie. L'absence de chronicité, de l'implication de facteurs génétiques et surtout de la non-spécificité de la réponse immunitaire médiant les dommages hépatiques limitent grandement l'utilisation de ce modèle pour l'étude de l'HAI.

1.5.3 Souris transgénique IFN- γ

Le groupe de Toyonaga *et al.* a développé un modèle de souris transgéniques qui expriment de l'IFN- γ (Tg-IFN- γ), une cytokine pro-inflammatoire, sous le contrôle du promoteur de la composante P de l'amyloïde sérique. Ce promoteur permet une expression spécifique au niveau du foie (249). L'étude de ces souris Tg-IFN- γ a permis de détecter une augmentation progressive des transaminases hépatiques à partir de la semaine 4 qui corrélait avec l'apparition d'inflammation lobulaire suivie d'une infiltration portale. Les auteurs soutiennent même qu'il y aurait présence de fibrose à la semaine 26. Aucune

inflammation ailleurs que dans le foie n'a été retrouvée. La spontanéité, la chronicité, l'inflammation exclusivement retrouvée dans le foie ainsi que les niveaux élevés des transaminases maintenus sur une longue période sont des caractéristiques importantes retrouvées chez les patients atteints d'HAI. De plus, ces souris transgéniques permettent de démontrer que l'expression d'IFN- γ à des niveaux physiologiquement significatifs promeut la perpétuation de l'inflammation et dénote généralement d'une réponse de type Th1 telle que retrouvée dans l'HAI (250). Cependant comme pour le modèle de la ConA, l'inflammation est non spécifique à un ou des antigènes donnés. Ceci est une importante lacune pour un modèle d'HAI puisque la présence d'autoanticorps dirigés contre le noyau et/ou les muscles lisses (HAI de type 1) ou anti-LKM1 et/anti-LC1 (HAI de type 2) est souvent utilisée comme marqueurs de la maladie.

1.5.4 Souris transgénique Alb-GP33

Un modèle de souris transgéniques exprimant l'épitope majeur CD8⁺ de la glycoprotéine 33 (GP33) du LCMV (Alb-GP33) a été généré par l'équipe de Voehringer (251). Dans ce modèle, la GP33 était sous le contrôle du promoteur de l'albumine. Conséquemment, non seulement la protéine était exprimée dans le foie, mais elle l'était également dans le thymus. L'expression thymique d'antigène du soi ou encore de néo-antigène comme la GP33 provoque généralement une délétion des clones autoréactifs afin d'éviter toute réaction autoimmune éventuelle. En effet, les auteurs ont découvert que près de 90 % des cellules T CD8⁺ spécifiques avaient été éliminées et donc, aucune réaction autoimmune spontanée contre la GP33 n'a pu être décelée dans le foie ni ailleurs. Puisque la délétion clonale était incomplète, ils ont tenté de briser la tolérance des clones toujours présents de deux façons : 1) en effectuant un transfert adoptif de cellules T naïves arborant un TCR transgénique spécifique à la GP33 dans les souris Alb-GP33; 2) en infectant les souris Alb-GP33 avec le LCMV qui exprime naturellement la GP33. Dans les deux cas, aucune élévation des transaminases n'a pu être décelée suggérant que les clones T étaient probablement dans un état d'ignorance face à l'antigène.

Afin d'induire une hépatite qui n'a été que transitoire, ils ont dû croiser la lignée Alb-GP33 avec une autre souris transgénique, la 107.5, qui exprime un antigène du virus de l'hépatite B (HBsAg) la rendant ainsi plus sensible aux cytokines pro-inflammatoires (251). Par la suite, ils ont eu recours à un transfert adoptif de cellules TCR Tg GP33 en plus d'une infection au LCMV. En considérant tous les efforts qu'ils ont dû mettre pour provoquer une hépatite transitoire, il est clair que ce modèle serait davantage approprié pour l'étude des différents mécanismes de tolérance des cellules T CD8⁺, telle que l'ignorance, plutôt que comme un modèle d'HAI. De plus, il semble peu probable que toutes ces conditions soient regroupées dans un contexte dit physiologique.

1.5.5 Souris invalidée pour le TGF- β 1

En 2001, l'utilisation de souris BALB/c invalidées pour la cytokine immunorégulatrice TGF- β 1 (TGF- β 1^{-/-}) a été proposée comme modèle d'HAI. Ces souris développent une inflammation spontanée du foie qui serait dépendante de la présence d'IFN- γ , en plus de lésions au cœur et aux poumons provoquant la mort de la plupart des souris autour de l'âge de deux semaines. L'infiltrat serait composé de cellules Th1 et les lymphocytes T CD4⁺ seraient essentiels à l'initiation de l'inflammation et à la cytolyse des hépatocytes, des caractéristiques également retrouvées chez des patients atteints d'HAI (252-254). Le bagage génétique s'est avéré être un facteur important quant aux répercussions engendrées par l'ablation du gène, notamment sur les organes touchés par l'inflammation. En effet, il semble que les souris 129/CF-1 soient résistantes au développement d'une hépatite, mais présentent de l'inflammation au cœur et aux poumons. Pour ce qui est des souris C57BL/6 TGF- β 1^{-/-}, l'histologie montre la présence de lésions au cœur, aux poumons, aux glandes salivaires et à l'intestin (255).

Enfin, bien que ce modèle soit spontané avec une forte influence du bagage génétique et démontre également l'implication des cellules CD4⁺ de type Th1, il comporte plusieurs lacunes. En effet, dans ce modèle on ne retrouve aucune prépondérance féminine, l'inflammation ne semble pas être spécifiquement dirigée contre un ou des antigènes

hépatiques et surtout, l'atteinte n'est pas uniquement limitée au foie. Les auteurs concluent même que l'inflammation du foie serait fort probablement le résultat du recrutement de cellules T activées en périphérie combiné à l'environnement inflammatoire local, c'est-à-dire par un effet de proximité.

1.5.6 Souris transgénique TTR-NP

Un nouveau modèle d'HAI a été généré dans notre laboratoire par vaccination à ADN (223). Des souris transgéniques exprimant la nucléoprotéine du LCMV (NP) dans le foie sous le contrôle du promoteur de la transthyréline (TTR) ont été générées. Afin d'éviter une délétion des clones au niveau du thymus comme ce fut le cas pour le modèle de la souris Alb-GP33, le promoteur de la transthyréline a été utilisé. Ce dernier a été modifié de façon à ce que l'expression de la NP soit exclusive au foie. Les souris ont été co-injectées par voie intramusculaire avec un plasmide codant pour la NP en combinaison avec un plasmide codant pour une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-12. Plusieurs caractéristiques de l'HAI étaient présentes dans ce modèle : une élévation des ALT à partir du 5^e mois après l'injection, des anticorps et des cellules cytotoxiques contre la NP et enfin une inflammation portale, périportale et intralobulaire.

1.5.7 Xénoimmunisation avec des autoantigènes humains

En 2004, un nouveau modèle murin d'HAI a été suggéré par notre laboratoire (224). Ce dernier est basé sur le principe du mimétisme moléculaire discuté plus haut, phénomène qui a été longuement suggéré dans le développement de l'HAI. Des souris C57Bl/6 de type sauvage ont été vaccinées avec de l'ADN codant pour les deux autoantigènes humains principaux retrouvés dans l'HAI de type 2, soit le CYP2D6 et la FTCD, en combinaison avec un plasmide codant pour l'IL-12 afin de favoriser une réponse Th1. Au 4^e mois après l'injection, les niveaux de transaminases sériques ont commencé à augmenter, alors que le pic de la réponse humorale se situait plutôt au 2^e mois ainsi qu'au 7^e mois où une légère augmentation du titre d'anticorps a été enregistrée. L'injection

d'ADN a causé une infiltration de lymphocytes au foie. Ces infiltrats renfermaient une prédominance de lymphocytes T CD4⁺ par rapport au CD8⁺ et l'analyse des différents isotypes d'anticorps a permis de déterminer que la réponse engendrée était de type Th1. De plus, une réponse contre la protéine chimère humaine était présente initialement, cependant cette réponse s'est progressivement dirigée vers les autoantigènes murins en fonction du temps. Ce phénomène amène une preuve supplémentaire vers l'hypothèse du mimétisme moléculaire entre une protéine du soi et celle d'un virus dans le déclenchement d'une HAI.

En se basant sur les résultats obtenus des deux modèles animaux d'HAI de notre laboratoire, nous avons décidé d'étudier le rôle qu'aurait un virus dans le développement d'une HAI. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser un adénovirus recombinant qui exprimerait les deux autoantigènes majeurs responsables de l'atteinte hépatique présente chez les patients atteints d'HAI de type 2, soit le cytochrome P450 2D6 et FTCD. Afin d'investiguer davantage l'hypothèse du mimétisme moléculaire, nous avons choisi d'insérer les autoantigènes humains dans le génome d'un adénovirus. Si on compare les autoantigènes humains et murins, il existe une homologie de séquences d'environ 80 %.

1.6 Adénovirus

1.6.1 Biologie et pathogénèse

Les adénovirus, de la famille des Adenoviridae, sont des virus de grande taille, de 80-110 nm de diamètre; ils possèdent un génome à ADN linéaire bicaténaire (36kb). Ils ne possèdent pas d'enveloppe, ce qui leur permet d'être plus résistants. Ce virus a été isolé pour la première fois à partir d'une culture d'amygdales en 1953 par Rowe (256). Les adénovirus causent généralement des infections bénignes, telles des infections de l'appareil respiratoire, des kératoconjunctivites ou encore des gastroentérites (256). La transmission se fait majoritairement par aérosol ou encore par voie oro-fécale. Il existe 51 sérotypes distincts pouvant infecter l'homme et qui sont regroupés en 6 groupes (A-F) (257). On estime à environ 40-60 % de la population pédiatrique qui est séropositive pour l'un ou

l'autre des sérotypes, les plus courants étant les sérotypes 1, 2 et 5 (258-260). Il semblerait que l'adénovirus peut entrer en latence puisqu'on a pu isoler de l'ADN à partir de lymphocytes circulants chez certains patients et ce, plusieurs mois après l'infection. Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes et les composantes virales impliqués dans ce processus. Également, certains sérotypes ont été détectés dans des tissus cancéreux, mais aucune association pathogénique n'a été montrée (256).

1.6.2 Vaccin et thérapie génique

De plus en plus, la science a recours à de nouvelles méthodes pour prévenir ou encore tenter de guérir certaines maladies. Les vecteurs viraux sont devenus à la mode dans les années 80 et 90, mais leur popularité a quelque peu diminué lorsqu'un patient est décédé lors d'un essai clinique de thérapie génique (261). Les vecteurs adénoviraux les plus couramment utilisés sont les sérotypes 2 et 5 qui ont été préalablement modifiés afin de limiter la réponse immunitaire primaire contre le vecteur. Plusieurs générations de vecteurs ont ensuite été créées. Les vecteurs de première génération ont subi une délétion des gènes E1 et/ou E3 ($\Delta E1/\Delta E3$). Les produits du gène E1 sont responsables de la production des gènes précoces et tardifs et sont donc essentiels à la réplication. Leur délétion rend donc le vecteur déficient pour la réplication et empêche ainsi la lyse des cellules visées par la thérapie. Un vecteur $\Delta E1$ doit être répliqué dans une lignée cellulaire qui complète en *trans* la réplication du virus en fournissant le facteur E1. Les gènes de la région E3 sont dits non essentiels puisqu'ils servent à moduler la réponse immunitaire lors d'une infection (262, 263) et peuvent donc être retranchés pour permettre l'insertion d'un plus grand transgène, ce dernier pouvant atteindre jusqu'à 8 kb si les gènes E1 et E3 sont supprimés (264). Il existe également des vecteurs dits de deuxième génération dans lesquels en plus des gènes E1 et E3, les produits des gènes E2 et E4 sont supprimés de façon partielle ou complète. Ces délétions permettent l'insertion de fragment pouvant atteindre 14 kb (264). Enfin, les adénovirus recombinants de troisième génération (*gutless*) sont dépourvus de tout gène viral et ne servent que de navette pour l'ADN qui y est inséré (265, 266). De cette

manière, la réponse immunitaire dirigée contre le vecteur lui-même est réduite au maximum et la taille du transgène qui peut y être inséré peut atteindre 37 kb. Conséquemment, les vecteurs de première génération sont utilisés principalement pour la vaccination, alors que ceux de deuxième et troisième génération le sont plutôt pour les essais de thérapie génique.

1.6.3 Distribution et mode d'entrée de l'adénovirus recombinant

La distribution de l'adénovirus recombinant dépend totalement du site d'injection choisi. Lorsque l'adénovirus est injecté par voie intraveineuse, il a été clairement démontré qu'il était capté en grande partie par le foie, i.e. que plus de 90 % des particules virales y seraient séquestrées (267-269). Une fois à l'intérieur du foie, l'adénovirus recombinant y cause une hépatite transitoire qui se résorbe habituellement dans un délai d'un mois selon la dose d'adénovirus injectée (270, 271). Par contre, s'il est injecté par voie intramusculaire, l'adénovirus demeure dans les cellules musculaires et infecte aussi les CPA présentes dans les ganglions lymphatiques secondaires avoisinants (268, 272).

Les récepteurs qui permettent l'entrée des adénovirus dans la cellule varient selon que l'infection se produit *in vivo* ou *in vitro*. *In vitro*, ils utiliseraient principalement le récepteur ubiquitaire CAR (*Coxsackie-adenovirus receptor*) comme attachement initial et se lierait ensuite à l'intégrine α_v pour leur ancrage final (273). Un troisième récepteur serait également impliqué, le glycosaminoglycan héparane sulfate (HSG - *heparan sulfate glycosaminoglycans*). Par contre, lorsque l'infection se fait *in vivo* et que l'adénovirus recombinant est injecté de façon systémique, la littérature rapporte plusieurs modes d'entrée. Tout d'abord, les adénovirus pourraient également utiliser les récepteurs CAR et l'intégrine α_v . Cependant, il semble que ceux-ci ne soient pas responsables du tropisme au foie puisque la distribution des particules virales ne correspond pas avec les niveaux d'expression de ces deux récepteurs (274). De plus, des mutations au niveau de la fibre (*knob fiber*) permettant l'abolition de la liaison au récepteur ne font que diminuer légèrement la quantité de particules recrutées au foie (Voir Figure 2 pour un schéma des

composantes de l'Ad). Conséquemment, d'autres facteurs doivent favoriser son entrée au foie. Le groupe de Lieber a démontré que l'entrée des particules serait facilitée par leur liaison à des facteurs du sang, le facteur de coagulation IX et une protéine se liant à la composante C4 du complément, qui leur permettraient de pénétrer dans la cellule via les glycosaminoglycans héparane sulfate et également via le récepteur de la lipoprotéine de basse densité (*low-density lipoprotein receptor-related protein*) (257). Également, un autre groupe, Zinn *et al.*, a établi que la composante du complément C3 (*complement component C3*) augmenterait les niveaux d'expression du transgène au niveau hépatique, prouvant ainsi qu'une plus grande quantité de particules étaient entrées au foie (275).

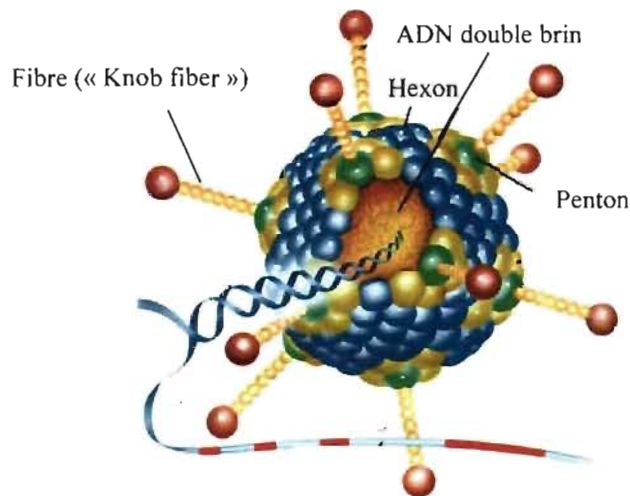


Figure 2 : Composantes structurales d'un adénovirus. L'adénovirus est un virus non enveloppé dont la capside icosaédrique est formée de 252 capsomères (bleu). Il possède 12 pentons (vert) et 240 hexons (arêtes). Chaque penton arbore une fibre ayant à son extrémité une sphère aux propriétés hémagglutinantes, d'où le nom « *knob fiber* ».

1.6.4 Réponse immunitaire contre l'adénovirus recombinant

Il a été rapporté que l'injection d'adénovirus, surtout ceux de première génération, provoquait une forte réponse innée et adaptative non seulement en raison de l'expression de gènes précoces ou du transgène, mais également par la seule présence de protéines de la capsid qui sont fortement immunogènes (276-278). Lorsque le vecteur adénoviral est injecté par voie intraveineuse, les cellules de Kupffer, les macrophages résidents du foie, phagocytent la majeure partie des particules virales et relâchent des chimiokines et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-6 (268, 279, 280). Les cellules de Kupffer seraient responsables de l'élimination de près de 90 % des particules virales dans les premières 24 heures après l'injection d'adénovirus par voie intraveineuse (281, 282). Une fois l'infection stabilisée par la réponse innée, une réponse plus spécifique doit être générée pour enrayer complètement l'infection. Plusieurs groupes ont détecté des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques aux composantes structurales du vecteur et également au transgène (278, 283). La présence d'anticorps neutralisants contre l'adénovirus sauvage, présente chez une forte proportion des patients testés, est un problème d'autant plus grave dans le cas de thérapie génique. De plus, cette forte réponse humorale et à médiation cellulaire diminue grandement la période pendant laquelle le transgène est exprimé, période qui ne dépasse habituellement pas plus d'un mois ou deux.

Afin de prévenir l'élimination précoce du vecteur, plusieurs groupes se sont penchés sur le mode de clairance de ce dernier. D'après les résultats obtenus, il semble que la voie perforine/granzyme ne soit pas impliquée (284, 285), ce qui irait de pair avec d'autres études relatant d'une résistance à l'action de granules cytotoxiques des hépatocytes infectés par un adénovirus recombinant ou le CMV (286, 287). L'élimination de l'adénovirus se ferait plutôt via l'interaction de Fas/FasL et du récepteur du TNF α , le TNFR1, alors que le TNFR2 ne semble pas directement impliqué (270, 284, 285).

1.7 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

En se basant sur les résultats obtenus sur notre plus récent modèle de xénoimmunisation, nous avons voulu approfondir davantage notre investigation sur l'implication du mimétisme moléculaire dans le déclenchement de l'HAI. Pour ce faire, nous avons choisi d'utiliser un vecteur adénoviral dans lequel nous avons insérer les autoantigènes hépatiques humains impliqués dans la pathogénèse de l'HAI, soit CYP2D6 et FTCD.

1.7.1 Hypothèse

Une infection localisée au foie (injection par voie intraveineuse) aura pour conséquence la création d'un environnement inflammatoire (hépatite) et la libération des autoantigènes murins. Comme une hépatite virale peut moduler la réponse immunitaire par l'induction de la différenciation des cellules T CD4⁺ vers un phénotype Th2, l'injection IV ne devrait pas favoriser le développement d'une HAI. La vaccination IM contre les mêmes autoantigènes consécutive à l'injection IV d'adénovirus recombinants pourrait : 1) renverser la réponse en la transformant en Th1 ou 2) stimuler la réponse Th2 prédominante. Enfin, l'injection d'adénovirus recombinants par voie intramusculaire devrait induire une HAI, comme il a été observé par Lapierre *et al.* (224).

1.7.2 Objectif principal

Vérifier si une infection avec un adénovirus recombinant peut mener au déclenchement d'une HAI chez des souris C57Bl/6 de type sauvage, pour lesquelles une certaine prédisposition génétique à l'HAI a déjà été démontrée. Afin de vérifier notre hypothèse, plusieurs points devront être élucidés :

1.7.3 Objectifs secondaires

- 1) Étudier l'impact de différentes voies d'injection, intraveineuse (infection localisée au foie) ou intramusculaire (infection en périphérie), de l'adénovirus recombinant sur le maintien ou le bris de tolérance aux antigènes hépatiques murins.

- 2) Étudier la conséquence de la charge virale injectée et du fait même du niveau d'expression du transgène sur l'état d'activation des clones autoréactifs (réponses humorale et à médiation cellulaire)

- 3) Étudier l'influence des trois injections d'ADN IM (224) sur le développement d'une HAI lorsqu'elles sont précédées d'une injection par voie intraveineuse d'adénovirus recombinant.

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Vecteurs

Le vecteur pAdeno-X correspond au génome de l'adénovirus humain de type 5 mais possède une délétion des gènes E1 et E3 (Ad Δ E1 Δ E3) (BD Biosciences, CA USA) et conséquemment, les adénovirus qui seront produits à partir de ce vecteur seront défectifs pour la réplication.

2.1.2 Construction du vecteur Ad-CTLA-4-CYP2D6-FTCD

pRCMV-CTLA-4-2D6-FTCD a été digéré avec *Bam*H I, qui coupe de part et d'autre de l'ADNc, et avec *Eco*R V pour être en mesure de bien séparer la bande contenant l'ADNc désiré de celle du vecteur puisque les bandes obtenues de la digestion *Bam*H I seule aurait été de la même taille. Le fragment ainsi retiré a été transféré dans pBluescript II SK également coupé avec *Bam*H I. L'orientation de l'insert a été confirmée par digestion avec *Dra* III. L'ADNc a ensuite été retranché de pBluescript II SK-CTLA-4-2D6-FTCD par digestion avec les enzymes *Apa* I et *Not* I et introduit dans le vecteur pShuttle2 digéré avec les mêmes enzymes. Finalement, l'ADNc a été inséré dans le vecteur pAdeno-X par double digestion avec les enzymes I-*Ceu* I et PI-*Sce* (Figure 3). Finalement, une digestion avec l'enzyme *Pac* I permettait de linéariser le vecteur pAdeno-X-CTLA-4-2D6-FTCD avant de procéder à la transfection du vecteur et la propagation des adénovirus recombinants dans les cellules appropriées. Enfin, le vecteur Ad contrôle était fourni dans la trousse et a donc été digéré avec *Pac* I seulement afin de le linéariser pour la transfection.

Une portion du gène CTLA-4 a été clonée en aval de la région codant pour la protéine chimère (2D6-FTCD) afin de permettre la sécrétion de la chimère à l'extérieur de la cellule. En effet, la portion extracellulaire de CTLA-4 agit comme un signal sécrétoire et permet la liaison aux récepteurs B7-1 et B7-2. De plus, il a été montré préalablement que les réponses humorale et cellulaire étaient augmentées lorsque cette portion de CTLA-4 était couplée à une protéine de fusion (288, 289)

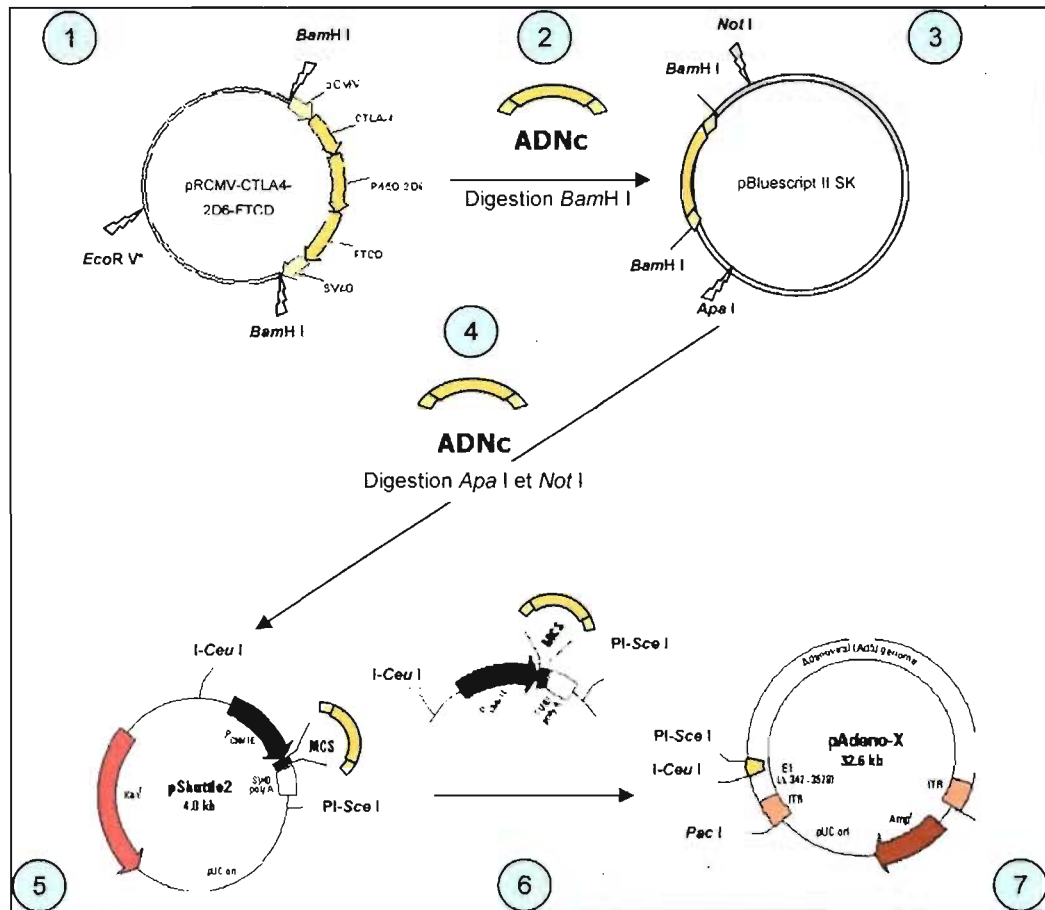


Figure 3 : Construction du vecteur Ad-CTLA-4-2D6-FTCD. 1) L'ADNc a été digéré avec *Bam*H I afin de l'exciser du vecteur pRCMV-CTLA-4-2D6-FTCD. 2) Transfert de l'ADNc dans le vecteur pBluescript II SK via le site *Bam*H I. 3) L'ADNc a ensuite été retiré du vecteur pBluescript II SK-CTLA-4-2D6-FTCD par une double digestion avec les enzymes *Apa*I et *Not*I. 4) Transfert de l'ADNc dans le vecteur pShuttle2 via les sites *Apa*I et *Not*I. 5) Digestion du vecteur pShuttle2-CTLA-4-2D6-FTCD à l'aide des enzymes *I-Ceu*I et *PI-Sce*I. 6) Transfert de l'ADNc dans le vecteur pAdeno-X via les sites *I-Ceu*I et *PI-Sce*I. 7) Linéarisation du vecteur pAdeno-X-CTLA-4-2D6-FTCD par digestion avec l'enzyme *Pac*I afin de rendre possible la transfection du vecteur et la propagation des adénovirus en culture cellulaire. * La digestion avec *Eco*R V a permis de différencier la bande d'ADN contenant l'ADNc sur gel puisque les deux bandes obtenues avec *Bam*H I auraient été de même taille sur gel.

2.2 Production des adénovirus recombinants

2.2.1 Types cellulaires utilisés

Trois types cellulaires ont été utilisés au cours de la production des adénovirus recombinants selon leurs caractéristiques propres. Ces cellules m'ont été gracieusement fournies par le Dr. Bernard Massie. Ces cellules sont sous brevets, alors les détails spécifiques sur leur transformation ne peuvent être décrits dans ce mémoire.

Tout d'abord, les BMAdeI sont des cellules A-549 (carcinome pulmonaire) qui éliminent la possibilité de générer des Ad compétents pour la réplication. Deux clones de cellules A-549 ont été développés, soit le clone 78-42 qui permet une réplication plus restreinte et le clone 220-8 qui est plus permissif. Finalement, les HEK293A (cellules de reins embryonnaires humaines 293A) ont été utilisées pour les dernières étapes de la production. Ces cellules expriment de façon permanente les produits du gène E1 et complètent donc en *trans* la réplication des virus. Bien que ces cellules favorisent davantage le développement de virus compétents pour la réplication, elles sont idéales pour la production de masse des adénovirus recombinants. De plus, comme les clones ont été préalablement sélectionnés dans les deux autres types cellulaires, les risques de multiplier un grand nombre d'adénovirus compétents pour la réplication sont grandement diminués.

2.2.2 Transfection

Polyéthylèneimine (PEI): 5×10^5 cellules HEK293A ont été ensemencées dans une plaque de 6 puits ($5 \times 10^5 / 10 \text{ cm}^2$) dans 3 ml de DMEM complet (Gibco, NY USA), 5 % sérum fœtal de veau (Gibco, NY, USA), 2 mM glutamine, pénicilline (50 µg/ml) (Gibco, NY USA) et streptomycine (50 µg/ml) (Gibco, NY USA). Afin de s'assurer que les cellules étaient en phase exponentielle, le milieu a été changé pour 1,8 ml de milieu frais trois heures avant la transfection. Trois µg d'ADN, un volume approprié de DMEM

sans sérum foetal de veau pour obtenir un volume final de 100 μ l et 3 μ g de polyéthylèneimine ont été mélangés dans l'ordre et incubés 10 minutes à température de la pièce. La solution d'ADN a été ajoutée goutte à goutte dans le milieu en couvrant le maximum de surface. Les cellules transfectées ont ensuite été incubées à 37°C 5 % CO₂ jusqu'à l'apparition d'effets cytopathiques. Les effets cytopathiques provoqués par une infection à l'adénovirus sont visibles en raison de l'arrondissement des cellules et lorsque l'infection est plus avancée, les cellules perdent leur capacité à adhérer au pétri et flottent dans le milieu de culture. **Récolte** : Les cellules infectées ont ensuite été récoltées et ont subi 3 cycles de gel/dégel dans un bain de glace sèche/éthanol.

2.2.3 Sélection d'un clone isolé

Afin de s'assurer d'une homogénéité des virus, il est important d'amplifier un seul clone. Un essai de plaque de lyse permet une telle isolation des clones sur une couche cellulaire recouverte d'agarose. Les cellules BMAde1 78-42 ont été utilisées pour limiter la génération d'Ad compétents pour la réplication dès les premières étapes puisque ceux-ci auraient avantage sur les autres. Pour ce faire, 5×10^5 cellules BMAde1 78-42/puits ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits la veille (5×10^5 cellules/10 cm²). Des dilutions sériées (allant de non dilué à 10⁻⁶) ont été préparées et 500 μ l de ces dilutions ont été appliqués sur les cellules une fois le milieu enlevé. Une incubation à 37°C 5 % CO₂ sur un agitateur pendant 4 heures est nécessaire pour une infection optimale. Une fois l'incubation terminée, la suspension virale a été enlevée et 3 ml d'agarose 1 % (*SeaPlaque Agarose*) dans du DMEM complet sont déposés sur les cellules infectées. Une nouvelle couche d'agarose était ajoutée au besoin pour alimenter les cellules. Dix à 14 jours plus tard, les plaques bien isolées ont été recueillies et resuspendues dans 1 ml de DMEM complet suivi de 3 cycles de gel/dégel dans un bain de glace sèche/éthanol. Pour s'assurer que les clones isolés contenaient bien le transgène, l'expression de chaque protéine a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (IB). Pour ce faire, les adénovirus recombinants ont été amplifiés comme suit : **Pré-IB #1**: 1×10^5

HEK293A/puits ont étéensemencées dans du DMEM complet dans une plaque de 24 puits la veille (1×10^5 cellules/2 cm²). Cinq cents µl du lysat cellulaire obtenu de la transfection (25 %) ont été utilisés pour l'infection pendant 4 heures à 37°C 5 % CO₂ sur un agitateur. Un ml de DMEM complet a été ajouté sur les cellules infectées, suivi d'une incubation de 48 heures ou jusqu'à l'apparition d'effets cytopathiques. **Récolte** : Les cellules infectées ont ensuite été récoltées et ont subi 3 cycles de gel/dégel dans un bain de glace sèche/éthanol. **IB #1**: Une deuxième amplification a été nécessaire mais cette fois sur un plus grand nombre de cellules. 5×10^5 HEK293A/puits ont étéensemencées dans du DMEM complet dans une plaque de 6 puits la veille ($5 \times 10^5/10$ cm²). Cinq cents µl du lysat cellulaire obtenu de l'infection Pré-IB (33 %) ont été utilisés pour l'infection pendant 4 heures à 37°C 5 % CO₂ sur un agitateur. Deux ml de DMEM complet ont été ajoutés sur les cellules infectées, suivi d'une incubation de 48 heures. **Récolte** : Les cellules infectées ont ensuite été récoltées, centrifugées à 1000 g et resuspendues dans 200 µl de tampon de lyse (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % Glycérol, 2 % (poids/volume) dodécylsulfate de sodium (SDS), 0,05 % 2-mercaptoéthanol, 0,05 % Bleu de bromophénol). L'expression des protéines a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (Voir section 3.2.6). Une deuxième sélection a été faite en suivant le même protocole pour s'assurer de la pureté des clones sélectionnés avant de poursuivre vers les étapes d'amplification ultérieures.

2.2.4 Amplification

L'étape de l'amplification se fait graduellement en infectant une quantité croissante de cellules jusqu'à l'obtention d'un nombre suffisant de particules virales. Toutes les infections suivent le protocole mentionné ci-haut, à l'exception du nombre de cellules et du volume de la suspension virale utilisés.

Les étapes d'amplification 1 à 3 ont été faites sur des cellules BMAdE1 220-8 qui limitent la génération du nombre d'Ad compétents pour la réplication alors que l'amplification 4 a été faite sur des cellules HEK293A pour une production de masse

optimale. **Étape 1** : 1×10^5 BMAde1 200-8/puits ont étéensemencées dans une plaque de 24 puits (1×10^5 cellules/2 cm^2) et ont été infectées avec 300 μl de la suspension virale obtenue de la deuxième sélection par plaque (33 %) dans un volume final de 1 ml. **Étape 2** : 300 μl de la suspension virale précédente (33 %) ont été utilisés pour infecter 1×10^6 BMAde1 200-8 dans une plaque de 6 puits (1×10^6 cellules/10 cm^2). Une fois les cellules infectées, elles ont été recueillies dans un volume total de 4 ml. **Étape 3** : 3 pétris de 150 mm ont étéensemencés avec 1×10^7 BMAde1 200-8 (1×10^7 cellules/175 cm^2). Ces dernières ont été infectées avec 300 μl du lysat cellulaire de l'étape 2 (7,5 %). Lorsqu'il y avait suffisamment d'effets cytopathiques, c'est-à-dire lorsqu'environ 75 % des cellules avaient perdu leur capacité d'adhérence, les cellules des 3 pétris ont été regroupées, centrifugées à 1000 g et resuspendues dans 1/10 du volume, soit 7,5 ml de milieu complet. **Test d'infectivité** : Un test d'infectivité a été réalisé pour déterminer quelle quantité de virus par cellule était optimale pour l'infection. Pour ce faire, 1×10^6 HEK293A/puits ont étéensemencées dans une plaque de 6 puits (1×10^6 cellules/10 cm^2). Différents volumes de la suspension virale de l'étape 3 (0, 0,1, 5, 10 ou 25 μl) ont été utilisés pour l'infection. **Récolte** : Les cellules infectées ont ensuite été récoltées, centrifugées à 1000 g et resuspendues dans 200 μl de tampon de lyse. Les protéines ont été séparées sur gel polyacrylamide SDS-PAGE. Afin de vérifier les niveaux d'expression du transgène ainsi que le niveau d'expression maximale d'une protéine virale (l'hexon – 96 kDa) pour chacun des clones viraux, un immunobuvardage de type Western et une coloration au Bleu de Coomassie (Voir section 3.2.7) ont été réalisés pour chaque échantillon. **Étape 4** : Une fois la quantité de virus optimale pour l'infection déterminée, une quatrième étape d'amplification a été réalisée. Cette dernière consistait à ensemencer 50 pétris de 150 mm avec 1×10^7 HEK293A chacun (1×10^7 cellules/30 cm^2). Une quantité de virus prédéterminée par le test d'infectivité a été utilisée lors de l'infection pour chaque adénovirus recombinant produit. Les cellules ont été incubées jusqu'à CPE, récoltées, centrifugées à 1000 g et resuspendues dans un volume final de DMEM de 22 ml. Il est important de noter que pour chacune des étapes d'amplification,

les cellules ont subi trois cycles de gel/dégel dans un bain de glace sèche/éthanol avant de procéder à l'étape suivante.

2.2.5 Purification des particules virales

Préparation de la suspension virale : Les suspensions virales ont été centrifugées à 300 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et centrifugé de nouveau dans les mêmes conditions. **Gradient discontinu de CsCl :** Huit ml de chlorure de césium 1,4 M (CsCl 1,4 M, 10 mM Tris pH 7.9) ont été placés dans un tube de centrifugation ultra-clair Beckman de 25x89 mm. Six ml de CsCl 1,2 M (CsCl 1,2 M, 10 mM Tris pH 7.9) ont été délicatement ajoutés en prenant soin de ne pas mélanger les deux phases. Enfin, la suspension virale a été déposée toujours sans perturber le gradient. Les gradients ont été centrifugés à 100 000 g dans un rotor Beckman SW28 pendant 1h30 à 4 °C sans décélération. Deux bandes se forment dans ces conditions de gradient : celle du haut contient les particules défectives ou incomplètes tandis que celle du bas renferme les particules infectieuses. La bande inférieure, qui représente les particules fonctionnelles, a donc été récoltée dans un volume maximum de 5 ml en perçant le tube avec une seringue 20 G1. La bande virale a ensuite été diluée dans du Tris 10 mM pH 7.9 jusqu'à un volume final de 10 ml afin de réduire la concentration de CsCl. **Gradient continu de CsCl :** Douze ml de CsCl 1,4 M et 14 ml de CsCl 1,2 M ont été ajoutés dans un «gradient maker» et à l'aide d'une pompe péristaltique. Les gradients continus ont été générés dans les tubes de centrifugation. La suspension virale a été déposée avec grande précaution sur le gradient et le tout a été centrifugé à 100 000 g dans un rotor Beckman SW28 pendant 20 h à 4 °C sans décélération. La bande inférieure a été récoltée de la même manière mais dans un volume maximal de 2,5 ml. **Purification du virus sur colonne :** La colonne NAP-25 (Amersham Pharmacia Biosciences, Angleterre) contient un milieu de Séphadex G-25 qui permet de purifier les particules virales en enlevant le CsCl et la majeure partie du sel contenu dans l'échantillon. La colonne a été équilibrée avec 25 ml de tampon de congélation (20 mM Tris pH 8.0, 25 mM NaCl, 2,5 % glycérol).

Une fois le tampon complètement écoulé, la suspension virale a été ajoutée sur la colonne. L'élution a été faite avec 3,5 ml de tampon de congélation.

2.2.5 Titration des particules virales

Détermination du nombre de particules virales par densité optique (DO₂₆₀) :

Une dilution 1/20 des virus purifiés a été faite dans un tampon de lyse (0,1 % SDS, 10 mM Tris HCl pH 7.4, 1 mM EDTA) suivi d'une lecture de la DO à 260 nm. Le nombre de particules virales a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{DO}_{260} \times \text{dilution virale} \times 1,1 \times 10^{12} = \text{particules virales/ml}$$

Détermination du nombre d'unités formatrices de plaques : Un essai de plaque de lyse a été réalisé tel que décrit plus haut mais avec des dilutions virales réalisées à partir du stock de virus purifiés allant de 10^{-6} à 10^{-12} . Après 21 jours d'incubation, le titre viral a été déterminé à partir de la moyenne du décompte des plaques de lyse en considérant seulement les dilutions comprenant de 30 à 300 plaques.

2.2.6 Immunobuvardage de type Western

Séparation et transfert des protéines : Quinze μl de lysat cellulaire (équivalent à environ 75 000 cellules) de chaque échantillon ont été séparés par électrophorèse sur gel 10 % acrylamide/bis-acrylamide 37.5 :1 (Bio-Rad, PA USA) selon le protocole de Bio-Rad. Les protéines ont ensuite été transférées (25m M Tris-base pH 8.3, 1,92 M glycine, 20 % méthanol) sur membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé Canada). **Immunobuvardage :** Les membranes ont été bloquées dans du TBST (10 mM Tris-Base pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween20) avec 5 % (poids/volume) de lait en poudre pendant 2 heures avec agitation à la température de la pièce. Les membranes ont ensuite été incubées dans du TBST avec 1

% (poids/volume) de lait en poudre contenant le 1^{er} anticorps pendant 2 heures avec agitation à la température de la pièce. Pour la détection de **CTLA-4-CYP2D6-FTCD**, un sérum de lapin immunisé avec la protéine recombinante FTCD à une concentration de 1 : 10 000 a été utilisé. Ce sérum a été produit par notre laboratoire. Les membranes ont été lavées trois fois (5, 5 et 15 minutes) avec du TBST et incubées avec le 2^e anticorps, un anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort à une concentration de 1 : 10 000, développés chez la chèvre (Biosource, CA USA), pendant 1 heure avec agitation à la température de la pièce. Les membranes ont été lavées comme précédemment avec du TBST et incubées 1 minute avec la solution de révélation (*BM Chemiluminescent Blotting Substrate (POD)*; Roche Diagnostics GmbH, Allemagne) préparée selon le protocole du fabricant. Les membranes ont ensuite été exposées sur un film radiographique BiomaxMR (Kodak, NY USA).

2.2.7 Coloration de gel de polyacrylamide au Bleu de Coomassie

Séparation et transfert des protéines : Quinze μ l (équivalent à un lysat d'environ 75 000 cellules) de chaque échantillon ont été séparés par SDS-PAGE sur gel 10 % acrylamide/bis-acrylamide 37.5 : 1 (Bio-Rad, PA USA) selon le protocole de Bio-Rad. Les gels ont ensuite été incubés dans une solution de fixation (25 % isopropanol & 10 % acide acétique) pendant 15 minutes. Par la suite, ils ont été colorés dans une solution de Bleu de Coomassie 1 % (40 % méthanol & 10 % acide acétique) pendant 15 minutes, puis placés dans une solution de décoloration (10 % acide acétique) pour environ 1h et finalement séchés.

2.3 Modèle animal

2.3.1 Description des différents groupes de souris

Toutes les souris utilisées étaient des femelles C57BL/6 (Charles River Laboratories Inc., QC Canada) âgées entre 6 et 8 semaines. Les quatre groupes expérimentaux sont présentés dans le Tableau II.

Injection d'adénovirus recombinants par voie intraveineuse

Des souris C57BL/6 ont été injectées par la veine de la queue avec différentes charges virales selon les groupes. **Groupe A** : 1×10^9 UFP Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou simple dose (n = 16); **Groupe B** : 2×10^9 UFP Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou double dose (n = 7); **Groupe AB'** : 1×10^9 UFP d'Ad contrôle.

Injection d'adénovirus recombinants par voie intramusculaire

Groupe C : Des souris C57BL/6 ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur avec 1×10^9 UFP Ad-CTLA-4-2D6-FTCD (n = 7) et serviront de contrôles tout au long de l'étude puisque notre modèle animal précédent développait une HAI suite à trois vaccinations consécutives en périphérie, i.e. au niveau du muscle tibialis antérieur.

Injection d'adénovirus recombinants par voie intraveineuse suivie d'une vaccination à l'ADN

Groupe D : Les souris ont été injectées par voie intraveineuse avec 1×10^9 UFP Ad-CTLA-4-2D6-FTCD (n = 7) ou **Groupe contrôle D'** : Ad contrôle (n = 4) au « jour 0 ». Ensuite, 3 injections consécutives d'ADN dans le muscle tibialis antérieur (100 µg pRCMV-CTLA-4-2D6-FTCD + 100 µg pVR-IL-12) ont suivi, soit à la 2^e, 4^e et 6^e semaine.

Groupes contrôles : Les contrôles négatifs pour tous les groupes consistent à suivre le même protocole d'injection (dose et site d'injection) mais en injectant un Ad contrôle, c'est-à-dire qui n'exprime pas les autoantigènes.

Pour les groupes A (IV simple dose) et B (IV double dose), le **groupe contrôle AB'** consiste à l'injection par voie IV de 1×10^9 UFP d'Ad contrôle.

Pour le groupe D (Ad IV + ADN IM), le **groupe contrôle D'** consiste à l'injection par voie IV de 1×10^9 UFP d'Ad contrôle (Jour 0) suivi de 3 vaccinations d'ADN à 2 semaines d'intervalle (14^e, 28^e et 42^e jour).

GROUPES	ADÉNOVIRUS RECOMBINANTS				ADN Injection intramusculaire
	n	TYPE	DOSE (UFP)	VOIE D'INJECTION	
A	16	Ad-CTLA-4-2D6-FTCD	1×10^9	Intraveineuse	N/A
B	7	Ad-CTLA-4-2D6-FTCD	2×10^9	Intraveineuse	N/A
AB'	6	Ad contrôle	2×10^9	Intraveineuse	N/A
C	7	Ad-CTLA-4-2D6-FTCD	1×10^9	Intramusculaire	N/A
D	7	Ad-CTLA-4-2D6-FTCD	1×10^9	Intraveineuse	pRCMV-CTLA-4- 2D6-FTCD + pVR-IL-12
D'	4	Ad contrôle	1×10^9	Intraveineuse	pRCMV-CTLA-4- 2D6-FTCD + pVR-IL-12

Tableau II: Description des quatre groupes de souris à l'étude. Pour chacun des groupes, le type d'adénovirus, la dose reçue ainsi que la voie d'injection sont spécifiés.

N/A : non approprié; n : nombre; UFP : unités formatrices de plaques.

2.3.2 Mesure de l'activité des alanines aminotransférases sériques

Du sang a été prélevé à différents temps (9^e, 21^e, 28^e jour et à tous les 14 jours par la suite jusqu'au 8^e mois) et les niveaux de transaminases dans le sérum ont été mesurés à l'aide d'un appareil Beckman-Synchron CX9.

2.3.3 Dosage des anticorps par méthode ELISA

(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

La protéine de fusion CYP2D6-FTCD a été produite dans un système procaryote à partir du vecteur pMAL-cR1-CYP2D6-FTCD, purifiée et utilisée comme antigène.

2.3.3.1 Détermination du titre des anticorps totaux

Dans une plaque de 96 puits, 0,2 µg par puits de la protéine de fusion a été incubé dans du NaHCO₃ 0,1 M pH 8.6 pendant 16 h à 4°C. Afin d'empêcher des liaisons non spécifiques, une incubation de 2 h à 4 °C avec une solution de blocage de NaHCO₃ 0,1 M pH 8.6 avec BSA 5 mg/ml a été réalisée. Les plaques ont été lavées 6 fois avec du TBST puis incubées avec les sérums dilués dans du TBST avec BSA 5 mg/ml pendant 2h à la température de la pièce. Après 6 lavages avec du TBST, une incubation d'une heure avec un anticorps anti-Ig de souris développé chez la chèvre et couplé à la phosphatase alcaline (Biosource, Camarillo Ca USA) à une concentration de 1:500 dans du TBST avec BSA 5 mg/ml a été faite à la température de la pièce. Les plaques ont été lavées 6 fois avec du TBST puis incubées avec une solution de révélation (Na carbonate 0,05 M pH 9.8, MgCl₂ 0,001 M et *p*-nitrophénylphosphate 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St-Louis MO USA)) pendant 30 minutes. Les densités optiques ont été mesurées à 405 nm avec un lecteur de microplaques. Une DO était considérée positive lorsqu'elle excédait deux fois celle du contrôle négatif.

2.3.3.2 Dosage des classes isotypiques des immunoglobulines

Les mêmes étapes initiales d'application de protéines, de blocage et de lavages telles que décrites ci-haut ont été réalisées. Les sérums ont été incubés en duplicata dans 100 µl de TBST avec BSA 5 mg/ml à une dilution 1:100 pendant 2 h à la température de la pièce. Les puits ont été lavés 6 fois avec du TBST suivi d'une incubation avec un anticorps anti-isotype développé chez la chèvre (Sigma-Aldrich, St-Louis MO USA), soit anti-IgM, -IgG1, -IgG2a, ou -IgG2b, à une concentration de 1:1000 pendant 1h à la température de la pièce. Après 6 lavages au TBST, les plaques ont été incubées avec un anticorps anti-Ig de chèvre développé chez le lapin (Biosys, Compiègne, France) à une concentration de 1:3000 pendant 1 h à la température de la pièce. Enfin, les puits ont été lavés 6 fois et ont été révélés tel que décrit ci-haut.

2.3.4 Isolation des lymphocytes (hépatiques, spléniques et circulants)

Rate

La rate a été coupée à l'aide d'un scalpel, broyée avec le pilon d'une seringue, puis passée à travers une aiguille 26G 3/8 pour enlever les tissus fibreux. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 5 ml d'une solution de NH₄Cl à 4 °C pour lyser les globules rouges et incubées 10 minutes à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois dans du RPMI 1640 (Gibco BRL, MD USA), centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes, resuspendues dans 10 ml de RPMI complet (RPMI 1640, SFV 10 %, β-mercaptoéthanol, 5 % surnageant EL-4) et incubées à 37°C 5 % CO₂.

Circulants (Cellules mononucléaires du sang périphérique - PBMC)

Une ponction cardiaque (0,5-1,0 ml de sang) a été réalisée sous anesthésie générale au somnotol (120 mg/kg) par injection intra-péritonéale. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 5 ml d'une solution de NH₄Cl à 4°C pour lyser les globules rouges et incubées 10 minutes à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois dans du

RPMI 1640 (Gibco BRL, MD USA), centrifugées à 1000 g pendant 5 minutes puis resuspendues dans un volume total de 1 ml de RPMI complet.

Foie

Le foie a été coupé à l'aide d'un scalpel, broyé avec le pilon d'une seringue puis passé à travers un tamis de 100 μm (Fisher Scientific, Ottawa Canada) pour enlever les tissus fibreux. Les lymphocytes ont été séparés sur un gradient discontinu de Percoll, 40 % & 80 % (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé Canada) en centrifugeant pendant 20 minutes à 1500 g sans décélération. Les lymphocytes ont été récupérés et deux lavages dans du PBS ont été effectués par centrifugation à 1000 g. Finalement, la lyse des érythrocytes a été réalisée telle que mentionnée ci-haut et les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de RPMI complet.

2.3.5 Test de prolifération

Des cellules spléniques homologues irradiées à 4500 rads ont servi de cellules présentatrices d'antigènes (CPA). 1×10^4 CPA irradiées, 1×10^5 lymphocytes ainsi que 100 μg de protéine 2D6-FTCD purifiée/ 10^6 APC ont été ajoutés à chaque puits dans un volume final de 200 μl contenant du RPMI 1640 complet. Les cellules ont été incubées 2 jours à 37°C 5 % CO_2 . Vingt à vingt-quatre heures avant la récolte, 1 μCi de méthyl- ^3H] (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé Canada) a été ajouté à chaque puits. Les cellules ont été récoltées à l'aide d'un « *Cell harvester* ». Le « *Cell harvester* » procède à la lyse des cellules et récolte l'ADN de ces dernières sur un papier filtre. Une fois les papiers filtres asséchés, la méthionine radiomarquée incorporée dans l'ADN peut ensuite être détectée dans un lecteur de plaques *Beta Counter*.

2.3.6 Cytotoxicité

Chargement des cellules cibles : Des EL-4, une lignée de lymphoblastomes murins, ont été utilisés comme cellules présentatrices d'antigènes. Pour les souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, 100 μg de protéine 2D6-FTCD purifiée/ 10^6

EL-4/ml milieu ont été ajoutés dans le milieu des EL-4 18-24 h avant l'expérience pour l'apprêtement de la protéine. 1×10^4 cellules cibles ainsi que différents ratios de lymphocytes effecteurs ont été ajoutés à chaque puits dans un volume final de 200 μ l contenant du RPMI complet sans rouge de phénol. Tous les ratios ont été faits en triplicata pour les rates et en duplicata pour les foies. Les plaques ont été incubées 4 h à 37°C 5 % CO₂. Les plaques ont été centrifugées à 300 g 5 minutes, puis 50 μ l du surnageant ont été transférés dans une autre plaque. Cinquante μ l de substrat (Promega, Madison, USA) ont été ajoutés puis les plaques ont été incubées 30 minutes à la noirceur. Finalement, 50 μ l d'une solution d'arrêt (1M acide acétique) ont été ajoutés et la densité optique a été mesurée à 490 nm.

Le principe du test de toxicité est de mesurer indirectement la lyse des cellules cibles. Au cours de la lyse, il y a relâche de l'enzyme lactate déshydrogénase dans le milieu qui en présence de son substrat, du sel de tétrazolium, génère un produit de formazan qui est de couleur rouge. C'est donc en mesurant l'intensité de la coloration qu'il est possible de déduire la proportion de cellules lysées.

2.3.7 Histologie

À la fin de l'étude, soit au 8^e ou 9^e mois post-injection, le degré d'inflammation au niveau du foie a été évalué. Les scores histologiques ont été déterminés en double aveugle selon l'échelle d'Ishak par le Dr. Fernando Alvarez, hépatologue pédiatre au CHU Ste-Justine et contre-vérifier par Pascal Lapierre, assistant de recherche au laboratoire. Prière de se référer à la Figure 7 pour la description de l'échelle de pointage.

2.3.8 Analyses statistiques

Afin d'évaluer s'il y avait une différence statistiquement significative entre les groupes IV + ADN (la présente étude) et la vaccination ADN (modèle précédent, Lapierre *et al.*) au niveau des anticorps totaux, une analyse ANOVA (analyse bifactorielle), post-test Bonferroni a été réalisée. Toutes les autres analyses statistiques

ont été réalisées à partir du test ANOVA (analyse unifactorielle), post-test Tukey. Une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme une différence significative. Le logiciel Graphpad Prism 3.0.3 a été utilisé pour les analyses statistiques.

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

3.1 Confirmation de l'expression des transgènes

À la suite de la production des adénovirus recombinants, l'expression des transgènes a été vérifiée par immunobuvardage de type Western (Figure 4). Ceci permet de conclure que l'adénovirus recombinant est en mesure d'exprimer le transgène, soit la protéine chimère sécrétée CTLA-4-2D6-FTCD qui est d'environ 58 kDa. Comme contrôle positif, la portion cytosolique extraite à partir d'un foie murin a été utilisée puisqu'elle contient la protéine FTCD endogène (58 kDa) qui est reconnue par l'anticorps. Il faut noter que le poids moléculaire de la protéine chimère CTLA-4-2D6-FTCD est très semblable à celui de la protéine FTCD seule (58 kDa) étant donné que pour la construction de la chimère, seuls les fragments immunodominants des deux protéines ont été inclus (CYP2D6₆₇₂₋₁₃₇₇+FTCD₃₉₅₋₅₄₁) en aval du segment CTLA-4. La similitude des tailles n'est reliée qu'au hasard.

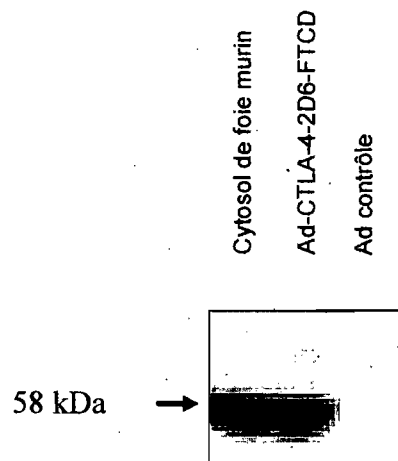


Figure 4: Confirmation de l'expression du transgène par immunobuvardage de type Western. 1×10^5 cellules ont été infectées par l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou par l'Ad contrôle. Les protéines contenues dans 30 μ l du milieu de culture renfermant la protéine chimère sécrétée ou l'Ad contrôle ont été séparés par électrophorèse sur un gel 10 %. La portion cytosolique d'un foie murin renfermant la FTCD endogène sert de contrôle positif de l'IB. Les protéines produites ont été détectées par IB avec un anticorps anti-FTCD développé chez le lapin.

Une fois l'expression du transgène confirmée, les adénovirus recombinants ont été produits en grande quantité et purifiés par double gradient de chlorure de césium. Le nombre de particules virales a été déterminé par densité optique et le nombre d'unités formatrices de plaques l'ont été par dilution limite. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau III. L'expression des transgènes a été confirmée de nouveau après la purification par immunobuvardage de type Western. Le volume d'injection de la préparation virale a été ajusté selon le nombre d'unités formatrices de plaques/ml obtenu par essai de plaques de lyse tel que décrit dans la section 2.2.5.

Adénovirus recombinants	Titre		
	DO ₂₆₀ Particules virales/ml	Unités formatrices de plaques/ml	Volume injecté
Ad-CTLA-4-2D6-FTCD	3,4 x10 ¹¹	4,0 x10 ¹⁰	25 µl: 1x10 ⁹ UFP
			50 µl: 2x10 ⁹ UFP
Ad contrôle	2,2 x10 ¹¹	6,4 x10 ¹⁰	16 µl: 1x10 ⁹ UFP
			32 µl: 2x10 ⁹ UFP

Tableau III : Quantification des adénovirus recombinants produits réalisée à partir du nombre de particules virales par ml et le nombre d'unités formatrices de plaques par ml. Le nombre de particules virales/ml a été calculé à l'aide de la mesure de la densité optique à 260 nm et de la formule suivante : $DO_{260} \times 1,1 \times 10^{12} \times \text{facteur de dilution}$. Le nombre d'unités formatrices de plaques/ml a été déterminé par titration par plages de lyse.

3.2 Protocole d'injections des différents vecteurs adénoviraux

Une fois l'expression du transgène confirmée, l'injection des adénovirus a pu être réalisée. En bref, pour tous les groupes, la première injection s'est faite sur des souris âgées entre 6 et 8 semaines et est identifiée comme « Jour 0 » dans les protocoles. Pour le groupe sous le protocole IV + ADN, les injections du plasmide codant pour la chimère sous forme sécrétée (pRCMV-CTLA-4-2D6-FTCD) ont été faites 2, 4 et 6 semaines après l'injection IV (Figure 5). Par la suite, des prélèvements sanguins ont été réalisés aux 2 semaines pendant les 3 premiers mois et mensuellement jusqu'au sacrifice (entre les 8^e et 9^e mois) afin de suivre l'évolution des transaminases hépatiques et de la réponse humorale.

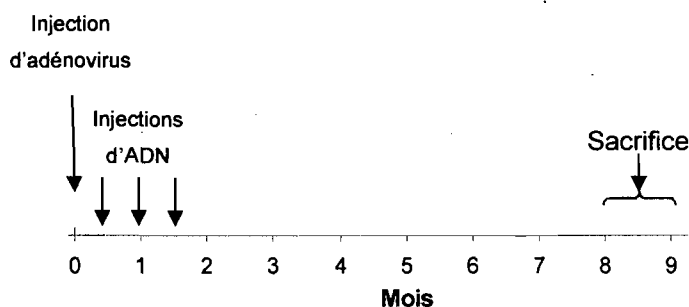


Figure 5: Protocole d'injections des différents vecteurs adénoviraux. L'injection d'adénovirus se faisait au jour 0 (IV simple dose et double dose, IM) suivie de trois injections d'ADN successives à la 2^e, 4^e et 6^e semaine (Ad + ADN). À la fin du protocole, entre le 8^e et le 9^e mois, les souris ont été sacrifiées. IV, intraveineux; IM, intramusculaire.

3.3 Évolution des niveaux de transaminases hépatiques

Afin de suivre l'évolution des dommages hépatiques, les niveaux d'ALT ont été mesurés à partir de l'injection d'adénovirus jusqu'à ce que les souris soient sacrifiées, c'est-à-dire entre le 8^e et 9^e mois suivant l'injection (Figure 6). Une hépatite initiale importante a été détectée pendant le premier mois chez les souris ayant reçu les adénovirus par voie intraveineuse (Ad-CTLA-4-2D6-FTCD et Ad contrôle), alors qu'une hépatite beaucoup plus légère a été détectée chez les groupes IM et IV + ADN. On remarque que l'injection de l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD double dose a engendré une hépatite aiguë avec des transaminases allant à des niveaux 10 fois plus élevés que la normale qui se situe autour de 30 UI/ml, alors que le groupe ayant reçu la simple dose se situe plutôt à des niveaux avoisinants en moyenne 3 fois la normale. Pour le reste de l'étude, les niveaux d'ALT semblent fluctuer autour du niveau considéré normal, mais semblent augmenter à compter du 7^e mois pour les groupes IM et Ad + ADN.

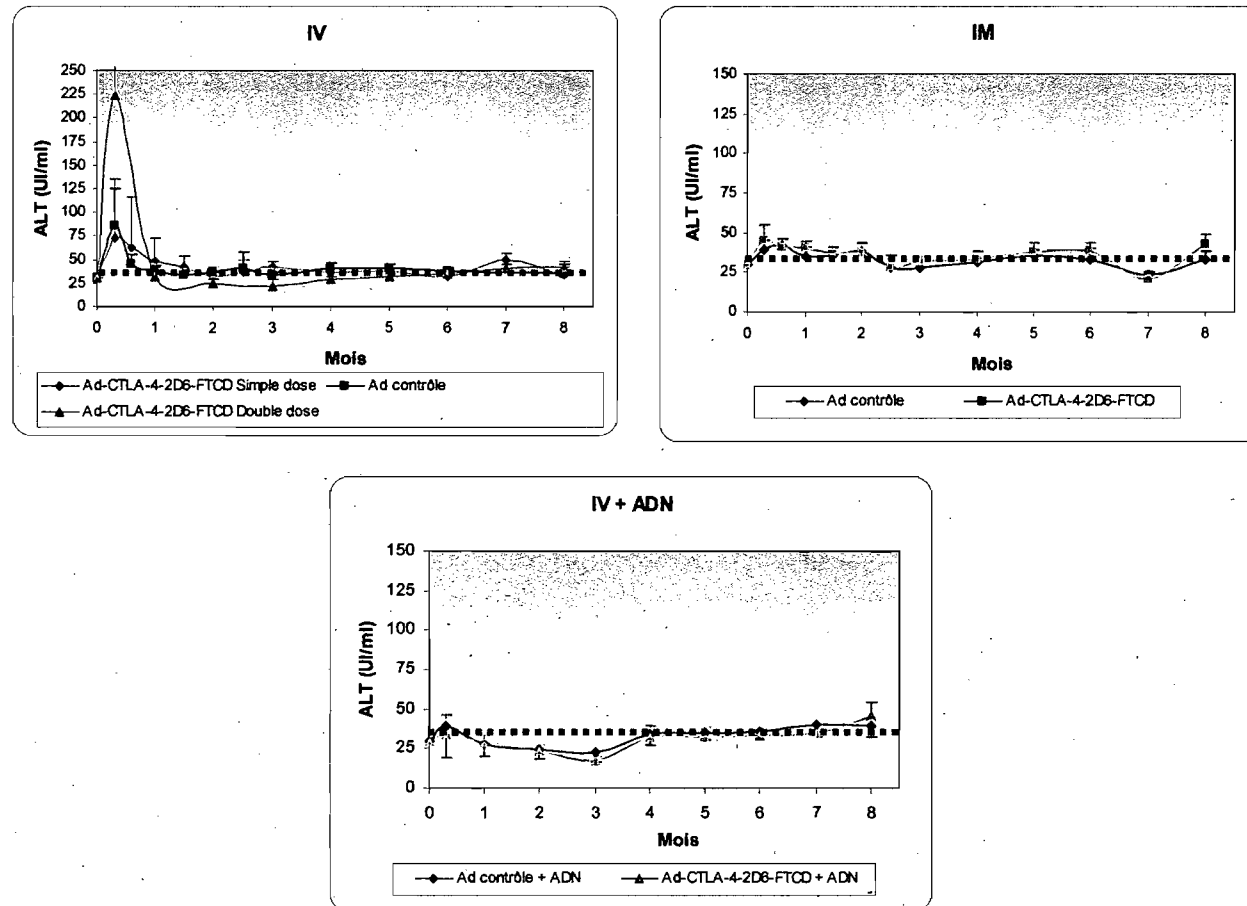


Figure 6 : Évolution des niveaux de transaminases hépatiques. Les souris injectées par voie intraveineuse (IV simple, n = 15 et IV double dose, n = 7) ont subi une hépatite transitoire qui s'est résorbée 1 mois après l'injection alors que les groupes injectés par voie intramusculaire (IM, n = 7) ou intraveineuse suivie par l'ADN (IV+ADN, n = 7) montrent une hépatite initiale beaucoup plus faible. Les niveaux normaux d'ALT sont illustrés par un trait pointillé de couleur mauve. ALT, alanine aminotransférases. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type.

3.4 Histologie du foie et évaluation du niveau d'inflammation hépatique

À la fin de l'étude, soit au 8^e ou 9^e mois post-injection, le degré d'inflammation au niveau du foie a été évalué par analyse histologique. Les scores histologiques ont été déterminés en double aveugle selon l'échelle d'Ishak (Figure 7) (203).

Des coupes montrant les différents types d'infiltrats inflammatoires observés sont présentées à la figure 8. Dans la majorité des coupes histologiques, la présence d'infiltrats de type portal

était prépondérante, bien que nous ayons également noté la présence d'infiltrations périportales (B) et intralobulaires (B). Dans certains cas, nous avons pu déceler la présence d'une hépatite d'interface (A). À titre de contrôle, une coupe d'un foie normal (souris non traitée) est présentée en (C). La zone encadrée représente une infiltration inflammatoire massive (B).

Paramètres	Pointage
A. Hépatite périportale ou d'interface	
Absente	0
Légère (focale, quelques zones portales)	1
Légère/modérée (focale, la plupart des zones portales)	2
Modérée (continue < 50% du tractus)	3
Sévère (continue > 50% du tractus)	4
B. Nécrose confluente	
Absente	0
Nécrose focale confluente	1
Nécrose Zone 3 dans certaines zones	2
Nécrose Zone 3 dans la plupart des zones	3
Nécrose Zone 3 + «bridgings» occasionnels portaux-centraux	4
Nécrose Zone 3 + multiples «bridgings» portaux-centraux	5
Nécrose panlobulaire ou multilobulaire	6
C. Nécrose focale («spotty»), apoptose et inflammation focale	
Absente	0
Un foyer ou moins par objective 10X	1
Deux à quatre foyers par objective 10X	2
Cinq à dix foyers par objectif 10X	3
Plus de dix foyers par objectif 10X	4
D. Inflammation portale	
Aucune	0
Légère, quelques zones portales	1
Modérée, quelques ou toutes les zones portales	2
Modérée/marquée, toutes les zones portales	3
Marquée, toutes les zones portales	4
Pointage maximal possible	18

Figure 7: Échelle de pointage Ishak. L'échelle de pointage Ishak permet d'évaluer les niveaux de nécroinflammation hépatique. Figure adaptée d'Ishak *et al.* J Hepatol 1995 (203).

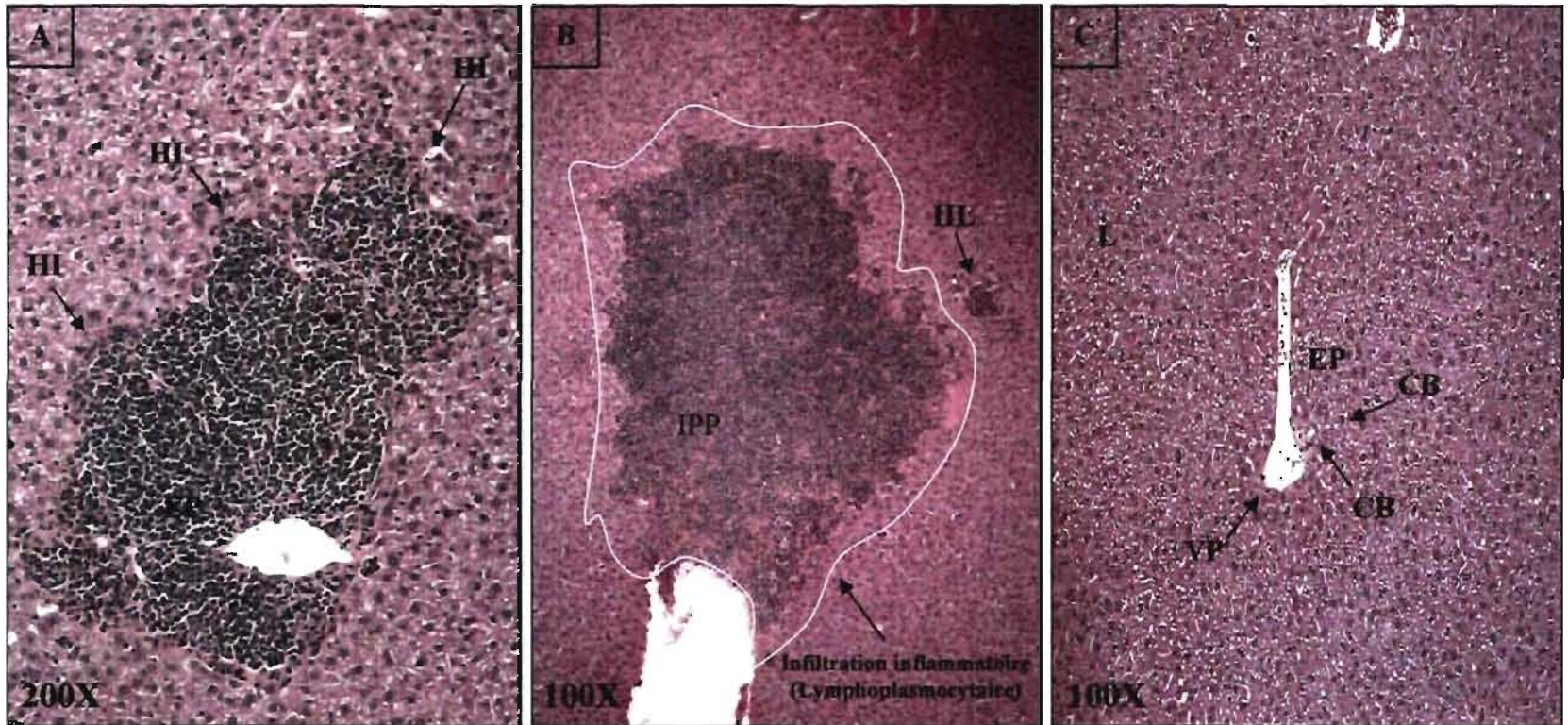


Figure 8 : Coupes histologiques de foie normal ou des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD. Coupes histologiques illustrant les différents types d'infiltrats lymphocytaires observés. A) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IM 1×10^9 UFP (200X); B) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IV 2×10^9 UFP, la région encerclée en blanc est un exemple d'infiltration lymphocytaire massive (100X) ; C) Foie normal (100X). HI, hépatite d'interface; EP, espace porte; IIL, infiltrat intralobulaire; L, lobule; VP, veine porte; CB, canal biliaire.

Des coupes représentatives pour chacun des groupes sont présentées à la Figure 9 pour illustrer quantitativement et qualitativement les infiltrats lymphoplasmocytaires. L'histologie des groupes de souris ayant reçu l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD par voie intraveineuse simple dose (A) et double dose (B), montre une infiltration massive de lymphocytes dans la zone portale et périportale. On retrouve même la présence d'une hépatite d'interface pour la souris ayant reçu une double dose, soit de 2×10^9 UFP d'adénovirus recombinants (B). Concernant le **Groupe D** (Ad IV + ADN), nous constatons que les souris ayant reçu l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD préalablement aux 3 injections d'ADN (D) ne présentent que très peu d'inflammation de l'espace porte, alors que le groupe ayant été injecté avec l'Ad contrôle + ADN (E) présente une infiltration portale beaucoup plus importante. Enfin, l'histologie du foie de souris injectée par voie intramusculaire (F) montre également un infiltrat considérable de la région portale et périportale. Enfin, aucune infiltration significative n'a été observée pour les souris injectées l'Ad contrôle (C).

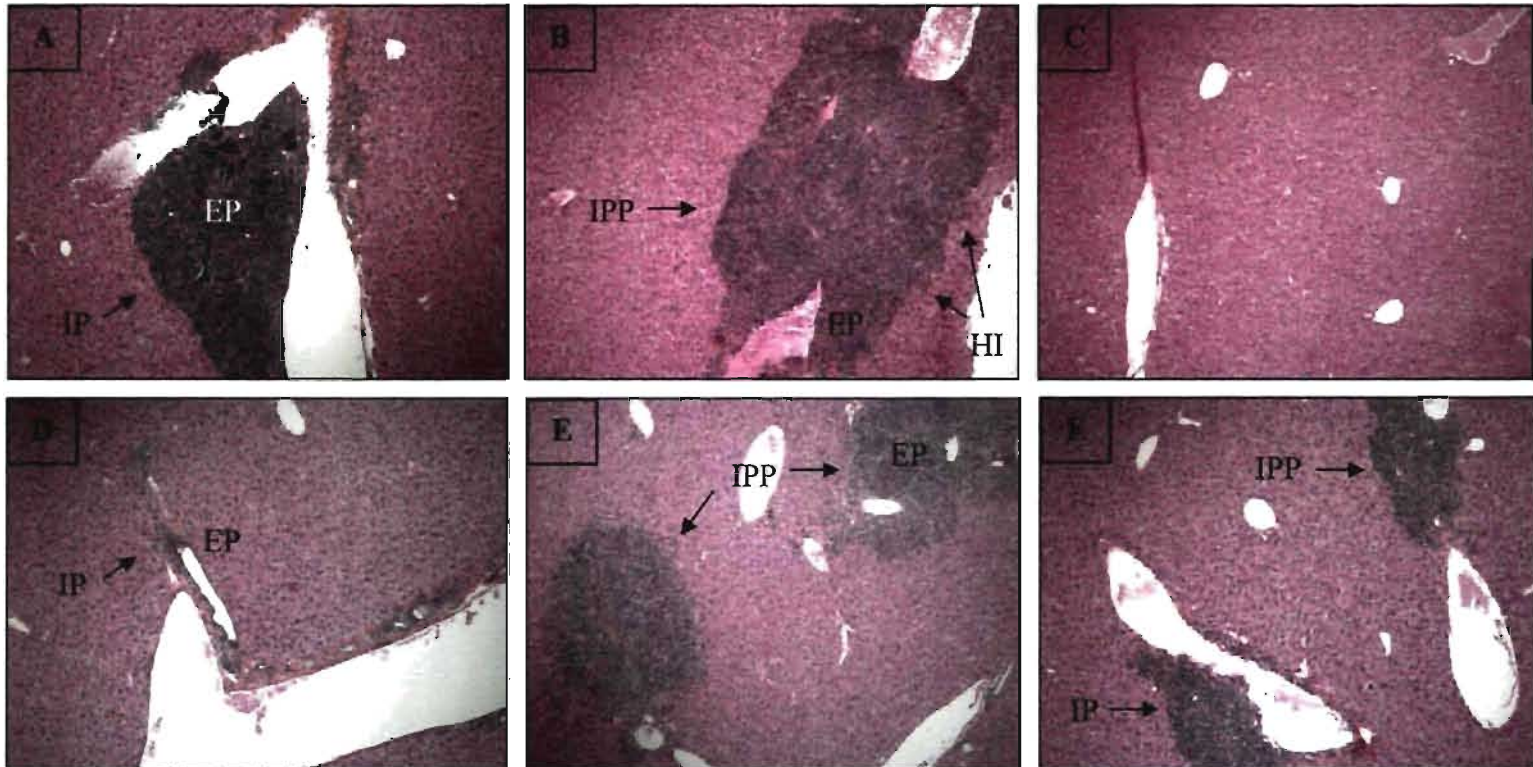


Figure 9 : Coupes histologiques du foie des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou l'Ad contrôle. Coupes histologiques représentatives pour chacun des groupes. A) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IV 1×10^9 UFP; B) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IV 2×10^9 UFP; C) Ad contrôle, 2×10^9 UFP; D) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IV 1×10^9 UFP+ ADN; E) Ad contrôle + ADN; F) Ad-CTLA-4-2D6-FTCD, IM 1×10^9 UFP (Objectif 100X). EP, espace porte; HI, hépatite d'interface; IP, infiltrat portal; IPP, infiltrat périportal.

Afin de mieux visualiser et comparer le degré d'inflammation des différents groupes, une quantification des niveaux d'inflammation sous forme d'histogramme a été réalisée selon l'échelle de pointage d'Ishak (Figure 7).

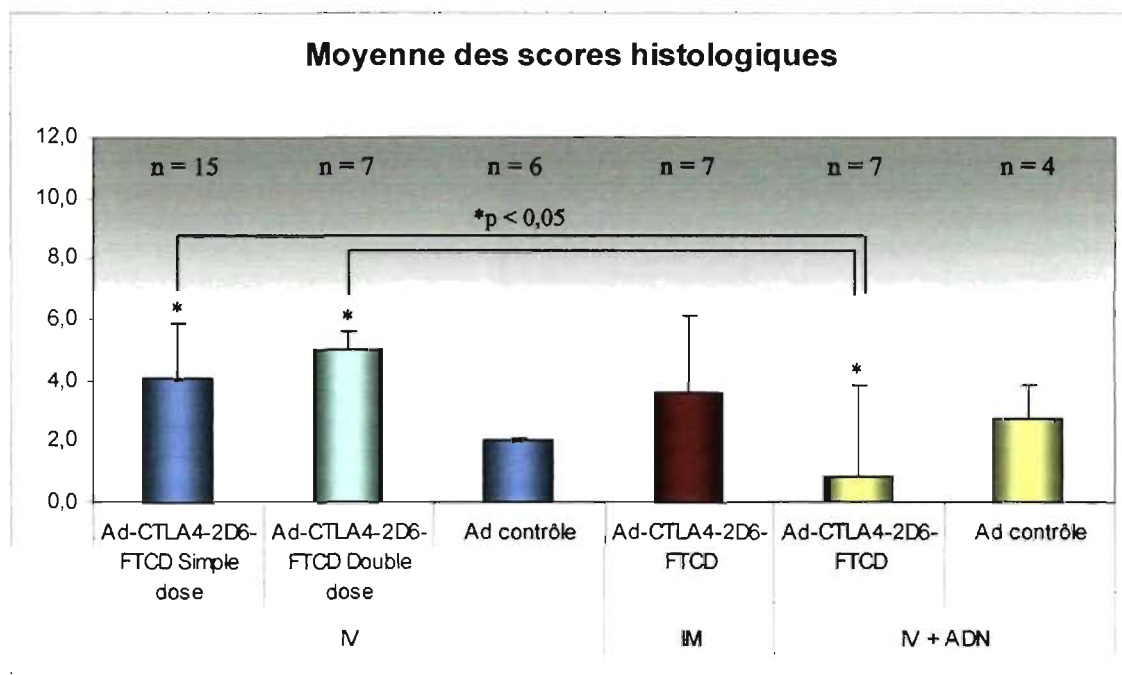


Figure 10: Quantification des niveaux d'inflammation des souris injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ou l'Ad contrôle. Les scores histologiques démontrent qu'au 8^e et 9^e mois (fin du protocole), l'injection avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD provoque une importante inflammation pour les groupes injectés par voie intraveineuse (IV simple dose et IV double dose) et par voie intramusculaire (IM). Par contre, l'administration de l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD suivi de l'ADN (IV + ADN) semble prévenir l'apparition d'inflammation ($p < 0,05$), alors que leur groupe contrôle présente un niveau d'inflammation beaucoup plus important. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type.

3.5 Étude de la réponse humorale contre la protéine chimère

Les titres d'anticorps totaux dirigés contre la protéine chimère ont été déterminés par ELISA (Figure 11). On peut voir que les injections d'adénovirus par voie intraveineuse

(simple et double dose) provoquent une forte réponse B au cours du premier mois suivant l'injection, alors que les titres tendent à diminuer graduellement à la fin de l'étude. Par contre, l'injection par voie intramusculaire engendre une réponse lente et progressive en maintenant des titres relativement élevés tout au long de l'étude. On remarque même une tendance à l'augmentation du titre à partir du 6^e mois suivant l'injection. Enfin, le groupe ayant reçu une dose d'adénovirus recombinants IV suivi de l'ADN provoque également un pic de la réponse initiale, réponse qui se maintient à des titres considérablement élevés jusqu'à la fin du protocole.

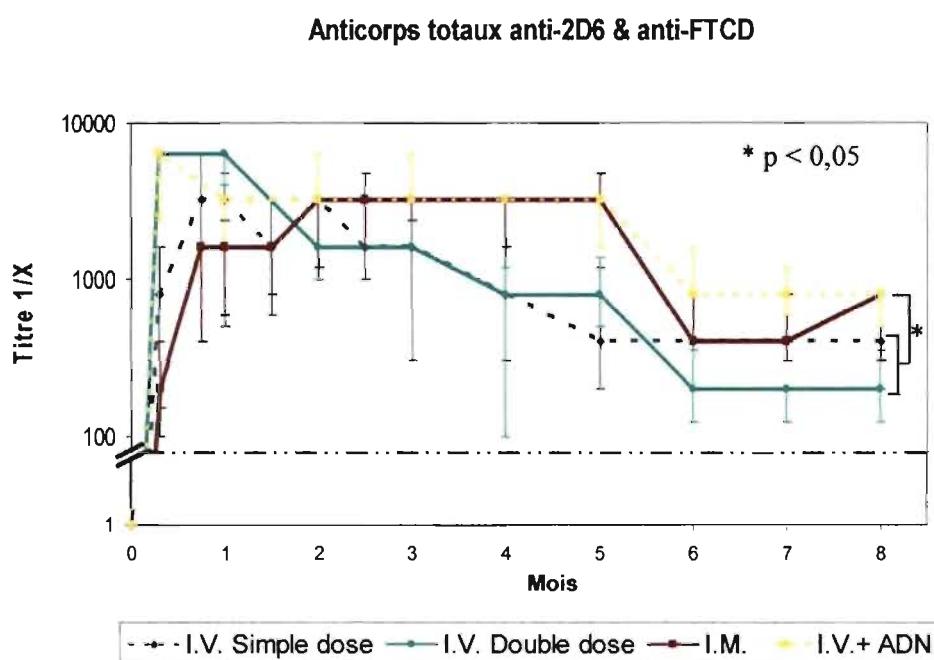


Figure 11 : Médiane des titres d'anticorps totaux dirigés contre la protéine chimère 2D6-FTCD pour les différents groupes. Une forte réponse B survient au cours du premier mois suivant l'injection pour les groupes injectés par voie intraveineuse (IV simple dose, n = 15 et IV double dose, n = 7). Pour les groupes IM (n = 7) et IV + ADN (n = 7), les titres d'anticorps augmentent de façon graduelle, mais conservent les titres les plus élevés au moment du sacrifice. Les niveaux d'autoanticorps du groupe IV + ADN diffèrent de façon significative des groupes IV (simple et double dose), p < 0,05. Les souris injectées avec l'Ad contrôle n'avaient aucun anticorps anti-2D6 et anti-FTCD. Les valeurs sont présentées sous forme de médiane ± intervalle interquartile.

3.6 Détermination du type de réponse engendrée par les différents sites d'injection

Afin d'évaluer la réponse engendrée par les différents sites d'injection des adénovirus recombinants, les isotypes d'immunoglobulines ont été déterminés par ELISA (Figure 12). L'isotype IgG2a nous indique une réponse de type Th1, alors qu'une majorité de l'isotype IgG1 démontre plutôt une réponse Th2.

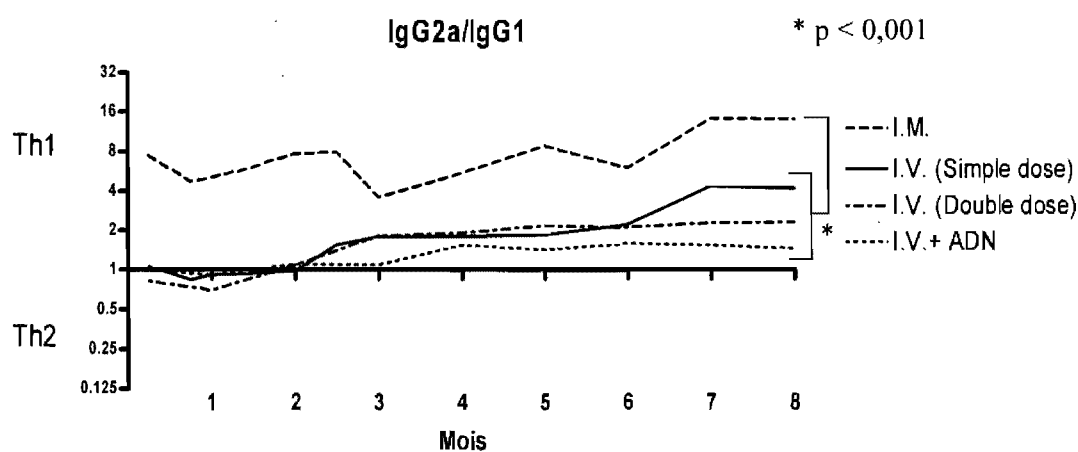


Figure 12 : Type de réponse immunitaire engendrée selon le site d'injection des adénovirus recombinants. Le type de réponse immunitaire Th1 ou Th2 a été déterminé selon les isotypes d'immunoglobulines détectés dans les sérums. Une réponse Th1 correspond à un rapport IgG2a /IgG1 > 1, alors qu'un rapport < 1 est associé à une réponse de type Th2. IV (simple dose) : 1×10^9 UFP, n = 15; IV (Double dose) : 2×10^9 UFP, n = 7; IM : 1×10^9 UFP, n = 7; IV + ADN : 1×10^9 UFP + ADN, n = 7.

L'injection par voie intramusculaire provoque d'emblée une réponse de type Th1 dès la première semaine après l'injection et ce, tout au long de l'étude. Les injections par voie intraveineuse (simple et double dose) sont faiblement Th2 au cours du premier mois, s'équilibrent pour ensuite se transformer progressivement en une réponse de type Th1 au 3^e

mois. Les souris ayant reçu l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD suivi de l'ADN développent une réponse initialement de type Th2 et qui devient de type Th1 plus tard au cours de l'étude. Cependant, la polarisation de la réponse vers un phénotype Th1 ou Th2 semble beaucoup moins définie.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'élaboration d'un modèle animal d'HAI est d'une importance capitale dans le but de mieux comprendre les mécanismes régissant le développement et la perpétuation de l'atteinte autoimmune perpétrée contre le foie. Bien que nous ayons déjà créé deux modèles animaux d'HAI dans notre laboratoire basés sur la vaccination à ADN, ces modèles ne nous permettaient pas d'évaluer l'impact de différentes voies d'injection (intraveineuse vs intramusculaire), la présence d'une hépatite dans l'évolution de l'HAI et également du niveau d'expression du transgène sur le bris ou le maintien de la tolérance face aux antigènes hépatiques. Dans les modèles précédents, nous avons démontré qu'il était possible de briser la tolérance face à un néoantigène (NP) ou à deux autoantigènes hépatiques (2D6-FTCD) sans atteinte préalable au foie. L'hypothèse de ces modèles se décrirait comme suit : à la suite des trois injections intramusculaires consécutives d'ADN codant pour le néoantigène ou les épitopes majeurs des deux autoantigènes impliqués dans l'HAI de type 2, il y aurait activation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques avoisinants le site d'injection, migration vers le foie et développement d'une atteinte hépatique. Plusieurs caractéristiques typiques d'une HAI ont été rapportées : élévation des transaminases, présence d'autoanticorps, de foyers d'inflammation portale, périportale et intralobulaire et, enfin, de CTL spécifiques.

Comme l'utilisation du vecteur à ADN ne nous permet pas de varier la localisation de protéines produites, il nous fallait recourir à un autre type de vecteur. En utilisant un vecteur viral, tel que l'adénovirus par exemple, il nous serait désormais possible de comparer l'expression de notre protéine d'intérêt directement dans le foie (injection par voie intraveineuse), par rapport à une expression en périphérie (injection par voie intramusculaire). Un autre aspect que nous allions pouvoir évaluer est le genre de réponse immune engendrée contre le transgène dans un contexte inflammatoire, ce dernier causé par la présence du vecteur viral. De cette manière, il nous serait possible d'évaluer l'influence d'un environnement pro-inflammatoire sur la tolérance hépatique. Également, en utilisant un vecteur viral, il est possible de contrôler plus efficacement la quantité de protéines produites en injectant différentes quantités de particules virales. En effet, on sait que la

charge virale injectée est directement proportionnelle au niveau d'expression du transgène (272).

4.1 L'adénovirus est un vecteur de choix pour la transduction de plusieurs types cellulaires et une expression significative du transgène

Le choix d'utiliser l'adénovirus recombinant comme vecteur d'expression par rapport à tout autre vecteur viral se base sur plusieurs caractéristiques avantageuses. Tout d'abord, le génome de l'adénovirus est énorme et puisque les gènes E1 et E3 ont été enlevés, la taille du gène que l'on peut incorporer sans nuire à l'encapsidation est considérable, pouvant dépasser de 5 % la taille du génome de type sauvage (264). De plus, d'un point de vue pratique, la production de masse d'un adénovirus est relativement simple et comme le vecteur est déficient pour la réplication en raison de l'ablation des gènes E1, les risques liés à son utilisation, telle qu'une infection du personnel animalier ou encore la propagation de l'infection à l'ensemble des souris de l'animalerie, sont grandement réduits. L'adénovirus recombinant a la capacité d'infecter un grand nombre de types cellulaires, différenciés ou non, et ne requiert donc pas, comme d'autres vecteurs viraux, la réplication active de la cellule pour une transduction efficace (290). Un autre avantage si on compare l'adénovirus avec d'autres vecteurs, c'est qu'il ne s'intègre pas dans le génome, contrairement aux vecteurs rétroviraux, limitant ainsi les risques d'introduire une mutation capable de modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes et donc d'altérer l'interprétation des résultats. Également, la transduction d'une cellule induit l'expression d'une grande quantité de la protéine d'intérêt (i.e. du transgène), comparativement à l'expression protéique d'un simple plasmide. Enfin, comme ce type de vecteur a été longuement étudié à la fois pour le développement de vaccin contre des maladies infectieuses et le cancer ou encore pour la thérapie génique, une quantité considérable d'études nous permettant de mieux comprendre les différents mécanismes engendrés sont disponibles.

4.2 La charge virale injectée est critique pour l'élaboration d'une réponse immunitaire robuste

Un autre fait important ayant été considéré est la dose du vecteur purifié qui allait servir à l'injection. Il a été démontré par le groupe de Krebs *et al.* que la dose injectée aux souris avait un impact important sur la réponse des lymphocytes T CD8⁺ et que l'intensité de la réponse immune était nullement proportionnelle à la dose de vecteur injectée (291). Ils ont démontré que lorsqu'ils injectaient l'adénovirus à faible dose, soit 2×10^7 UFP et ce peu importe la route d'injection, ils ne détectaient qu'une très faible expansion des CD8⁺. Le phénomène semblait également se répéter lorsque la dose injectée était beaucoup plus forte, c'est-à-dire une dose de 2×10^{10} UFP. Par contre, lorsqu'ils utilisaient une dose intermédiaire, se situant entre 2×10^8 et 2×10^9 UFP, ils obtenaient une prolifération significative des cellules T (291). Ces résultats suggèrent que dans le cas de la faible dose, la quantité de transgène produit n'est pas suffisante pour provoquer une réponse significative spécifique au transgène alors que la forte dose d'Ad induirait un phénotype d'épuisement (*exhaustion*) des CTL suivi d'une délétion des clones spécifiques en raison d'une trop forte expression du produit du transgène. Ceci viendrait corroborer les résultats obtenus dans le modèle de diabète autoimmun exprimant l'hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza sous le contrôle du promoteur de l'insuline (RIP - *Rat insulin promoter*), qui démontre qu'il existe une corrélation linéaire entre le niveau d'expression de l'antigène HA dans les nodules lymphatiques et le taux de prolifération et de délétion subséquente des clones T CD8⁺ spécifiques à l'HA (292). Somme toute, il semble que la dose optimale pour induire une réponse T considérable se situerait dans le petit intervalle compris entre 2×10^8 et 2×10^9 UFP.

L'injection par voie intraveineuse provoque le recrutement de plus de 90 % des particules au niveau du foie (268, 269, 281, 282). De ces particules, environ 90 % sont phagocytées par les cellules de Kupffer qui sont des macrophages résidents du foie qui parsèment les sinusoides et qui sont la première ligne de défense contre les infections provenant de la circulation (279). Quelques particules sont également retrouvées au niveau

des poumons et de la rate, où elles sont éliminées de la circulation sanguine (268, 293). L'incorporation des particules dans les cellules de Kupffer induit leur mort seulement quelques heures après l'injection (294, 295). Au moins deux études ont démontré une influence certaine des cellules de Kupffer sur les niveaux d'expression du transgène : 1) il a été démontré que lorsqu'on induisait la déplétion des cellules de Kupffer chimiquement, il y avait augmentation de l'expression du transgène (281, 296); 2) le groupe de Tao *et al.* a démontré que lorsqu'ils injectaient deux doses consécutives de vecteurs viraux (6×10^{10} particules virales suivies de 1 à 10×10^{10} particules virales), il y avait saturation du système réticuloendothélial et que conséquemment, l'expression du transgène était augmentée (293, 297). Par les deux approches, les auteurs ont pu déceler une augmentation significative de la transduction des hépatocytes.

4.3 L'adénovirus provoque une hépatite aiguë lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse

Après l'injection IV de l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD ainsi que de l'Ad contrôle, une augmentation des transaminases a été enregistrée avec un pic autour du 9^e jour après l'injection. Ce pic reflète les dommages faits aux hépatocytes qui sont causés par l'élaboration de la réponse à médiation cellulaire dirigée contre l'adénovirus recombinant et qui a été longuement rapportée par la littérature (270, 298). Les souris injectées par la simple dose (1×10^9 UFP) ont démontré des niveaux d'ALT trois fois supérieurs à la normale, alors que celles ayant reçu la double dose (2×10^9 UFP) ont atteint quant à elles des niveaux pouvant atteindre jusqu'à 10X la normale. Ceci corrobore les résultats publiés dans la littérature où l'on notait que les dommages hépatiques suite à une injection par voie intraveineuse étaient proportionnels à la charge virale (299). Environ 1 mois suivant l'injection, l'hépatite initiale s'est résorbée complètement dans tous les cas, démontrant qu'une forte réponse adaptative avait éliminé la plupart des hépatocytes « infectés » par les adénovirus recombinants. Enfin, bien que l'augmentation de la dose d'Ad ait produit une

hépatite plus importante, il ne semble pas y avoir de conséquences à long terme puisque les niveaux d'ALT au 8^e mois sont semblables.

Pour ce qui est du groupe de souris injectées à la fois avec l'adénovirus recombinant IV et l'ADN IM, nous n'avons noté en moyenne qu'une très faible hépatite initiale. En effet, nous croyons que ceci pourrait être relié à l'injection de l'adénovirus par la veine de la queue. En effet, si jamais la veine se fissurait au cours de l'injection, la majorité des particules diffuseraient dans les tissus avoisinants au lieu de se rendre directement au foie où elles causeraient une inflammation hépatique. Il serait peu probable que les injections d'ADN aient pu prévenir le développement d'une hépatite initiale puisque les injections d'ADN ont été faites deux semaines après l'injection de l'Ad IV et qu'à ce moment, l'hépatite commençait déjà à se résorber. Afin de vérifier que cette faible inflammation initiale ne modifie pas les résultats finaux de notre expérience (Ad IV + ADN IM), il serait souhaitable de la répéter en s'assurant qu'il y aura une augmentation des ALT après l'injection.

Concernant l'injection par voie intramusculaire, tel qu'attendu, une hépatite de faible intensité a été enregistrée. Lors de l'injection dans le muscle tibialis antérieur, les particules virales devraient demeurer dans le muscle ou encore devraient être recrutées dans les ganglions lymphatiques à proximité du site d'injection. Dans les deux cas, il est possible qu'une faible quantité du vecteur puisse avoir atteint la circulation et conséquemment le foie. Cependant, il semble que cette fraction d'adénovirus n'ait pas été suffisamment importante pour générer des dommages hépatiques significatifs. Par contre, la moyenne des ALT au 8^e mois montre une légère augmentation et semble se détacher du groupe contrôle, révélant la possibilité qu'il y ait développement d'une réaction autoimmune hépatique plus tardive.

4.4 Analyse de l'intensité de la réponse humorale en fin de protocole par rapport à la présence d'une hépatite initiale

Tous les groupes à l'étude ont démontré une très forte réponse humorale contre le transgène et ont maintenu un titre d'anticorps anti-LC1 et anti-LKM1 relativement élevé jusqu'au moment du sacrifice. Une forte réponse B a été détectée seulement quelques jours après l'injection pour les groupes IV simple et double dose. On note que l'intensité de la réponse humorale engendrée par l'adénovirus recombinant injecté par voie intraveineuse avait tendance à suivre la charge virale injectée. En confirmant ces résultats avec un plus grand nombre de souris, nous pourrions confirmer des études précédentes qui ont montré que la réponse humorale (anticorps neutralisants anti-adénovirus recombinant) était dépendante de la dose d'adénovirus recombinants (300, 301). De plus, le pic de la réponse apparaît retardé dans le cas de la plus petite charge virale démontrant un lien entre la quantité de transgène, le temps nécessaire pour l'activation des lymphocytes et de la magnitude de la réponse immune au moins pour ce qui est de la réponse B. Malgré une faible hépatite initiale pour les souris du groupe IV+ADN, on remarque que la réponse humorale est tout aussi importante que celle du groupe IV double dose. De plus, la quantité d'anticorps sériques semble maintenue à de très hauts niveaux par la vaccination ADN, avec une médiane de 1:3200, et ce jusqu'au 5^e mois suivant l'injection.

Quant à l'injection IM, nous remarquons que l'élaboration de la réponse B est beaucoup plus lente et progressive. Cependant, cette réponse est soutenue jusqu'au 5^e mois comme pour le groupe IV + ADN. De façon intéressante, il existe une grande similitude dans le patron de la réponse humorale pour les groupes IM et IV + ADN. En effet, contrairement aux injections IV simple ou double dose, la réponse est soutenue pendant plusieurs mois. Le titre d'anticorps totaux du groupe IV + ADN au 8^e mois du protocole d'injection est significativement plus élevé que celui des deux autres groupes (IV simple et double dose) ($p < 0,05$). Les titres d'anticorps totaux dirigés contre la chimère des groupes d'injection IV (1×10^9 UFP) diffèrent de façon significative de celui ayant reçu l'adénovirus

recombinant IV suivi de l'ADN IM immédiatement après l'injection ($p < 0,005$) et à la fin du protocole ($p < 0,05$). Une différence à considérer entre les injections IV et IM / IV+ADN est l'importance de l'hépatite initiale. À partir des résultats obtenus au cours de cette étude, il nous est seulement permis de montrer une tendance entre la présence d'une hépatite initiale et l'intensité de la réponse humorale en fin de protocole. Par contre, en reproduisant l'étude avec un plus grand nombre de souris, il nous serait possible de diviser les groupes en deux groupes selon la présence ou non d'une hépatite initiale. De cette façon, les groupes seraient beaucoup plus uniformes et il serait possible de réduire les écarts des résultats. De la même manière, dans le modèle précédent où nous avons utilisé la vaccination ADN pour induire une HAI, il y avait des souris qui répondaient à la vaccination (« *responder* ») alors que d'autres semblaient réfractaires au traitement (« *non-responder* »). De plus, nous remarquons également que l'intensité de l'hépatite initiale semble être inversement proportionnelle à celle de la réponse humorale à la fin du protocole, tel que démontré par le titre plus élevé pour le groupe simple dose comparativement au groupe ayant reçu une double dose. En confirmant ces résultats, il nous serait possible de vérifier que l'activation des lymphocytes dans le foie dans un environnement inflammatoire induirait progressivement la délétion des clones spécifiques aux transgènes.

4.5 Étude des niveaux d'inflammation hépatique et de la polarisation de la réponse immunitaire (Th1 / Th2)

Le foie est un organe capable d'induire une tolérance. Les mécanismes hépatiques responsables de l'induction d'une immunité versus ceux produisant un état de tolérance sont peu connus. Il a été montré dans plusieurs études portant sur les hépatites virales que l'orientation de la réponse était un facteur clé dans le contrôle de la réplication virale. Par exemple, une réponse de type Th1 favorise une réponse effectrice à médiation cellulaire. Ce type de réponse est observé dans plusieurs maladies autoimmunes (224, 302) et également dans les hépatites virales aiguës (303, 304). Par contre, dans les cas d'hépatites virales

chroniques, il semble que le développement d'une réponse Th2 soit favorisé, réponse qui est associée à l'induction d'un environnement anti-inflammatoire via la sécrétion de plusieurs cytokines, telles l'IL-4 et l'IL-10 (305). Cette réponse de type Th2 expliquerait en grande partie la persistance virale (306).

On sait déjà que dans un environnement pro-inflammatoire, l'expression du CMH II est induite chez les hépatocytes et que, conséquemment, ces derniers pouvaient interagir avec les lymphocytes T CD4⁺ (249, 307). De ce fait, le groupe de Wiegard *et al.* a récemment démontré que dans un contexte inflammatoire, les hépatocytes pouvaient agir comme cellules présentatrices d'antigènes et pouvaient induire et maintenir un phénotype Th2 chez des cellules T naïves (106). De plus, les hépatocytes ont la faculté d'altérer les capacités effectrices des lymphocytes T CD4⁺, déjà polarisés comme étant Th1, en provoquant une réduction de leur sécrétion d'IFN- γ (106). Deux observations peuvent expliquer cette incapacité des hépatocytes à activer efficacement les lymphocytes : 1) l'absence de l'expression du ligand « *Delta-like 4* » qui promeut un phénotype Th1 (308) et 2) le fait que les hépatocytes ne sont en mesure de ne fournir qu'un seul des deux signaux de co-stimulation nécessaires à une activation efficace (309).

Les résultats obtenus lorsque nous induisons une hépatite par l'injection d'un adénovirus par voie intraveineuse vont dans le même sens que ceux publiés par Wiegard *et al.* En effet, nous observons une réponse Th2 au cours des 6 à 8 premières semaines après l'injection pour les souris ayant reçu l'adénovirus recombinant IV (1×10^9 UFP ou 2×10^9 UFP) ou l'adénovirus recombinant IV suivi de l'ADN. Par contre, les souris injectées par voie intramusculaire démontrent dès le début une réponse Th1, réponse qui se maintient jusqu'à la fin du protocole. L'orientation Th1, immédiatement après l'injection, survient en raison de l'activation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques plutôt que dans le foie. De plus, le ratio Th1/Th2 du groupe de souris IM diffère de façon significative des trois autres pour l'ensemble de l'étude ($p < 0,001$). Par la suite, si nous regardons à plus long terme pour les groupes IV simple et double dose, il nous est possible d'observer que la réponse semble se réorienter de plus en plus vers un phénotype Th1 (IgG2a/IgG1 > 1). Ce

type de réponse à médiation cellulaire est similaire à celui observé lors du développement d'une atteinte autoimmune. Le groupe ayant reçu l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD IV et l'ADN IM montre une réponse avec une très légère tendance Th2 initiale suivie d'une réponse faiblement Th1. Les trois injections d'ADN IM ont eu lieu au cours de la période pendant laquelle les lymphocytes se trouvaient dans un état à prédominance Th2. Nous suggérons donc qu'une réexposition aux autoantigènes (exprimés par le plasmide) dans cette fenêtre Th2 aurait probablement renforcé le phénotype et favorisé le maintien d'une tolérance à long terme. De plus, il semble que cette tolérance soit spécifique à l'antigène puisque le groupe contrôle ayant reçu par voie intraveineuse l'Ad ne codant pas pour les autoantigènes (Ad contrôle) suivi de l'ADN par voie intramusculaire montre une inflammation chronique similaire à celle décrite précédemment (224). À l'opposé, le groupe Ad-CTLA-4-2D6-FTCD + ADN montre une inflammation beaucoup moins importante que les autres groupes (IV simple et double dose), telle que montré par son score histologique ($p < 0,05$).

L'histologie des foies de souris au sacrifice montre des niveaux d'inflammation relativement similaires pour les groupes de souris IV (simple et double dose) et IM qui présentent tous un phénotype Th1 à long terme. Il en est de même pour le groupe ayant reçu l'adénovirus contrôle IV suivi de l'ADN IM, alors que les souris ayant été injectées avec l'Ad-CTLA-4-2D6-FTCD IV suivi de l'ADN IM ne montrent qu'une inflammation minimale. Ceci nous amène à deux conclusions : 1) qu'une hépatite préalable n'est pas nécessaire pour le développement d'une réponse autoimmune contre le foie (tel que démontré par l'injection d'adénovirus recombinant IM) et 2) qu'un mimétisme moléculaire par un virus hépatotrope (ex. adénovirus recombinant IV) peut aussi mener au développement d'une réaction autoimmune contre le foie. Bref, avec ou sans hépatite initiale, une atteinte autoimmune peut se développer à long terme par mimétisme moléculaire suite à une xénoimmunisation.

Enfin, en ce qui a trait au type d'inflammation retrouvé chez les différents groupes, notons la présence massive d'inflammation dans la région portale et périportale. Également, nous avons pu observer dans les foies examinés plusieurs foyers d'inflammation intra-

lobulaires. Il est surprenant de constater que malgré la présence d'infiltrations lymphocytaires massives au niveau du foie pour la majorité des groupes d'étude, les niveaux d'ALT se situaient près de la normale, soit autour de 30 UI/ml. Ces observations sont difficilement explicables. En effet, dans les cas d'atteintes hépatiques, il existe une corrélation inégale entre l'importance des infiltrats hépatiques et les niveaux d'ALT sériques (310, 311). Ce phénomène est d'autant plus observé lorsque les infiltrations sont portales (majorité des infiltrats observés au cours de cette étude) comparativement à des infiltrats périportaux et intralobulaires. De plus, les niveaux critiques de lésions hépatiques nécessaires à la détection d'une augmentation des ALT demeurent inconnus.

Afin d'examiner si les lymphocytes infiltrant le foie avaient une spécificité pour les autoantigènes injectés, nous avons voulu vérifier l'aptitude de ces derniers à proliférer. Également, nous avons voulu vérifier la fonctionnalité des lymphocytes infiltrant le foie en évaluant leur potentiel cytotoxique. Cependant, en raison d'un nombre très limité de cellules pouvant être extraites du foie et également d'un nombre de souris insuffisant, il nous a été impossible de parvenir à des résultats concluants du moins pour l'évaluation de la capacité proliférative. Concernant l'activité cytotoxique, nous n'avons détecté aucune lyse des cellules cibles en présence des autoantigènes (résultats non présentés) et ce, même après une stimulation de 72 hrs avec de l'IL-2. D'après ces résultats préliminaires, nous supposons que, tel que proposé par Krebs *et al.*, les lymphocytes ayant une spécificité pour les autoantigènes seraient partiellement épuisés (*partially exhausted*), c'est-à-dire qu'ils seraient présents sans pouvoir exercer leur fonction effectrice. Une autre possibilité qui va dans le même sens serait que les inflammations que nous observons soient seulement dues à l'accumulation de lymphocytes sur le point de mourir. En effet, il a été souvent proposé que le foie agisse comme un « cimetière » pour les cellules activées lors de la contraction de la réponse immunitaire (81, 312). Si cette possibilité s'avérait vraie, les lymphocytes pourraient être activés en périphérie et, lorsqu'ils parviendraient au foie, ils entreraient en contact avec les hépatocytes, ce qui induirait un état d'anergie ou encore la mort par apoptose. Cependant, cette possibilité est réfutée par les modèles précédemment publiés, où

une activation périphérique des lymphocytes T n'entraîne pas l'apoptose ou l'anergie de ces cellules par le foie (107, 223, 224).

Bien que nous soyons parvenus à élucider quelques aspects de la réponse immunitaire à partir des divers groupes expérimentaux, plusieurs points importants restent à vérifier. Tout d'abord, il aurait été intéressant de déterminer le type de cytokines exprimées par les lymphocytes isolés du foie, à savoir s'ils possédaient un phénotype davantage Th1 ou Th2. De cette façon, il nous serait possible de valider les résultats obtenus à partir des ratios des isotypes d'immunoglobulines (IgG2a/IgG1) et par conséquent de confirmer les hypothèses émises quant à l'induction d'une immunité ou d'une tolérance dans le foie. Pour ce faire, nous aurions pu effectuer un essai ELISPOT (*Enzyme-linked immunospot*) qui permet de caractériser le type de cytokines produites par les lymphocytes infiltrant le foie. Un autre aspect intéressant serait de séparer les différentes populations de lymphocytes et répéter les expériences de prolifération et de cytotoxicité. Ainsi, nous pourrions réellement savoir quelle population est impliquée dans quel mécanisme. Par exemple, la présence de lymphocytes T régulateurs ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) pourrait inhiber la prolifération d'autres populations telles que les cellules T $CD4^+$ ou $CD8^+$. Un rôle des Treg a été montré au cours d'une étude portant sur le développement d'une tolérance par rapport à l'introduction d'un transgène au niveau du foie à l'aide de vecteurs associés aux adénovirus ou AAV (313). Enfin, l'utilisation d'autres combinaisons de vecteurs ADN et adénoviraux pourrait être investiguée. Récemment, le groupe de Park *et al.* a publié un article où il évaluait l'efficacité de différents protocoles à induire une forte réponse immune contre certaines protéines du VHC (314). Ils ont conclu que la meilleure combinaison pour provoquer une forte réponse $CD4^+$ Th1 tout en maintenant une bonne réponse CTL était l'injection d'ADN suivi d'un rappel avec un adénovirus recombinant, toutes deux par voie intramusculaire. Comme dans notre cas, l'injection de l'adénovirus recombinant seul par voie intramusculaire reproduit certaines caractéristiques d'une HAI (une forte réponse Th1, un niveau d'autoanticorps significatif et soutenu, une bonne inflammation ainsi qu'une tendance à l'élévation des transaminases hépatiques au 8^e mois du protocole) il pourrait

s'avérer que ce protocole puisse accentuer ou accélérer l'apparition d'une manifestation autoimmune.

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

Ce modèle animal nous a permis de mieux connaître les mécanismes régissant la tolérance et l'immunité au niveau du foie. Nous avons montré que le site d'injection de l'adénovirus ainsi que la charge virale avaient une incidence sur l'intensité et le type de réponse immunitaire engendrée. Également, les niveaux d'inflammation hépatique initiaux pourraient être en relation avec l'amplitude de la réponse immune à long terme, du moins pour ce qui est de la réponse humorale, mais ceci a besoin d'être confirmé avec un plus grand nombre de souris. Par contre, la dose et le site d'expression du transgène ne semblent pas avoir d'impact à long terme sur d'autres aspects étudiés puisque les niveaux de transaminases hépatiques et d'inflammation variaient très peu d'un groupe à l'autre. Nous avons également montré qu'il était possible de prévenir le développement d'une HAI par une injection par voie intraveineuse d'un Ad-CTLS-4-2D6-FTCD préalablement aux injections d'ADN. De plus, il s'avère que la répression de la réponse immunitaire soit spécifique à l'antigène puisque la présence d'infiltrats inflammatoires importants a été observée avec l'injection de l'Ad contrôle par voie intraveineuse suivi de l'ADN par voie intramusculaire.

La poursuite de la recherche sur les différents mécanismes impliqués dans le développement et la perpétuation de manifestations autoimmunes au niveau du foie est essentielle. Pour parvenir à mieux comprendre ces éléments, l'élaboration d'un bon modèle animal est primordiale. L'étude de ce modèle permettra non seulement de mieux comprendre la maladie, mais également de développer et de tester de nouveaux traitements plus spécifiques et qui induisent le moins d'effets secondaires indésirables.

BIBLIOGRAPHIE

1. Reth, M. 1995. The B-cell antigen receptor complex and co-receptors. *Immunology today* 16:310-313.
2. Allison, J.P., and L.L. Lanier. 1987. Structure, function, and serology of the T-cell antigen receptor complex. *Annual review of immunology* 5:503-540.
3. Marrack P and J. Kappler. 1997. Positive selection of thymocytes bearing alpha beta T cell receptors. *Current opinion in immunology* 9:250-255.
4. Palmer, E. 2003. Negative selection-clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nature reviews* 3:383-391.
5. Sha, W.C., C.A. Nelson, R.D. Newberry, D.M. Kranz, J.H. Russell, and D.Y. Loh. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* 336:73-76.
6. Schonrich, G., U. Kalinke, F. Momburg, M. Malissen, A.M. Schmitt-Verhulst, B. Malissen, G.J. Hammerling, and B. Arnold. 1991. Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* 65:293-304.
7. Vasquez, N.J., J. Kaye, and S.M. Hedrick. 1992. In vivo and in vitro clonal deletion of double-positive thymocytes. *The Journal of experimental medicine* 175:1307-1316.
8. Kisielow, P., H. Bluthmann, U.D. Staerz, M. Steinmetz, and H. von Boehmer. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* 333:742-746.
9. Wang, F., C.Y. Huang, and O. Kanagawa. 1998. Rapid deletion of rearranged T cell antigen receptor (TCR) Valpha-Jalpha segment by secondary rearrangement in the thymus: role of continuous rearrangement of TCR alpha chain gene and positive selection in the T cell repertoire formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11834-11839.
10. McGargill, M.A., J.M. Derbinski, and K.A. Hogquist. 2000. Receptor editing in developing T cells. *Nature immunology* 1:336-341.
11. Parks, D.E., and W.O. Weigle. 1980. Current perspectives on the cellular mechanisms of immunologic tolerance. *Clinical and experimental immunology* 39:257-262.
12. Adelstein, S., H. Pritchard-Briscoe, T.A. Anderson, J. Crosbie, G. Gammon, R.H. Loblay, A. Basten, and C.C. Goodnow. 1991. Induction of self-tolerance in T cells but not B cells of transgenic mice expressing little self antigen. *Science (New York, N.Y)* 251:1223-1225.
13. Starr, T.K., S.C. Jameson, and K.A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annual review of immunology* 21:139-176.
14. Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an

- immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science (New York, N.Y)* 298:1395-1401.
15. Park, Y., Y. Moon, and H.Y. Chung. 2003. AIRE-1 (autoimmune regulator type 1) as a regulator of the thymic induction of negative selection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1005:431-435.
 16. Liston, A., S. Lesage, D.H. Gray, R.L. Boyd, and C.C. Goodnow. 2005. Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity. *Immunological reviews* 204:87-101.
 17. Greenwald, R.J., V.A. Boussiotis, R.B. Lersbach, A.K. Abbas, and A.H. Sharpe. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 14:145-155.
 18. Probst, H.C., K. McCoy, T. Okazaki, T. Honjo, and M. van den Broek. 2005. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nature immunology* 6:280-286.
 19. Buhlmann, J.E., T.M. Foy, A. Aruffo, K.M. Crassi, J.A. Ledbetter, W.R. Green, J.C. Xu, L.D. Shultz, D. Roopesian, R.A. Flavell, and et al. 1995. In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity* 2:645-653.
 20. Goodnow, C.C. 1996. Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2264-2271.
 21. Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. 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.
 22. Cheroutre, H. 2004. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annual review of immunology* 22:217-246.
 23. Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Hohenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology* 2:301-306.
 24. Fontenot, J.D., and A.Y. Rudensky. 2005. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology* 6:331-337.
 25. Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology* 6:345-352.
 26. Bach, J.F., A. Bendelac, M.B. Brenner, H. Cantor, G. De Libero, M. Kronenberg, L.L. Lanier, D.H. Raulet, M.J. Shlomchik, and M.G. von Herrath. 2004. The role of innate immunity in autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 200:1527-1531.
 27. Diamond, B. 2005. Autoimmunity. *Immunological reviews* 204:5-8.
 28. Mackay IR, R.F. 2001. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340-350.

29. Morahan, G., and L. Morel. 2002. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. *Current opinion in immunology* 14:803-811.
30. Vijaykrishnan, L., J.M. Slavik, Z. Illes, R.J. Greenwald, D. Rainbow, B. Greve, L.B. Peterson, D.A. Hafler, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, L.S. Wicker, and V.K. Kuchroo. 2004. An autoimmune disease-associated CTLA-4 splice variant lacking the B7 binding domain signals negatively in T cells. *Immunity* 20:563-575.
31. Brown, J.A., D.M. Dorfman, F.R. Ma, E.L. Sullivan, O. Munoz, C.R. Wood, E.A. Greenfield, and G.J. Freeman. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol* 170:1257-1266.
32. Kroner, A., M. Mehling, B. Hemmer, P. Rieckmann, K.V. Toyka, M. Maurer, and H. Wiendl. 2005. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 58:50-57.
33. Begovich, A.B., M. Chang, S.J. Caillier, D. Lew, J.J. Catanese, J. Wang, S.L. Hauser, and J.R. Oksenberg. 2007. The autoimmune disease-associated IL12B and IL23R polymorphisms in multiple sclerosis. *Human immunology* 68:934-937.
34. Graham, D.S., R.R. Graham, H. Manku, A.K. Wong, J.C. Whittaker, P.M. Gaffney, K.L. Moser, J.D. Rioux, D. Altshuler, T.W. Behrens, and T.J. Vyse. 2008. Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nature genetics* 40:83-89.
35. Miyamori, H., Y. Kato, K. Kobayashi, and N. Hattori. 1983. HLA antigens in Japanese patients with primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Digestion* 26:213-217.
36. Marcos, Y., H.A. Fainboim, M. Capucchio, J. Findor, J. Daruich, B. Reyes, M. Pando, G.C. Theiler, N. Mendez, M.L. Satz, and et al. 1994. Two-locus involvement in the association of human leukocyte antigen with the extrahepatic manifestations of autoimmune chronic active hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 19:1371-1374.
37. Bjorses, P., J. Aaltonen, N. Horelli-Kuitunen, M.L. Yaspo, and L. Peltonen. 1998. Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Human molecular genetics* 7:1547-1553.
38. Ahonen, P., S. Myllarniemi, I. Sipila, and J. Perheentupa. 1990. Clinical variation of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED) in a series of 68 patients. *The New England journal of medicine* 322:1829-1836.
39. Michele, T.M., J. Fleckenstein, A.R. Sgrignoli, and P.J. Thuluvath. 1994. Chronic active hepatitis in the type I polyglandular autoimmune syndrome. *Postgraduate medical journal* 70:128-131.
40. Clemente, M.G., P. Obermayer-Straub, A. Meloni, C.P. Strassburg, V. Arangino, R.H. Tukey, S. De Virgiliis, and M.P. Manns. 1997. Cytochrome P450 1A2 is a hepatic autoantigen in autoimmune polyglandular syndrome type I. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:1353-1361.

41. Gebre-Medhin, G., E.S. Husebye, J. Gustafsson, O. Winqvist, A. Goksoyr, F. Rorsman, and O. Kampe. 1997. Cytochrome P450IA2 and aromatic L-amino acid decarboxylase are hepatic autoantigens in autoimmune polyendocrine syndrome type I. *FEBS letters* 412:439-445.
42. Clemente, M.G., A. Meloni, P. Obermayer-Straub, F. Frau, M.P. Manns, and S. De Virgiliis. 1998. Two cytochromes P450 are major hepatocellular autoantigens in autoimmune polyglandular syndrome type I. *Gastroenterology* 114:324-328.
43. Rorsman, F., E.S. Husebye, O. Winqvist, E. Bjork, F.A. Karlsson, and O. Kampe. 1995. Aromatic-L-amino-acid decarboxylase, a pyridoxal phosphate-dependent enzyme, is a beta-cell autoantigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8626-8629.
44. Pitkanen, J., P. Vahamurto, K. Krohn, and P. Peterson. 2001. Subcellular localization of the autoimmune regulator protein. characterization of nuclear targeting and transcriptional activation domain. *The Journal of biological chemistry* 276:19597-19602.
45. Jolicoeur, C., D. Hanahan, and K.M. Smith. 1994. T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:6707-6711.
46. Liston, A., S. Lesage, J. Wilson, L. Peltonen, and C.C. Goodnow. 2003. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nature immunology* 4:350-354.
47. van der Vliet, H.J., and E.E. Nieuwenhuis. 2007. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clinical & developmental immunology* 2007:89017.
48. Teachey, D.T., C.S. Manno, K.M. Axsom, T. Andrews, J.K. Choi, B.H. Greenbaum, J.M. McMann, K.E. Sullivan, S.F. Travis, and S.A. Grupp. 2005. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood* 105:2443-2448.
49. Straus, S.E., E.S. Jaffe, J.M. Puck, J.K. Dale, K.B. Elkon, A. Rosen-Wolff, A.M. Peters, M.C. Sneller, C.W. Hallahan, J. Wang, R.E. Fischer, C.M. Jackson, A.Y. Lin, C. Baumler, E. Siegert, A. Marx, A.K. Vaishnav, T. Grodzicky, T.A. Fleisher, and M.J. Lenardo. 2001. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98:194-200.
50. Drappa, J., A.K. Vaishnav, K.E. Sullivan, J.L. Chu, and K.B. Elkon. 1996. Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. *The New England journal of medicine* 335:1643-1649.
51. Carter, L.B., J.L. Procter, J.K. Dale, S.E. Straus, and C.C. Cantilena. 2000. Description of serologic features in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Transfusion* 40:943-948.

52. Stroncek, D.F., L.B. Carter, J.L. Procter, J.K. Dale, and S.E. Straus. 2001. RBC autoantibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Transfusion* 41:18-23.
53. Kwon, S.W., J. Procter, J.K. Dale, S.E. Straus, and D.F. Stroncek. 2003. Neutrophil and platelet antibodies in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Vox sanguinis* 85:307-312.
54. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, and A. Fischer. 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell death and differentiation* 10:124-133.
55. Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, C. Hivroz, I.A. Roberts, K.M. Debatin, A. Fischer, and J.P. de Villartay. 1995. Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science (New York, N.Y)* 268:1347-1349.
56. Fisher, G.H., F.J. Rosenberg, S.E. Straus, J.K. Dale, L.A. Middleton, A.Y. Lin, W. Strober, M.J. Lenardo, and J.M. Puck. 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81:935-946.
57. Le Deist, F., J.F. Emile, F. Rieux-Laucat, M. Benkerrou, I. Roberts, N. Brousse, and A. Fischer. 1996. Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet* 348:719-723.
58. Alderson, M.R., T.W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K.A. Schooley, R.G. Goodwin, C.A. Smith, F. Ramsdell, and D.H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181:71-77.
59. Brunner, T., R.J. Mogil, D. LaFace, N.J. Yoo, A. Mahboubi, F. Echeverri, S.J. Martin, W.R. Force, D.H. Lynch, C.F. Ware, and et al. 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373:441-444.
60. Fas, S.C., B. Fritzsching, E. Suri-Payer, and P.H. Krammer. 2006. Death receptor signaling and its function in the immune system. *Current directions in autoimmunity* 9:1-17.
61. Grodzicky, T., and K.B. Elkon. 2002. Apoptosis: a case where too much or too little can lead to autoimmunity. *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 69:208-219.
62. Bona, G., S. Defranco, A. Chiocchetti, M. Indelicato, A. Biava, D. Difranco, I. Dianzani, U. Ramenghi, A. Corrias, G. Weber, V. De Sanctis, L. Iughetti, G. Radetti, and U. Dianzani. 2003. Defective function of Fas in T cells from paediatric patients with autoimmune thyroid diseases. *Clinical and experimental immunology* 133:430-437.
63. Austrup, F., D. Vestweber, E. Borges, M. Lohning, R. Brauer, U. Herz, H. Renz, R. Hallmann, A. Scheffold, A. Radbruch, and A. Hamann. 1997. P- and E-selectin

- mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature* 385:81-83.
64. Lohr, J., B. Knoechel, V. Nagabhushanam, and A.K. Abbas. 2005. T-cell tolerance and autoimmunity to systemic and tissue-restricted self-antigens. *Immunological reviews* 204:116-127.
 65. Ueda, H., J.M. Howson, L. Esposito, J. Heward, H. Snook, G. Chamberlain, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, A.N. Smith, G. Di Genova, M.H. Herr, I. Dahlman, F. Payne, D. Smyth, C. Lowe, R.C. Twells, S. Howlett, B. Healy, S. Nutland, H.E. Rance, V. Everett, L.J. Smink, A.C. Lam, H.J. Cordell, N.M. Walker, C. Bordin, J. Hulme, C. Motzo, F. Cucca, J.F. Hess, M.L. Metzker, J. Rogers, S. Gregory, A. Allahabadia, R. Nithiyanthan, E. Tuomilehto-Wolf, J. Tuomilehto, P. Bingley, K.M. Gillespie, D.E. Undlien, K.S. Ronningen, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, A.P. Maxwell, D.J. Carson, C.C. Patterson, J.A. Franklyn, D.G. Clayton, L.B. Peterson, L.S. Wicker, J.A. Todd, and S.C. Gough. 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature* 423:506-511.
 66. Knoechel, B., J. Lohr, S. Zhu, L. Wong, D. Hu, L. Ausubel, and A.K. Abbas. 2006. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol* 176:6473-6483.
 67. Chiodetti, L., S. Choi, D.L. Barber, and R.H. Schwartz. 2006. Adaptive tolerance and clonal anergy are distinct biochemical states. *J Immunol* 176:2279-2291.
 68. Barron, L., B. Knoechel, J. Lohr, and A.K. Abbas. 2008. Cutting edge: contributions of apoptosis and anergy to systemic T cell tolerance. *J Immunol* 180:2762-2766.
 69. Chen, T.C., S.P. Cobbold, P.J. Fairchild, and H. Waldmann. 2004. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol* 172:5900-5907.
 70. Yuki, N. 1999. Pathogenesis of Guillain-Barre and Miller Fisher syndromes subsequent to *Campylobacter jejuni* enteritis. *Japanese journal of infectious diseases* 52:99-105.
 71. Kukreja, A., and N.K. Maclaren. 2000. Current cases in which epitope mimicry is considered as a component cause of autoimmune disease: immune-mediated (type 1) diabetes. *Cell Mol Life Sci* 57:534-541.
 72. Manns, M.P., K.J. Griffin, K.F. Sullivan, and E.F. Johnson. 1991. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *The Journal of clinical investigation* 88:1370-1378.
 73. Lapierre, P., C. Johanet, and F. Alvarez. 2003. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *European journal of immunology* 33:1869-1878.
 74. Marceau, G., P. Lapierre, K. Beland, H. Soudeyins, and F. Alvarez. 2005. LKM1 autoantibodies in chronic hepatitis C infection: a case of molecular mimicry? *Hepatology (Baltimore, Md)* 42:675-682.

75. Wucherpfennig, K.W., and J.L. Strominger. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.
76. Horwitz, M.S., L.M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee, and N. Sarvetnick. 1998. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nature medicine* 4:781-785.
77. Bynoe, M.S., C.M. Grimaldi, and B. Diamond. 2000. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:2703-2708.
78. Arndt, P.A., R.M. Leger, and G. Garratty. 1999. Serology of antibodies to second- and third-generation cephalosporins associated with immune hemolytic anemia and/or positive direct antiglobulin tests. *Transfusion* 39:1239-1246.
79. Charles, P.J., R.J. Smeenk, J. De Jong, M. Feldmann, and R.N. Maini. 2000. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis and rheumatism* 43:2383-2390.
80. Wilson, S.B., S.C. Kent, K.T. Patton, T. Orban, R.A. Jackson, M. Exley, S. Porcelli, D.A. Schatz, M.A. Atkinson, S.P. Balk, J.L. Strominger, and D.A. Hafler. 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391:177-181.
81. Crispe, I.N., T. Dao, K. Klugewitz, W.Z. Mehal, and D.P. Metz. 2000. The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard, or killing field? *Immunological reviews* 174:47-62.
82. Ando, K., L.G. Guidotti, A. Cerny, T. Ishikawa, and F.V. Chisari. 1994. CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. *J Immunol* 153:482-488.
83. Racanelli, V., and B. Rehermann. 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43:S54-62.
84. Herkel, J., B. Jagemann, C. Wiegand, J.F. Lazaro, S. Lueth, S. Kanzler, M. Blessing, E. Schmitt, and A.W. Lohse. 2003. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 37:1079-1085.
85. MacDonald, H.R. 1995. NK1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells: new clues to their origin, specificity, and function. *The Journal of experimental medicine* 182:633-638.
86. Seki, S., T. Abo, T. Masuda, T. Ohteki, A. Kanno, K. Takeda, H. Rikiishi, H. Nagura, and K. Kumagai. 1990. Identification of activated T cell receptor gamma delta lymphocytes in the liver of tumor-bearing hosts. *The Journal of clinical investigation* 86:409-415.
87. Ohteki, T., T. Abo, S. Seki, T. Kobata, H. Yagita, K. Okumura, and K. Kumagai. 1991. Predominant appearance of gamma/delta T lymphocytes in the liver of mice after birth. *European journal of immunology* 21:1733-1740.

88. O'Garra, A., and N. Arai. 2000. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in cell biology* 10:542-550.
89. Glimcher, L.H., and K.M. Murphy. 2000. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes & development* 14:1693-1711.
90. Winnock, M., M. Garcia Barcina, B. Lukomska, S. Huet, J. Saric, C. Balabaud, and P. Bioulac-Sage. 1995. Human liver-associated lymphocytes: an overview. *Journal of gastroenterology and hepatology* 10 Suppl 1:S43-46.
91. Genel, F., F. Unal, F. Ozgenc, G. Aksu, S. Aydogdu, N. Kutukculer, and R.V. Yagci. 2003. Decreased ratio of CD4/CD8 lymphocytes might be predictive for successful interferon alpha and lamivudine combined therapy in childhood chronic hepatitis B infection: A preliminary study. *Journal of gastroenterology and hepatology* 18:645-650.
92. Cabrera, R., Z. Tu, Y. Xu, R.J. Firpi, H.R. Rosen, C. Liu, and D.R. Nelson. 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 40:1062-1071.
93. Wiegard, C., C. Frenzel, J. Herkel, K.J. Kallen, E. Schmitt, and A.W. Lohse. 2005. Murine liver antigen presenting cells control suppressor activity of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42:193-199.
94. Longhi, M.S., M.J. Hussain, R.R. Mitry, S.K. Arora, G. Mieli-Vergani, D. Vergani, and Y. Ma. 2006. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 176:4484-4491.
95. van der Vliet, H.J., B.M. von Blomberg, N. Nishi, M. Reijm, A.E. Voskuyl, A.A. van Bodegraven, C.H. Polman, T. Rustemeyer, P. Lips, A.J. van den Eertwegh, G. Giaccone, R.J. Scheper, and H.M. Pinedo. 2001. Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 100:144-148.
96. Moody, D.B., G.S. Besra, I.A. Wilson, and S.A. Porcelli. 1999. The molecular basis of CD1-mediated presentation of lipid antigens. *Immunological reviews* 172:285-296.
97. Trobonjaca, Z., A. Kroger, D. Stober, F. Leithauser, P. Moller, H. Hauser, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 2002. Activating immunity in the liver. II. IFN-beta attenuates NK cell-dependent liver injury triggered by liver NKT cell activation. *J Immunol* 168:3763-3770.
98. Schmiege, J., G. Yang, R.W. Franck, N. Van Rooijen, and M. Tsuji. 2005. Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:1127-1132.
99. Winau, F., G. Hegasy, R. Weiskirchen, S. Weber, C. Cassan, P.A. Sieling, R.L. Modlin, R.S. Liblau, A.M. Gressner, and S.H. Kaufmann. 2007. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 26:117-129.

100. Nanno, M., Y. Kanari, T. Naito, N. Inoue, T. Hisamatsu, H. Chinen, K. Sugimoto, Y. Shimomura, H. Yamagishi, T. Shiohara, S. Ueha, K. Matsushima, M. Suematsu, A. Mizoguchi, T. Hibi, A.K. Bhan, and H. Ishikawa. 2008. Exacerbating role of gammadelta T cells in chronic colitis of T-cell receptor alpha mutant mice. *Gastroenterology* 134:481-490.
101. Nastala, C.L., H.D. Edington, T.G. McKinney, H. Tahara, M.A. Nalesnik, M.J. Brunda, M.K. Gately, S.F. Wolf, R.D. Schreiber, W.J. Storkus, and et al. 1994. Recombinant IL-12 administration induces tumor regression in association with IFN-gamma production. *J Immunol* 153:1697-1706.
102. Middleton, D., M. Curran, and L. Maxwell. 2002. Natural killer cells and their receptors. *Transplant immunology* 10:147-164.
103. Ljunggren, H.G., and K. Karre. 1990. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11:237-244.
104. Cantor, H.M., and A.E. Dumont. 1967. Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system. *Nature* 215:744-745.
105. Steel, D.M., and A.S. Whitehead. 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology today* 15:81-88.
106. Wiegard, C., P. Wolint, C. Frenzel, U. Cheruti, E. Schmitt, A. Oxenius, A.W. Lohse, and J. Herkel. 2007. Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* 133:2010-2018.
107. Bowen, D.G., M. Zen, L. Holz, T. Davis, G.W. McCaughan, and P. Bertolino. 2004. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *The Journal of clinical investigation* 114:701-712.
108. Penna, A., M. Pilli, A. Zerbini, A. Orlandini, S. Mezzadri, L. Sacchelli, G. Missale, and C. Ferrari. 2007. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45:588-601.
109. Rehmann, B. 2007. Chronic infections with hepatotropic viruses: mechanisms of impairment of cellular immune responses. *Seminars in liver disease* 27:152-160.
110. Klugewitz, K., F. Blumenthal-Barby, A. Schrage, P.A. Knolle, A. Hamann, and I.N. Crispe. 2002. Immunomodulatory effects of the liver: deletion of activated CD4+ effector cells and suppression of IFN-gamma-producing cells after intravenous protein immunization. *J Immunol* 169:2407-2413.
111. Kim, W.R., K.D. Lindor, G.R. Locke, 3rd, T.M. Therneau, H.A. Homburger, K.P. Batts, B.P. Yawn, J.L. Petz, L.J. Melton, 3rd, and E.R. Dickson. 2000. Epidemiology and natural history of primary biliary cirrhosis in a US community. *Gastroenterology* 119:1631-1636.

112. Witt-Sullivan, H., J. Heathcote, K. Cauch, L. Blendis, C. Ghent, A. Katz, R. Milner, S.C. Pappas, J. Rankin, and I.R. Wanless. 1990. The demography of primary biliary cirrhosis in Ontario, Canada. *Hepatology (Baltimore, Md)* 12:98-105.
113. Villeneuve JP, F.D., Infante-Rivard C. 1991. Descriptive epidemiology of primary biliary cirrhosis in the province of Quebec. *Can J Gastroenterol* 5:174-178.
114. Kaplan, M.M. 1996. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine* 335:1570-1580.
115. Gershwin, M.E., I.R. Mackay, A. Sturgess, and R.L. Coppel. 1987. Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 138:3525-3531.
116. Gershwin, M.E., A.A. Ansari, I.R. Mackay, Y. Nakanuma, A. Nishio, M.J. Rowley, and R.L. Coppel. 2000. Primary biliary cirrhosis: an orchestrated immune response against epithelial cells. *Immunological reviews* 174:210-225.
117. Kita, H., S. Matsumura, X.S. He, A.A. Ansari, Z.X. Lian, J. Van de Water, R.L. Coppel, M.M. Kaplan, and M.E. Gershwin. 2002. Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *The Journal of clinical investigation* 109:1231-1240.
118. Shimoda, S., J. Van de Water, A. Ansari, M. Nakamura, H. Ishibashi, R.L. Coppel, J. Lake, E.B. Keefe, T.E. Roche, and M.E. Gershwin. 1998. Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *The Journal of clinical investigation* 102:1831-1840.
119. Selmi, C., D.L. Balkwill, P. Invernizzi, A.A. Ansari, R.L. Coppel, M. Podda, P.S. Leung, T.P. Kenny, J. Van De Water, M.H. Nantz, M.J. Kurth, and M.E. Gershwin. 2003. Patients with primary biliary cirrhosis react against a ubiquitous xenobiotic-metabolizing bacterium. *Hepatology (Baltimore, Md)* 38:1250-1257.
120. Long, S.A., C. Quan, J. Van de Water, M.H. Nantz, M.J. Kurth, D. Barsky, M.E. Colvin, K.S. Lam, R.L. Coppel, A. Ansari, and M.E. Gershwin. 2001. Immunoreactivity of organic mimeotopes of the E2 component of pyruvate dehydrogenase: connecting xenobiotics with primary biliary cirrhosis. *J Immunol* 167:2956-2963.
121. Leung, P.S., C. Quan, O. Park, J. Van de Water, M.J. Kurth, M.H. Nantz, A.A. Ansari, R.L. Coppel, K.S. Lam, and M.E. Gershwin. 2003. Immunization with a xenobiotic 6-bromohexanoate bovine serum albumin conjugate induces antimitochondrial antibodies. *J Immunol* 170:5326-5332.
122. Kaplan, M.M., and M.E. Gershwin. 2005. Primary biliary cirrhosis. *The New England journal of medicine* 353:1261-1273.
123. Ludwig, J. 1987. New concepts in biliary cirrhosis. *Seminars in liver disease* 7:293-301.
124. Nakanuma, Y. 1993. Necroinflammatory changes in hepatic lobules in primary biliary cirrhosis with less well-defined cholestatic changes. *Human pathology* 24:378-383.

125. Prince, M.I., A. Chetwynd, W.L. Craig, J.V. Metcalf, and O.F. James. 2004. Asymptomatic primary biliary cirrhosis: clinical features, prognosis, and symptom progression in a large population based cohort. *Gut* 53:865-870.
126. Lazaridis, K.N., and J.A. Talwalkar. 2007. Clinical epidemiology of primary biliary cirrhosis: incidence, prevalence, and impact of therapy. *Journal of clinical gastroenterology* 41:494-500.
127. Watt, F.E., O.F. James, and D.E. Jones. 2004. Patterns of autoimmunity in primary biliary cirrhosis patients and their families: a population-based cohort study. *Qjm* 97:397-406.
128. Lee, Y.M., and M.M. Kaplan. 2003. Efficacy of colchicine in patients with primary biliary cirrhosis poorly responsive to ursodiol and methotrexate. *The American journal of gastroenterology* 98:205-208.
129. Kaplan, M.M., R.A. DeLellis, and H.J. Wolfe. 1997. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Annals of internal medicine* 126:682-688.
130. Bonis, P.A., and M. Kaplan. 1999. Methotrexate improves biochemical tests in patients with primary biliary cirrhosis who respond incompletely to ursodiol. *Gastroenterology* 117:395-399.
131. Poupon, R.E., K.D. Lindor, K. Cauch-Dudek, E.R. Dickson, R. Poupon, and E.J. Heathcote. 1997. Combined analysis of randomized controlled trials of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 113:884-890.
132. Christensen, E., J. Crowe, D. Doniach, H. Popper, L. Ranek, J. Rodes, N. Tygstrup, and R. Williams. 1980. Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. *Gastroenterology* 78:236-246.
133. Dickson, E.R., P.M. Grambsch, T.R. Fleming, L.D. Fisher, and A. Langworthy. 1989. Prognosis in primary biliary cirrhosis: model for decision making. *Hepatology (Baltimore, Md)* 10:1-7.
134. Prince, M., A. Chetwynd, W. Newman, J.V. Metcalf, and O.F. James. 2002. Survival and symptom progression in a geographically based cohort of patients with primary biliary cirrhosis: follow-up for up to 28 years. *Gastroenterology* 123:1044-1051.
135. Locke, G.R., 3rd, T.M. Therneau, J. Ludwig, E.R. Dickson, and K.D. Lindor. 1996. Time course of histological progression in primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 23:52-56.
136. Corpechot, C., F. Carrat, A. Bahr, Y. Chretien, R.E. Poupon, and R. Poupon. 2005. The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 128:297-303.
137. Rigopoulou, E.I., E.T. Davies, A. Pares, K. Zachou, C. Liaskos, D.P. Bogdanos, J. Rodes, G.N. Dalekos, and D. Vergani. 2005. Prevalence and clinical significance of isotype specific antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Gut* 54:528-532.

138. Yang, W.H., J.H. Yu, A. Nakajima, D. Neuberger, K. Lindor, and D.B. Bloch. 2004. Do antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis patients identify increased risk for liver failure? *Clin Gastroenterol Hepatol* 2:1116-1122.
139. Rigopoulou, E.I., E.T. Davies, D.P. Bogdanos, C. Liaskos, M. Mytilinaïou, G.K. Koukoulis, G.N. Dalekos, and D. Vergani. 2007. Antimitochondrial antibodies of immunoglobulin G3 subclass are associated with a more severe disease course in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 27:1226-1231.
140. Van Norstrand, M.D., M. Malinchoc, K.D. Lindor, T.M. Therneau, M.E. Gershwin, P.S. Leung, E.R. Dickson, and H.A. Homburger. 1997. Quantitative measurement of autoantibodies to recombinant mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis: relationship of levels of autoantibodies to disease progression. *Hepatology (Baltimore, Md)* 25:6-11.
141. Nakamura, M., H. Kondo, T. Mori, A. Komori, M. Matsuyama, M. Ito, Y. Takii, M. Koyabu, T. Yokoyama, K. Migita, M. Daikoku, S. Abiru, H. Yatsushashi, E. Takezaki, N. Masaki, K. Sugi, K. Honda, H. Adachi, H. Nishi, Y. Watanabe, Y. Nakamura, M. Shimada, T. Komatsu, A. Saito, T. Saoshiro, H. Harada, T. Sodeyama, S. Hayashi, A. Masumoto, T. Sando, T. Yamamoto, H. Sakai, M. Kobayashi, T. Muro, M. Koga, Z. Shums, G.L. Norman, and H. Ishibashi. 2007. Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the progression of primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45:118-127.
142. Bogdanos, D.P., C. Liaskos, A. Pares, G. Norman, E.I. Rigopoulou, L. Caballeria, G.N. Dalekos, J. Rodes, and D. Vergani. 2007. Anti-gp210 antibody mirrors disease severity in primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 45:1583; author reply 1583-1584.
143. Invernizzi, P., P.M. Battezzati, A. Crosignani, F. Perego, F. Poli, A. Morabito, A.E. De Arias, M. Scalamogna, M. Zuin, and M. Podda. 2003. Peculiar HLA polymorphisms in Italian patients with primary biliary cirrhosis. *Journal of hepatology* 38:401-406.
144. Feldstein, A.E., J. Perrault, M. El-Youssif, K.D. Lindor, D.K. Freese, and P. Angulo. 2003. Primary sclerosing cholangitis in children: a long-term follow-up study. *Hepatology (Baltimore, Md)* 38:210-217.
145. Faubion, W.A., Jr., E.V. Loftus, W.J. Sandborn, D.K. Freese, and J. Perrault. 2001. Pediatric "PSC-IBD": a descriptive report of associated inflammatory bowel disease among pediatric patients with psc. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 33:296-300.
146. Faust, T.W. 2001. Recurrent primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis after transplantation. *Liver Transpl* 7:S99-108.
147. Alvarez, F. 2006. Autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis. *Clinics in liver disease* 10:89-107, vi.
148. Vacca, M., M. Krawczyk, M. Petruzzelli, R.C. Sasso, K.J. van Erpecum, G. Palasciano, G.P. van Berge-Henegouwen, A. Moschetta, and P. Portincasa. 2007.

- Current treatments of primary sclerosing cholangitis. *Current medicinal chemistry* 14:2081-2094.
149. Spurkland, A., S. Saarinen, K.M. Boberg, S. Mitchell, U. Broome, L. Caballeria, E. Ciusani, R. Chapman, G. Ercilla, O. Fausa, I. Knutsen, A. Pares, F. Rosina, O. Olerup, E. Thorsby, and E. Schrumpf. 1999. HLA class II haplotypes in primary sclerosing cholangitis patients from five European populations. *Tissue antigens* 53:459-469.
 150. Bjornsson, E., K.M. Boberg, S. Cullen, K. Fleming, O.P. Clausen, O. Fausa, E. Schrumpf, and R.W. Chapman. 2002. Patients with small duct primary sclerosing cholangitis have a favourable long term prognosis. *Gut* 51:731-735.
 151. Kelsall AR, S.A., Witts L.J. 1947. Subacute and chronic hepatitis. *Lancet* 2:195-198.
 152. Cowling, D.C., I.R. Mackay, and L.I. Taft. 1956. Lupoid hepatitis. *Lancet* 271:1323-1326.
 153. Johnson, P.J., and I.G. McFarlane. 1993. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology (Baltimore, Md)* 18:998-1005.
 154. Krawitt, E.L. 2006. Autoimmune hepatitis. *The New England journal of medicine* 354:54-66.
 155. Alvarez, F. 2001. Autoimmune hepatitis. In Liver disease in childhood. B.W. In: Suchy SR F, editor 429-441.
 156. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns. 2000. Autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 32:181-197.
 157. Maggiore, G., F. Veber, O. Bernard, M. Hadchouel, J.C. Homberg, F. Alvarez, P. Hadchouel, and D. Alagille. 1993. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 17:376-381.
 158. Gregorio, G.V., B. Portmann, F. Reid, P.T. Donaldson, D.G. Doherty, M. McCartney, A.P. Mowat, D. Vergani, and G. Mieli-Vergani. 1997. Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience. *Hepatology (Baltimore, Md)* 25:541-547.
 159. Manns, M.P., and A. Vogel. 2006. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. *Hepatology (Baltimore, Md)* 43:S132-144.
 160. Alvarez, F., P.A. Berg, F.B. Bianchi, L. Bianchi, A.K. Burroughs, E.L. Cancado, R.W. Chapman, W.G. Cooksley, A.J. Czaja, V.J. Desmet, P.T. Donaldson, A.L. Eddleston, L. Fainboim, J. Heathcote, J.C. Homberg, J.H. Hoofnagle, S. Kakumu, E.L. Krawitt, I.R. Mackay, R.N. MacSween, W.C. Maddrey, M.P. Manns, I.G. McFarlane, K.H. Meyer zum Buschenfelde, M. Zeniya, and et al. 1999. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 31:929-938.
 161. Lapierre, P., K. Beland, and F. Alvarez. 2007. Pathogenesis of autoimmune hepatitis: from break of tolerance to immune-mediated hepatocyte apoptosis. *Transl Res* 149:107-113.

162. Czaja, A.J., M. Nishioka, S.A. Morshed, and T. Hachiya. 1994. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 107:200-207.
163. Strassburg, C.P., B. Alex, F. Zindy, G. Gerken, B. Luttig, K.H. Meyer zum Buschenfelde, C. Brechot, and M.P. Manns. 1996. Identification of cyclin A as a molecular target of antinuclear antibodies (ANA) in hepatic and non-hepatic autoimmune diseases. *Journal of hepatology* 25:859-866.
164. Strassburg, C.P., and M.P. Manns. 2002. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis. *Seminars in liver disease* 22:339-352.
165. Manns, M.P., E.F. Johnson, K.J. Griffin, E.M. Tan, and K.F. Sullivan. 1989. Major antigen of liver kidney microsomal autoantibodies in idiopathic autoimmune hepatitis is cytochrome P450db1. *The Journal of clinical investigation* 83:1066-1072.
166. Gueguen, M., M. Meunier-Rotival, O. Bernard, and F. Alvarez. 1988. Anti-liver kidney microsome antibody recognizes a cytochrome P450 from the IID subfamily. *The Journal of experimental medicine* 168:801-806.
167. Lapierre, P., O. Hajoui, J.C. Homberg, and F. Alvarez. 1999. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 116:643-649.
168. Beaudet, R., and R.E. Mackenzie. 1976. Formiminotransferase cyclodeaminase from porcine liver. An octomeric enzyme containing bifunctional polypeptides. *Biochimica et biophysica acta* 453:151-161.
169. Gonzalez, F.J., R.C. Skoda, S. Kimura, M. Umeno, U.M. Zanger, D.W. Nebert, H.V. Gelboin, J.P. Hardwick, and U.A. Meyer. 1988. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 331:442-446.
170. Martini, E., N. Abuaf, F. Cavalli, V. Durand, C. Johanet, and J.C. Homberg. 1988. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology (Baltimore, Md)* 8:1662-1666.
171. Abuaf, N., C. Johanet, P. Chretien, E. Martini, E. Soulier, S. Laperche, and J.C. Homberg. 1992. Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 16:892-898.
172. Beland, K., P. Lapierre, G. Marceau, and F. Alvarez. 2004. Anti-LC1 autoantibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Journal of autoimmunity* 22:159-166.
173. Gelpi, C., E.J. Sontheimer, and J.L. Rodriguez-Sanchez. 1992. Autoantibodies against a serine tRNA-protein complex implicated in cotranslational selenocysteine insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9739-9743.
174. Wies, I., S. Brunner, J. Henninger, J. Herkel, S. Kanzler, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and A.W. Lohse. 2000. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet* 355:1510-1515.

175. Costa, M., J.L. Rodriguez-Sanchez, A.J. Czaja, and C. Gelpi. 2000. Isolation and characterization of cDNA encoding the antigenic protein of the human tRNP(Ser)Sec complex recognized by autoantibodies from patients with type-1 autoimmune hepatitis. *Clinical and experimental immunology* 121:364-374.
176. Hajoui, O., D. Debray, S. Martin, and F. Alvarez. 2000. Auto-antibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children with auto-immune hepatitis. *European journal of pediatrics* 159:310-313.
177. Yamamoto, A.M., D. Cresteil, O. Boniface, F.F. Clerc, and F. Alvarez. 1993. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-I antibodies (LKM1). *European journal of immunology* 23:1105-1111.
178. Klein, R., U.M. Zanger, T. Berg, U. Hopf, and P.A. Berg. 1999. Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clinical and experimental immunology* 118:290-297.
179. Vitozzi, S., P. Lapiere, I. Djilali-Saiah, and F. Alvarez. 2002. Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *Journal of immunological methods* 262:103-110.
180. Kerkar, N., K. Choudhuri, Y. Ma, A. Mahmoud, D.P. Bogdanos, L. Muratori, F. Bianchi, R. Williams, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2003. 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.
181. Ma, Y., M.G. Thomas, M. Okamoto, D.P. Bogdanos, S. Nagl, N. Kerkar, A.R. Lopes, L. Muratori, M. Lenzi, F.B. Bianchi, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2002. Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule. *J Immunol* 169:277-285.
182. Muratori, L., E. Sztul, P. Muratori, Y. Gao, A. Ripalti, C. Ponti, M. Lenzi, M.P. Landini, and F.B. Bianchi. 2001. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology (Baltimore, Md)* 34:494-501.
183. Muratori, L., M. Cataleta, P. Muratori, M. Lenzi, and F.B. Bianchi. 1998. Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 42:721-726.
184. McFarlane, I.G., J.E. Hegarty, C.G. McSorley, B.M. McFarlane, and R. Williams. 1984. Antibodies to liver-specific protein predict outcome of treatment withdrawal in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 2:954-956.
185. Treichel, U., T. Poralla, G. Hess, M. Manns, and K.H. Meyer zum Buschenfelde. 1990. Autoantibodies to human asialoglycoprotein receptor in autoimmune-type chronic hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 11:606-612.
186. Binyamin, L., R.K. Alpaugh, T.L. Hughes, C.T. Lutz, K.S. Campbell, and L.M. Weiner. 2008. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-

- dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol* 180:6392-6401.
187. Truedsson, L., A.A. Bengtsson, and G. Sturfelt. 2007. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 40:560-566.
 188. Alvarez F, Bernard O, Homberg JC, and G. Kreibich. 1985. Anti-Liver-kidney antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *The Journal of experimental medicine* 161:1231-1236.
 189. Trautwein C, Gerken G, Lohr H, Meyer Zum Buschenfelde K. H., and M. Manns. 1993. Lack of surface expression for the B-cell autoepitope of cytochrome P450IID6 evidenced by flow cytometry. *Z Gastroenterol* 31:225-230.
 190. Yamamoto AM, Mura C, De Lemos-Chiarandini C, Krishnamoorthy R, and F. Alvarez. 1993. Cytochrome P450IID6 recognized by LKM1 antibody is not exposed on the surface of hepatocytes. *Clinical and experimental immunology* 92:381-390.
 191. Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, and F. Bianchi. 2000. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 46:553-561.
 192. Hajoui, O., S. Martin, and F. Alvarez. 1998. Study of antigenic sites on the asialoglycoprotein receptor recognized by autoantibodies. *Clinical and experimental immunology* 113:339-345.
 193. Vergani, D., L. Wells, V.F. Larcher, B.A. Nasaruddin, E.T. Davies, G. Mieli-Vergani, and A.P. Mowat. 1985. Genetically determined low C4: a predisposing factor to autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet* 2:294-298.
 194. Lohr, H.F., J.F. Schlaak, A.W. Lohse, W.O. Bocher, M. Arenz, G. Gerken, and K.H. Meyer Zum Buschenfelde. 1996. Autoreactive CD4+ LKM-specific and anticolonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 24:1416-1421.
 195. Lohr, H., U. Treichel, T. Poralla, M. Manns, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and B. Fleischer. 1990. The human hepatic asialoglycoprotein receptor is a target antigen for liver-infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 12:1314-1320.
 196. Ma, Y., D.P. Bogdanos, M.J. Hussain, J. Underhill, S. Bansal, M.S. Longhi, P. Cheeseman, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2006. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 130:868-882.
 197. Longhi, M.S., M.J. Hussain, D.P. Bogdanos, A. Quaglia, G. Mieli-Vergani, Y. Ma, and D. Vergani. 2007. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology (Baltimore, Md)* 46:472-484.
 198. Lunel, F., N. Abuaf, L. Frangeul, P. Gripon, M. Perrin, Y. Le Coz, D. Valla, E. Borotto, A.M. Yamamoto, J.M. Hureau, and et al. 1992. Liver/kidney microsomal

- antibody type I and hepatitis C virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 16:630-636.
199. Kammer, A.R., S.H. van der Burg, B. Grabscheid, I.P. Hunziker, K.M. Kwappenberg, J. Reichen, C.J. Melief, and A. Cerny. 1999. Molecular mimicry of human cytochrome P450 by hepatitis C virus at the level of cytotoxic T cell recognition. *The Journal of experimental medicine* 190:169-176.
 200. Kuriki, J., H. Murakami, S. Kakumu, N. Sakamoto, T. Yokochi, I. Nakashima, and N. Kato. 1983. Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Gastroenterology* 84:596-603.
 201. Longhi, M.S., Y. Ma, R.R. Mitry, D.P. Bogdanos, M. Heneghan, P. Cheeseman, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 2005. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *Journal of autoimmunity* 25:63-71.
 202. Alvarez, F., M. Ciocca, C. Canero-Velasco, M. Ramonet, M.T. de Davila, M. Cuarterolo, T. Gonzalez, P. Jara-Vega, C. Camarena, P. Brochu, R. Drut, and E. Alvarez. 1999. Short-term cyclosporine induces a remission of autoimmune hepatitis in children. *Journal of hepatology* 30:222-227.
 203. Ishak, K., A. Baptista, L. Bianchi, F. Callea, J. De Groote, F. Gudat, H. Denk, V. Desmet, G. Korb, R.N. MacSween, and et al. 1995. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* 22:696-699.
 204. Janeway CA, T.P., Walport M, Shlomchik M. 2001. Immunobiology. Garland Publishing, New York, NY 10001-2299. 732 pp.
 205. Donaldson, P.T., D.G. Doherty, K.M. Hayllar, I.G. McFarlane, P.J. Johnson, and R. Williams. 1991. Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors. *Hepatology (Baltimore, Md)* 13:701-706.
 206. Czaja, A.J., H.A. Carpenter, P.J. Santrach, and S.B. Moore. 1993. Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 105:1502-1507.
 207. Seki, T., K. Kiyosawa, H. Inoko, and M. Ota. 1990. Association of autoimmune hepatitis with HLA-Bw54 and DR4 in Japanese patients. *Hepatology (Baltimore, Md)* 12:1300-1304.
 208. Seki, T., M. Ota, S. Furuta, H. Fukushima, T. Kondo, K. Hino, N. Mizuki, A. Ando, K. Tsuji, H. Inoko, and et al. 1992. HLA class II molecules and autoimmune hepatitis susceptibility in Japanese patients. *Gastroenterology* 103:1041-1047.
 209. Vazquez-Garcia, M.N., C. Alaez, A. Olivo, H. Debaz, E. Perez-Luque, A. Burguete, S. Cano, G. de la Rosa, N. Bautista, A. Hernandez, J. Bandera, L.F. Torres, D. Kershenovich, F. Alvarez, and C. Gorodezky. 1998. MHC class II sequences of susceptibility and protection in Mexicans with autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 28:985-990.

210. Czaja, A.J., M. Kruger, P.J. Santrach, S.B. Moore, and M.P. Manns. 1997. Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis. *The American journal of gastroenterology* 92:2197-2200.
211. Bittencourt, P.L., A.C. Goldberg, E.L. Cancado, G. Porta, A.A. Laudanna, and J. Kalil. 1998. Different HLA profiles confer susceptibility to autoimmune hepatitis type 1 and 2. *The American journal of gastroenterology* 93:1394-1395.
212. Bittencourt, P.L., A.C. Goldberg, E.L. Cancado, G. Porta, F.J. Carrilho, A.Q. Farias, S.A. Palacios, J.M. Chiarella, C.P. Abrantes-Lemos, V.L. Baggio, A.A. Laudanna, and J. Kalil. 1999. Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2. *The American journal of gastroenterology* 94:1906-1913.
213. Djilali-Saiah, I., A. Fakhfakh, H. Louafi, S. Caillat-Zucman, D. Debray, and F. Alvarez. 2006. HLA class II influences humoral autoimmunity in patients with type 2 autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 45:844-850.
214. Djilali-Saiah, I., R. Renous, S. Caillat-Zucman, D. Debray, and F. Alvarez. 2004. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *Journal of hepatology* 40:904-909.
215. Scully, L.J., C. Toze, D.P. Sengar, and R. Goldstein. 1993. Early-onset autoimmune hepatitis is associated with a C4A gene deletion. *Gastroenterology* 104:1478-1484.
216. Doherty, D.G., J.A. Underhill, P.T. Donaldson, K. Manabe, G. Mieli-Vergani, A.L. Eddleston, D. Vergani, A.G. Demaine, and R. Williams. 1994. Polymorphism in the human complement C4 genes and genetic susceptibility to autoimmune hepatitis. *Autoimmunity* 18:243-249.
217. Djilali-Saiah, I., P. Ouellette, S. Caillat-Zucman, D. Debray, J.I. Kohn, and F. Alvarez. 2001. CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis. *Human immunology* 62:1356-1362.
218. Bittencourt, P.L., S.A. Palacios, E.L. Cancado, G. Porta, F.J. Carrilho, A.A. Laudanna, J. Kalil, and A.C. Goldberg. 2003. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms do not confer susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2 in Brazil. *The American journal of gastroenterology* 98:1616-1620.
219. Vogel, A., H. Liermann, A. Harms, C.P. Strassburg, M.P. Manns, and P. Obermayer-Straub. 2001. Autoimmune regulator AIRE: evidence for genetic differences between autoimmune hepatitis and hepatitis as part of the autoimmune polyglandular syndrome type 1. *Hepatology (Baltimore, Md)* 33:1047-1052.
220. Lankisch, T.O., C.P. Strassburg, D. Debray, M.P. Manns, and E. Jacquemin. 2005. Detection of autoimmune regulator gene mutations in children with type 2 autoimmune hepatitis and extrahepatic immune-mediated diseases. *The Journal of pediatrics* 146:839-842.
221. Bogdanos, D.P., M. Lenzi, M. Okamoto, E.I. Rigopoulou, P. Muratori, Y. Ma, L. Muratori, D. Tsantoulas, G. Mieli-Vergani, F.B. Bianchi, and D. Vergani. 2004. Multiple viral/self immunological cross-reactivity in liver kidney microsomal antibody positive hepatitis C virus infected patients is associated with the

- possession of HLA B51. *International journal of immunopathology and pharmacology* 17:83-92.
222. Gueguen, M., A.M. Yamamoto, O. Bernard, and F. Alvarez. 1989. Anti-liver-kidney microsomal antibody type I recognizes human cytochrome P450 db1. *Biochemical and biophysical research communications* 159:542-547.
 223. Djilali-Saiah, I., P. Lapiere, S. Vitozzi, and F. Alvarez. 2002. DNA vaccination breaks tolerance for a neo-self antigen in liver: a transgenic murine model of autoimmune hepatitis. *J Immunol* 169:4889-4896.
 224. Lapiere, P., I. Djilali-Saiah, S. Vitozzi, and F. Alvarez. 2004. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology (Baltimore, Md)* 39:1066-1074.
 225. Ohashi, P.S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C.T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1991. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65:305-317.
 226. Oldstone, M.B., M. Nerenberg, P. Southern, J. Price, and H. Lewicki. 1991. Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response. *Cell* 65:319-331.
 227. Fujinami, R.S., and M.B. Oldstone. 1985. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science (New York, N.Y)* 230:1043-1045.
 228. Gough, A., S. Chapman, K. Wagstaff, P. Emery, and E. Elias. 1996. Minocycline induced autoimmune hepatitis and systemic lupus erythematosus-like syndrome. *BMJ (Clinical research ed)* 312:169-172.
 229. Herzog, D., O. Hajoui, P. Russo, and F. Alvarez. 1997. Study of immune reactivity of minocycline-induced chronic active hepatitis. *Digestive diseases and sciences* 42:1100-1103.
 230. Czaja, A.J., and H.A. Carpenter. 2004. Decreased fibrosis during corticosteroid therapy of autoimmune hepatitis. *Journal of hepatology* 40:646-652.
 231. Feld, J.J., H. Dinh, T. Arenovich, V.A. Marcus, I.R. Wanless, and E.J. Heathcote. 2005. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology (Baltimore, Md)* 42:53-62.
 232. Cook, G.C., R. Mulligan, and S. Sherlock. 1971. Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis. *The Quarterly journal of medicine* 40:159-185.
 233. Murray-Lyon, I.M., R.B. Stern, and R. Williams. 1973. Controlled trial of prednisone and azathioprine in active chronic hepatitis. *Lancet* 1:735-737.
 234. Summerskill, W.H., M.G. Korman, H.V. Ammon, and A.H. Baggenstoss. 1975. Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared. *Gut* 16:876-883.
 235. Maltzman, J.S., and G.A. Koretzky. 2003. Azathioprine: old drug, new actions. *The Journal of clinical investigation* 111:1122-1124.

236. Czaja, A.J. 1984. Natural history, clinical features, and treatment of autoimmune hepatitis. *Seminars in liver disease* 4:1-12.
237. Mori, Y., T. Mori, H. Yoshida, S. Ueda, K. Iesato, Y. Wakashin, M. Wakashin, and K. Okuda. 1984. Study of cellular immunity in experimental autoimmune hepatitis in mice. *Clinical and experimental immunology* 57:85-92.
238. Araki, K., H. Yamamoto, and S. Fujimoto. 1987. Studies on the pathogenesis of murine experimental autoimmune active hepatitis: sensitized T cell involvement in its induction. *Clinical and experimental immunology* 67:326-334.
239. Lohse, A.W., M. Manns, H.P. Dienes, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and I.R. Cohen. 1990. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. *Hepatology (Baltimore, Md)* 11:24-30.
240. Lohse, A.W., and K.H. Meyer zum Buschenfelde. 1993. Remission of experimental autoimmune hepatitis is associated with antigen-specific and non-specific immunosuppression. *Clinical and experimental immunology* 94:163-167.
241. Howell, C.D., and T.D. Yoder. 1994. Murine experimental autoimmune hepatitis: nonspecific inflammation due to adjuvant oil. *Clinical immunology and immunopathology* 72:76-82.
242. Tiegs, G., J. Hentschel, and A. Wendel. 1992. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of clinical investigation* 90:196-203.
243. Asherson, G.L., J. Ferluga, and G. Janossy. 1973. Non-specific cytotoxicity by T cells activated with plant mitogens in vitro and the requirement for plant agents during the killing reaction. *Clinical and experimental immunology* 15:573-589.
244. Mizuhara, H., E. O'Neill, N. Seki, T. Ogawa, C. Kusunoki, K. Otsuka, S. Satoh, M. Niwa, H. Senoh, and H. Fujiwara. 1994. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *The Journal of experimental medicine* 179:1529-1537.
245. Gantner, F., M. Leist, A.W. Lohse, P.G. Germann, and G. Tiegs. 1995. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology (Baltimore, Md)* 21:190-198.
246. Mizuhara, H., M. Uno, N. Seki, M. Yamashita, M. Yamaoka, T. Ogawa, K. Kaneda, T. Fujii, H. Senoh, and H. Fujiwara. 1996. Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)* 23:1608-1615.
247. Toyabe, S., S. Seki, T. Iiai, K. Takeda, K. Shirai, H. Watanabe, H. Hiraide, M. Uchiyama, and T. Abo. 1997. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 159:1537-1542.
248. Nicoletti, F., R. Di Marco, P. Zaccone, A. Salvaggio, G. Magro, K. Bendtzen, and P. Meroni. 2000. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology (Baltimore, Md)* 32:728-733.

249. Toyonaga, T., O. Hino, S. Sugai, S. Wakasugi, K. Abe, M. Shichiri, and K. Yamamura. 1994. Chronic active hepatitis in transgenic mice expressing interferon-gamma in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:614-618.
250. Kawashima, H., N. Kato, H. Ioi, S. Nishimata, C. Watanabe, Y. Kashiwagi, K. Takekuma, A. Hoshika, L. Szenborn, and K. Bergman. 2008. mRNA expression of T-helper 1, T-helper 2 cytokines in autoimmune hepatitis in childhood. *Pediatr Int* 50:284-286.
251. Voehringer, D., C. Blaser, A.B. Grawitz, F.V. Chisari, K. Buerki, and H. Pircher. 2000. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 165:2415-2422.
252. Rudner, L.A., J.T. Lin, I.K. Park, J.M. Cates, D.A. Dyer, D.M. Franz, M.A. French, E.M. Duncan, H.D. White, and J.D. Gorham. 2003. Necroinflammatory liver disease in BALB/c background, TGF-beta 1-deficient mice requires CD4+ T cells. *J Immunol* 170:4785-4792.
253. Hussain, M.J., A. Mustafa, H. Gallati, A.P. Mowat, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani. 1994. Cellular expression of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in the liver biopsies of children with chronic liver disease. *Journal of hepatology* 21:816-821.
254. Lohr, H.F., J.F. Schlaak, G. Gerken, B. Fleischer, H.P. Dienes, and K.H. Meyer zum Buschenfelde. 1994. Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* 14:161-166.
255. Kulkarni, A.B., C.G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K.C. Flanders, A.B. Roberts, M.B. Sporn, J.M. Ward, and S. Karlsson. 1993. Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:770-774.
256. Horwitz, M.S. 1996. Adenoviruses. In *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; 3rd edition, 2149-2171
257. Shayakhmetov, D.M., A. Gaggar, S. Ni, Z.Y. Li, and A. Lieber. 2005. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *Journal of virology* 79:7478-7491.
258. Brandt, C.D., H.W. Kim, A.J. Vargosko, B.C. Jeffries, J.O. Arrobio, B. Rindge, R.H. Parrott, and R.M. Chanock. 1969. Infections in 18,000 infants and children in a controlled study of respiratory tract disease. I. Adenovirus pathogenicity in relation to serologic type and illness syndrome. *American journal of epidemiology* 90:484-500.
259. Huebner, R.J., W.P. Rowe, T.G. Ward, R.H. Parrott, and J.A. Bell. 1954. Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. *The New England journal of medicine* 251:1077-1086.

260. Badger, G.F., C. Curtiss, J.H. Dingle, H.S. Ginsberg, E. Gold, and W.S. Jordan, Jr. 1956. A study of illness in a group of Cleveland families. X. The occurrence of adenovirus infections. *American journal of hygiene* 64:336-348.
261. Raper, S.E., M. Yudkoff, N. Chirmule, G.P. Gao, F. Nunes, Z.J. Haskal, E.E. Furth, K.J. Probert, M.B. Robinson, S. Magosin, H. Simoes, L. Speicher, J. Hughes, J. Tazelaar, N.A. Wivel, J.M. Wilson, and M.L. Batshaw. 2002. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Human gene therapy* 13:163-175.
262. Jefferies, W.A., and H.G. Burgert. 1990. E3/19K from adenovirus 2 is an immunosubversive protein that binds to a structural motif regulating the intracellular transport of major histocompatibility complex class I proteins. *The Journal of experimental medicine* 172:1653-1664.
263. McNees, A.L., C.T. Garnett, and L.R. Gooding. 2002. The adenovirus E3 RID complex protects some cultured human T and B lymphocytes from Fas-induced apoptosis. *Journal of virology* 76:9716-9723.
264. Danthinne, X., and M.J. Imperiale. 2000. Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene therapy* 7:1707-1714.
265. Muruve, D.A., M.J. Cotter, A.K. Zaiss, L.R. White, Q. Liu, T. Chan, S.A. Clark, P.J. Ross, R.A. Meulenbroek, G.M. Maeldansmo, and R.J. Parks. 2004. Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *Journal of virology* 78:5966-5972.
266. McCaffrey, A.P., P. Fawcett, H. Nakai, R.L. McCaffrey, A. Ehrhardt, T.T. Pham, K. Pandey, H. Xu, S. Feuss, T.A. Storm, and M.A. Kay. 2008. The host response to adenovirus, helper-dependent adenovirus, and adeno-associated virus in mouse liver. *Mol Ther* 16:931-941.
267. Einfeld, D.A., R. Schroeder, P.W. Roelvink, A. Lizonova, C.R. King, I. Kovesdi, and T.J. Wickham. 2001. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *Journal of virology* 75:11284-11291.
268. Zhang, Y., N. Chirmule, G.P. Gao, R. Qian, M. Croyle, B. Joshi, J. Tazelaar, and J.M. Wilson. 2001. Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* 3:697-707.
269. Ziegler, R.J., C. Li, M. Cherry, Y. Zhu, D. Hempel, N. van Rooijen, Y.A. Ioannou, R.J. Desnick, M.A. Goldberg, N.S. Yew, and S.H. Cheng. 2002. Correction of the nonlinear dose response improves the viability of adenoviral vectors for gene therapy of Fabry disease. *Human gene therapy* 13:935-945.
270. Liu, Z.X., S. Govindarajan, S. Okamoto, and G. Dennert. 2000. Fas- and tumor necrosis factor receptor 1-dependent but not perforin-dependent pathways cause injury in livers infected with an adenovirus construct in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)* 31:665-673.
271. Chen, J., A.J. Zajac, S.A. McPherson, H.C. Hsu, P. Yang, Q. Wu, X. Xu, X. Wang, K. Fujihashi, D.T. Curiel, and J.D. Mountz. 2005. Primary adenovirus-specific

- cytotoxic T lymphocyte response occurs after viral clearance and liver enzyme elevation. *Gene therapy* 12:1079-1088.
272. Tripathy, S.K., E. Goldwasser, M.M. Lu, E. Barr, and J.M. Leiden. 1994. Stable delivery of physiologic levels of recombinant erythropoietin to the systemic circulation by intramuscular injection of replication-defective adenovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:11557-11561.
273. Roelvink, P.W., A. Lizonova, J.G. Lee, Y. Li, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, D.E. Brough, I. Kovetski, and T.J. Wickham. 1998. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *Journal of virology* 72:7909-7915.
274. Fechner, H., A. Haack, H. Wang, X. Wang, K. Eizema, M. Pauschinger, R. Schoemaker, R. Veghel, A. Houtsmuller, H.P. Schultheiss, J. Lamers, and W. Poller. 1999. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene therapy* 6:1520-1535.
275. Zinn, K.R., A.J. Szalai, A. Stargel, V. Krasnykh, and T.R. Chaudhuri. 2004. Bioluminescence imaging reveals a significant role for complement in liver transduction following intravenous delivery of adenovirus. *Gene therapy* 11:1482-1486.
276. Benihoud, K., B. Salone, S. Esselin, P. Opolon, V. Poli, M. Di Giovine, M. Perricaudet, and I. Saggio. 2000. The role of IL-6 in the inflammatory and humoral response to adenoviral vectors. *The journal of gene medicine* 2:194-203.
277. Olive, M., L. Eisenlohr, N. Flomenberg, S. Hsu, and P. Flomenberg. 2002. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. *Human gene therapy* 13:1167-1178.
278. Tang, J., M. Olive, R. Pulmanusahakul, M. Schnell, N. Flomenberg, L. Eisenlohr, and P. Flomenberg. 2006. Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. *Virology* 350:312-322.
279. Lieber, A., C.Y. He, L. Meuse, D. Schowalter, I. Kirillova, B. Winther, and M.A. Kay. 1997. The role of Kupffer cell activation and viral gene expression in early liver toxicity after infusion of recombinant adenovirus vectors. *Journal of virology* 71:8798-8807.
280. Zsengeller, Z., K. Otake, S.A. Hossain, P.Y. Berclaz, and B.C. Trapnell. 2000. Internalization of adenovirus by alveolar macrophages initiates early proinflammatory signaling during acute respiratory tract infection. *Journal of virology* 74:9655-9667.
281. Wolff, G., S. Worgall, N. van Rooijen, W.R. Song, B.G. Harvey, and R.G. Crystal. 1997. Enhancement of in vivo adenovirus-mediated gene transfer and expression by prior depletion of tissue macrophages in the target organ. *Journal of virology* 71:624-629.

282. Worgall, S., G. Wolff, E. Falck-Pedersen, and R.G. Crystal. 1997. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Human gene therapy* 8:37-44.
283. Leen, A.M., A. Christin, M. Khalil, H. Weiss, A.P. Gee, M.K. Brenner, H.E. Heslop, C.M. Rooney, and C.M. Bollard. 2008. Identification of hexon-specific CD4 and CD8 T-cell epitopes for vaccine and immunotherapy. *Journal of virology* 82:546-554.
284. Kafrouni, M.I., G.R. Brown, and D.L. Thiele. 2001. Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms. *J Immunol* 167:1566-1574.
285. Abougergi, M.S., S.J. Gidner, D.K. Spady, B.C. Miller, and D.L. Thiele. 2005. Fas and TNFR1, but not cytolytic granule-dependent mechanisms, mediate clearance of murine liver adenoviral infection. *Hepatology (Baltimore, Md)* 41:97-105.
286. Elkon, K.B., C.C. Liu, J.G. Gall, J. Trevejo, M.W. Marino, K.A. Abrahamsen, X. Song, J.L. Zhou, L.J. Old, R.G. Crystal, and E. Falck-Pedersen. 1997. Tumor necrosis factor alpha plays a central role in immune-mediated clearance of adenoviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9814-9819.
287. Lin, M.T., S.A. Stohlman, and D.R. Hinton. 1997. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity. *Journal of virology* 71:383-391.
288. Boyle, J.S., J.L. Brady, and A.M. Lew. 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* 392:408-411.
289. Deliyannis, G., J.S. Boyle, J.L. Brady, L.E. Brown, and A.M. Lew. 2000. A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:6676-6680.
290. Wilson, J.M. 1996. Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *The New England journal of medicine* 334:1185-1187.
291. Krebs, P., E. Scandella, B. Odermatt, and B. Ludewig. 2005. Rapid functional exhaustion and deletion of CTL following immunization with recombinant adenovirus. *J Immunol* 174:4559-4566.
292. Morgan, D.J., H.T. Kreuwel, and L.A. Sherman. 1999. Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J Immunol* 163:723-727.
293. Tao, N., G.P. Gao, M. Parr, J. Johnston, T. Baradet, J.M. Wilson, J. Barsoum, and S.E. Fawell. 2001. Sequestration of adenoviral vector by Kupffer cells leads to a nonlinear dose response of transduction in liver. *Mol Ther* 3:28-35.
294. Schiedner, G., W. Bloch, S. Hertel, M. Johnston, A. Molojavyi, V. Dries, G. Varga, N. Van Rooijen, and S. Kochanek. 2003. A hemodynamic response to intravenous

- adenovirus vector particles is caused by systemic Kupffer cell-mediated activation of endothelial cells. *Human gene therapy* 14:1631-1641.
295. Manickan, E., J.S. Smith, J. Tian, T.L. Eggerman, J.N. Lozier, J. Muller, and A.P. Byrnes. 2006. Rapid Kupffer cell death after intravenous injection of adenovirus vectors. *Mol Ther* 13:108-117.
 296. Kuzmin, A.I., M.J. Finegold, and R.C. Eisensmith. 1997. Macrophage depletion increases the safety, efficacy and persistence of adenovirus-mediated gene transfer in vivo. *Gene therapy* 4:309-316.
 297. Vrancken Peeters, M.J., A.L. Perkins, and M.A. Kay. 1996. Method for multiple portal vein infusions in mice: quantitation of adenovirus-mediated hepatic gene transfer. *BioTechniques* 20:278-285.
 298. Yang, Y., H.C. Ertl, and J.M. Wilson. 1994. MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes to viral antigens destroy hepatocytes in mice infected with E1-deleted recombinant adenoviruses. *Immunity* 1:433-442.
 299. Tjuvajev, J.G., S.H. Chen, A. Joshi, R. Joshi, Z.S. Guo, J. Balatoni, D. Ballon, J. Koutcher, R. Finn, S.L. Woo, and R.G. Blasberg. 1999. Imaging adenoviral-mediated herpes virus thymidine kinase gene transfer and expression in vivo. *Cancer research* 59:5186-5193.
 300. Setoguchi, Y., H.A. Jaffe, C.S. Chu, and R.G. Crystal. 1994. Intraperitoneal in vivo gene therapy to deliver alpha 1-antitrypsin to the systemic circulation. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 10:369-377.
 301. Smith, T.A., B.D. White, J.M. Gardner, M. Kaleko, and A. McClelland. 1996. Transient immunosuppression permits successful repetitive intravenous administration of an adenovirus vector. *Gene therapy* 3:496-502.
 302. Jones, D.E., J.M. Palmer, A.D. Burt, C. Walker, A.J. Robe, and J.A. Kirby. 2002. Bacterial motif DNA as an adjuvant for the breakdown of immune self-tolerance to pyruvate dehydrogenase complex. *Hepatology (Baltimore, Md)* 36:679-686.
 303. Penna, A., G. Del Prete, A. Cavalli, A. Bertoletti, M.M. D'Elia, R. Sorrentino, M. D'Amato, C. Boni, M. Pilli, F. Fiaccadori, and C. Ferrari. 1997. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md)* 25:1022-1027.
 304. Nishimura, T., and A. Ohta. 1999. A critical role for antigen-specific Th1 cells in acute liver injury in mice. *J Immunol* 162:6503-6509.
 305. Rabinovitch, A., and W.L. Suarez-Pinzon. 2007. Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes. *Cell biochemistry and biophysics* 48:159-163.
 306. Kamal, S.M., J.W. Rasenack, L. Bianchi, A. Al Tawil, K. El Sayed Khalifa, T. Peter, H. Mansour, W. Ezzat, and M. Koziel. 2001. Acute hepatitis C without and with schistosomiasis: correlation with hepatitis C-specific CD4(+) T-cell and cytokine response. *Gastroenterology* 121:646-656.

307. Franco, A., V. Barnaba, P. Natali, C. Balsano, A. Musca, and F. Balsano. 1988. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on human hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md)* 8:449-454.
308. Amsen, D., J.M. Blander, G.R. Lee, K. Tanigaki, T. Honjo, and R.A. Flavell. 2004. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117:515-526.
309. Liu, Z.X., S. Govindarajan, S. Okamoto, and G. Dennert. 2001. Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *J Immunol* 166:3035-3041.
310. Imperiale TF, Said AT, Cummings OW, and L. Born. 2000. Need for validation of clinical decision aids: use of the AST/ALT ratio in predicting cirrhosis in chronic hepatitis C. *The American journal of gastroenterology* 95:2328-2332.
311. Shiffman ML, Diago M, T. A, Pockros P, Reindollar R, Prati D, Rodrigez-Torres M, Lardelli P, Blotner S, and Z. S. 2006. Chronic hepatitis C in patients with persistently normal alanine transaminase levels. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:645-652.
312. Mehal, W.Z., A.E. Juedes, and I.N. Crispe. 1999. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol* 163:3202-3210.
313. Cao, O., E. Dobrzynski, L. Wang, S. Nayak, B. Mingle, C. Terhorst, and R.W. Herzog. 2007. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* 110:1132-1140.
314. Park, S.H., S.H. Yang, C.G. Lee, J.W. Youn, J. Chang, and Y.C. Sung. 2003. Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine* 21:4555-4564.