



Université de Montréal

**Étude *in vitro* de l'implication des cytokines de type Th17 dans la  
fibrose hépatique**

Par  
Thomas Fabre

Département de microbiologie et immunologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise  
en microbiologie et immunologie

Janvier, 2013

© Thomas Fabre, 2013



## Résumé

**Introduction:** L'activation des cellules stellaires hépatiques (CSHs) est un point clé du processus de fibrose hépatique. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> intra-hépatiques sont une source majeure de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et pro-inflammatoire (IL-17A), hépatoprotectrice (IL-22) produites par les Th17. Les Th17 sont impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires mais l'effet de ces cellules sur les CSHs n'est pas encore élucidé. **Objectif:** Comprendre le rôle des cytokines de type Th17 dans le processus d'activation des CSHs. **Méthodes:** La lignée de CSHs humaine LX2 a été stimulée par l'IL-17A ou l'IL-22 puis comparée à des cellules traitées par le TGF- $\beta$  et le tampon phosphate salin (PBS). L'activation des CSHs a été évaluée en examinant les molécules profibrotique alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagène de type I (COL1A1) et inhibiteur produits par les tissus des métalloprotéases matricielles I (TIMP-I) par q-PCR. L'expression protéique a été validée par immunobuvardage ou coloration au rouge de picro Sirius. L'expression membranaire de l'IL-10Rb, du TGF- $\beta$ -RII et de l'IL-17RA a été mesurée par cytométrie en flux. **Résultats:** L'IL-17A et l'IL-22 n'activent pas les cellules LX2, car aucune induction d' $\alpha$ -SMA, de COL1A1 et de TIMP-I n'a été observée. Cependant, l'IL-17A et l'IL-22 sensibilisent les CSHs à l'action du TGF- $\beta$ , tel que démontré par une forte expression et production d' $\alpha$ -SMA, collagène type I et TIMP-I. L'IL-17A, mais pas l'IL-22, induit la surexpression à la surface cellulaire du TGF- $\beta$ -RII et inhibe partiellement la baisse d'expression du TGF- $\beta$ -RII après stimulation au TGF- $\beta$ . **Conclusion:** Nos résultats démontrent une fonction pro-fibrotique de l'IL-17A et de l'IL-22, car les deux cytokines sensibilisent les CSHs à l'action du TGF- $\beta$ . L'IL-17A agit via la surexpression et la stabilisation du TGF- $\beta$ -RII tandis que l'IL-22 agit probablement par des mécanismes intracellulaires.

**Mots-clés :** Fibrose hépatique, virus de l'hépatite C, hépatites, cellules stellaires hépatiques, Th17, lymphocytes T régulateurs, IL-17A, IL-22

## **Abstract**

**Background:** Activated hepatic stellate cells (HSCs) are key initiators of the fibrogenic process. Intrahepatic CD4<sup>+</sup> T cells are major producers of hepatoprotective cytokines such as IL-10 produced by regulatory T cells (Tregs) or inflammatory and regulatory cytokines like IL-17 and IL-22 produced by Th17 cells. Th17 cells have been implicated in various conditions or liver damage but the mechanism of action of Th17 cytokines on HSC is still poorly understood.

**Aims:** To understand the role of the different Th17 cytokines (IL17-A and IL-22) in modulating HSC activation.

**Methods:** The HSC line LX2 was stimulated with increasing doses of IL-17A or IL-22, and compared to TGF- $\beta$  and PBS-treated cells. Activation of HSCs was evaluated by examining the expression of the pro-fibrotic molecules alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), collagen type I (COL1A1) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase I (TIMP-I) by q-PCR. Protein expression was validated by either western blot or picro Sirius red stain. Cell surface expression of the cytokine receptors IL-10Rb, TGF- $\beta$ -RII and IL-17RA was evaluated by flow cytometry.

**Results:** IL-17A and IL-22 alone did not induce LX2 activation, as no induction of  $\alpha$ -SMA, COL1A1 and TIMP-I was observed. However, both IL-17A and IL-22 sensitized HSCs to the action of suboptimal doses of TGF- $\beta$ , confirmed by strong  $\alpha$ -SMA, collagen type I and TIMP-I gene expression and protein production. IL-17A but not IL-22 upregulated TGF- $\beta$ -RII cell surface expression and partially inhibited TGF- $\beta$ -RII downmodulation upon TGF- $\beta$  stimulation. **Conclusion:** Our results demonstrated a pro-fibrotic function for IL-17A and IL-22, as both cytokines sensitize HSC to the action of TGF- $\beta$ . IL-17A acts through upregulation and stabilization of the TGF- $\beta$ -RII while IL-22 probably acts through an intracellular mechanism.

**Keywords:** Liver fibrosis, Hepatitis C virus, Hepatitis, Hepatic Stellate Cell, Th17, regulatory T cells, IL-17A, IL-22

# Table des matières

Introduction.....	1
1. La fibrose hépatique, une réponse de réparation tissulaire.....	2
a. Architecture et fonction du foie normal.....	2
a. Initiation et persistance du processus de fibrose hépatique.....	2
b. Architecture d'un foie fibrotique.....	5
2. Évaluation clinique de la fibrose hépatique.....	7
a. Technique invasive : la biopsie hépatique.....	7
b. Les techniques non invasives.....	9
3. Modèles expérimentaux de fibrose hépatique.....	12
a. Les modèles <i>in vivo</i> .....	12
b. Les modèles <i>ex vivo</i> .....	13
c. Les modèles <i>in vitro</i> .....	15
4. Modulation immunitaire de la fibrose hépatique.....	16
a. Propriétés immunologiques des cellules stellaires hépatiques.....	16
b. Modulation par le système immunitaire inné.....	18
c. Modulation par le système immunitaire adaptatif.....	21
Hypothèse et objectifs.....	31
Hypothèse.....	31
Objectifs.....	31
Matériels et méthodes.....	32
Anticorps.....	32
Matériels et conditions de culture.....	32
Culture cellulaire.....	32
Cytokines et réactifs.....	33
PCR quantitative.....	33
Gel d'électrophorèse.....	33
Clonage.....	34
Immunobuvardage.....	34
Coloration à l'aide du rouge de picro Sirius.....	34

Cytométrie en flux. ....	35
Analyses statistiques. ....	35
Résultats. ....	37
1. Développement d'un modèle in vitro de fibrose hépatique. ....	37
2. Validation de nos amorces de PCR quantitative. ....	39
3. Confirmation de l'expression de l'IL-17RA et de l'IL-10Rb par la lignée de cellules stellaires hépatiques LX2. ....	40
4. L'interleukine 17A agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques. ....	48
5. L'interleukine 17A module l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires. ....	52
6. L'interleukine 22 agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques. ....	54
7. L'interleukine 22 ne module pas l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires. ....	55
8. L'interleukine 17A et l'interleukine 22 ne modulent pas l'expression de l'IL-10Rb et de l'IL-17RA respectivement. ....	57
Discussion. ....	60
Perspectives. ....	69
Conclusion. ....	70

## Liste des tableaux

Tableau 1. Amorces de PCR.....	36
--------------------------------	----



## Liste des figures

Figure 1. Représentation de l'architecture hépatique normale. ....	3
Figure 2. L'initiation et la persistance de la fibrose hépatique entraîne des modifications de l'architecture hépatique.....	6
Figure 3. Différents types de fibrose sont observés sur les biopsies hépatiques. ....	8
Figure 4. Représentation des différentes techniques d'évaluation de la fibrose hépatique.	11
Figure 5. Interactions entre le système immunitaire et les cellules stellaires hépatiques.	17
Figure 6. Mécanismes de différenciation et de sécrétion des sous-populations de lymphocytes T-CD4+.....	25
Figure 7. Représentation du récepteur et des voies de signalisation cellulaire des cytokines de type Th17.....	28
Figure 8. Modulation de la fibrose par les cellules du système immunitaire : une balance complexe de cytokines.....	30
Figure 9. Schéma expérimental utilisé.....	38
Figure 10. Processus de validation des expériences de PCR quantitative. ....	41
Figure 11. Validation de l'expression de l'IL-17RA et de l'IL-10Rb par les cellules LX2 quiescentes.....	49
Figure 12. L'IL-17A agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques. ....	51
Figure 13. L'interleukine 17A module l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires.....	53
Figure 14. L'interleukine 22 agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques. ....	56
Figure 15. L'interleukine 22 ne module pas l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires.....	58
Figure 16. L'interleukine 17A et l'interleukine 22 ne modulent pas l'expression de l'IL-10Rb et de l'IL-17RA respectivement.....	59
Figure 17. Modèle proposé d'action de l'IL-17A dans la fibrose hépatique.....	64
Figure 18. Modèle proposé d'action de l'IL-22 dans la fibrose hépatique. ....	66

## Liste des abréviations

ALT	alanine aminotransférase
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	allophycocyanine
ARN	acide ribonucléique
CCL4	tétrachlorure de carbone
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CSH	cellule stellaire hépatique
DMEM	eagle modifié par Dulbecco
ECM	matrice extracellulaire
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
HCC	<i>hepatocellular carcinoma</i>
HRP	peroxydase de raifor
IFN- $\gamma$	interféron gamma
IL-1 $\beta$	interleukine 1 beta
IL-4	interleukine 4
IL-5	interleukine 5
IL-6	interleukine 6
IL-9	interleukine 9
IL-10	interleukine 10
IL-13	interleukine 13
IL-17A	interleukine 17A
IL-17F	interleukine 17F
IL-22	interleukine 22
IL-26	interleukine 26
IL-28B	interleukine 28B
IP-10	<i>interferon gamma-induced protein 10</i>
JAK	kinase de janus
JNK	<i>jun Kinase</i>
KC	cellule de kupffer

KO	<i>knockout</i>
LAP	<i>latent protein</i>
LPS	poly liposaccharides
MAPK	<i>mitogen-activated protein (MAP) kinases</i>
MCP	<i>methyl-accepting chemotaxis protein</i>
MFI	intensité de fluorescence moyenne
MMP	métalloprotéases matricielles
NK	<i>natural killer</i>
NKT	<i>natural killer T</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	réaction de polymérase en chaîne
PD-1	<i>program death 1</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	<i>phosphatidylethanolamines</i>
RANTES	<i>regulated and normal T cell expressed and secreted</i>
ROR $\gamma$ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
SMA	actine de muscle lisse
SMAD	<i>signal transducer of Mothers against decapentaplegic homolog</i>
STAT	<i>signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SVF	sérum de veau fœtal
TCR	récepteurs des cellules T
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	inhibiteur produits par les tissus des MMPs
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	facteur de nécrose tumorale
VHB	virus de l'hépatite B
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine

# Remerciements

Il est toujours difficile d'écrire des remerciements, trouver les bons mots et ne pas oublier quelqu'un. Je ferai donc de mon mieux pour exprimer mes sentiments.

Je souhaite d'abord remercier ma directrice de recherche, Naglaa Shoukry, sans qui rien n'aurait été possible. Naglaa m'a accueilli à bras ouverts dans son laboratoire, me donnant les opportunités, les moyens et une formation de grande qualité. J'ai appris et continué d'apprendre avec enthousiasme à ses côtés. J'ai pu grâce à Naglaa participer à des congrès internationaux qui ont eu un grand impact sur ma formation. Enfin, sa gentillesse et sa générosité ont fait que mon intégration dans son laboratoire a été une bonne expérience. Ceci me permet de continuer les remerciements avec les membres et amis de notre laboratoire. Merci à Nathalie, pour sa patience et son investissement pour nous simplifier la vie, et Julie par la même occasion ; Mohamed pour m'avoir formé et soutenu au début de ma formation ; Jean-François pour m'avoir fait visiter le Québec, découvrir des microbrasseries, et éventuellement travailler (mes meilleurs vœux pour ton doctorat à Oxford) ; Hassen pour nos discussions scientifiques, ton enseignement de l'immunologie avec des phrases qui ne seraient pas correctes de citer ici, mais qui sont d'une grande aide pour comprendre certains mécanismes immunitaires ; Sandy pour sa gentillesse et son expérience au laboratoire ; Enfin, Camille et Marion pour leur bonne humeur et gentillesse.

Je veux aussi remercier la fondation Gabriel le Marquis pour m'avoir financé pendant une partie de ma maîtrise. Ce mémoire est l'aboutissement de votre investissement.

Puis je souhaite remercier tous les groupes de musique qui m'ont accompagné pendant ma rédaction : sans eux, il m'aurait fallu sûrement plus de trois semaines pour écrire.

Enfin, le plus important à mes yeux : les amis et la famille. Tout d'abord, merci à mon bébé Mélie, pour ton soutien, ton amour, ta patience et nos séances de relecture qui ont été vitales à l'aboutissement de ce travail ; Ensuite, Charlotte, merci pour ton aide en histologie et

tes conseils ; Kessen pour avoir partagé ton expérience et pour ta générosité et, enfin, Marie-Claude a.k.a MC pour nos discussions. Puis, tous les autres qui m'ont soutenu et qui continuent de le faire depuis la maternelle, comme Léobiwankennobi ; depuis le collègue Adrien, Nunu, Nathalie, Lili, Aurélien et puis Mister Billy a.k.a Yoann en espérant se retrouver pour le doctorat. Un gros gros gros merci à ma maman qui m'a donné son soutien à plus de 1000 % pendant cette aventure, de même pour mon père ; je sais que vous êtes fiers de moi et ce mémoire est une façon de vous le rendre. Un grand merci à Méméte pour être une incroyable arrière-grand-mère, à papi, Mimo et mémé Yvonne : je sais qu'il est difficile pour vous de comprendre ce que je fais, mais votre soutien m'aide et me pousse à continuer ; une pensée à Serge et Martine, mes cousins Florent, Manu, Lucie, Fabien et Mathilde.

Une dernière pensée à mon grand-père René : tu n'as pas eu le temps de me voir obtenir mon premier diplôme, je sais que tu es fier de moi, pour avoir obtenu une maîtrise et commencer mon doctorat. Ce mémoire est pour toi.

Love,  
Thomas.

## Introduction

Les pathologies fibrosantes représentent 45 % des causes de mortalité dans le monde (Wynn, 2008). La fibrose est caractérisée par un dépôt excessif de composants de la matrice extracellulaire. Elle peut se développer dans divers organes ou tissus comme le cœur, les poumons et le foie. Un point clé de ce phénomène commun à de multiples organes est la transformation des cellules mésenchymateuses en myofibroblastes (Mehal et al., 2011). Une fois ces cellules transformées, elles acquièrent un phénotype contractile et produisent en grande quantité du collagène occupant l'espace laissé libre par la mort cellulaire. La fibrose hépatique apparaît lorsque les atteintes au foie persistent pour une longue période de temps (Friedman, 2008). L'inflammation provoquée par la mort des hépatocytes au cours des hépatites virales, auto-immunes, par des toxines ou par la prise excessive d'alcool, va induire l'activation de cellules stellaires hépatiques (Friedman, 2004) instaurant une réponse de réparation tissulaire. C'est la balance entre les signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui va influencer la progression de la fibrose. Si celle-ci persiste, le remplacement du parenchyme par du tissu cicatriciel va entraîner et favoriser des pathologies plus graves comme la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire (Kanwal et al., 2011; Shariff et al., 2009). À date, aucune molécule anti-fibrotique n'est disponible pour traiter les patients : il est donc nécessaire de poursuivre les études afin de déterminer les facteurs moléculaires de la progression de la fibrose hépatique. En effet, avec le nombre croissant de carcinomes hépatocellulaires dans le monde, il est important de pouvoir contrôler la fibrose hépatique et ainsi réduire les risques de carcinome dans cette population (Zhang and Friedman, 2012). Les cytokines produites par les cellules du système immunitaire figurent parmi les facteurs clés de la fibrose hépatique (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Il est donc important de déterminer les populations et facteurs immunitaires anti- et pro-fibrotiques et d'évaluer leurs mécanismes d'action, qu'ils soient directs (agissant sur les cellules stellaires hépatiques) ou indirects (agissant sur d'autres populations pouvant ensuite moduler l'activation des CSHs). Lors de cette introduction, nous allons d'abord nous intéresser au processus de fibrose hépatique, puis aux cellules responsables de ce processus, à l'influence du système immunitaire, et enfin aux complications induites par la fibrose hépatique.

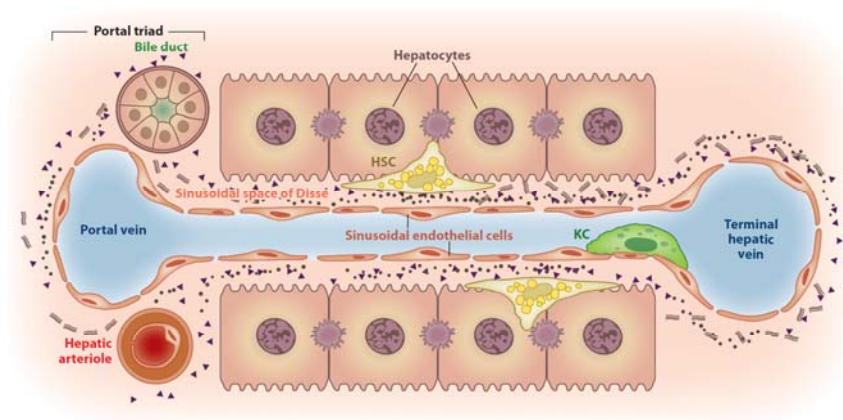
## **1. La fibrose hépatique, une réponse de réparation tissulaire.**

### **a. Architecture et fonction du foie normal.**

Le foie est un organe unique puisqu'il est impliqué dans de nombreux phénomènes biologiques, comme le métabolisme des lipides, des sucres, et la détoxification du sang. Les cellules parenchymateuses hépatiques (hépatocytes) ont donc des fonctions biologiques distinctes et importantes pour l'organisme. Cet organe est principalement irrigué par la veine porte. La fenestration de l'endothélium permet une irrigation optimale du tissu, et donc de délivrer les nutriments nécessaires aux autres types cellulaires présents. En condition physiologique, les hépatocytes reposent sur la matrice extracellulaire (MEC) composée majoritairement de collagène de type II et IV (figure 1). Ils sont pleinement différenciés avec des microvillosités et assurant la production et l'excrétion de la bile. Les cellules stellaires hépatiques (CSHs) sont dans un état de quiescence, leur fonction principale étant le stockage du rétinol une fois que celui-ci a été métabolisé par les hépatocytes (Rossi et al., 2012; Yamada et al., 1987). Les CSHs représentent alors environ 1 % du nombre total de cellules d'un foie sain. Enfin, les macrophages résidents du foie (en vert, figure 1), appelés aussi cellules de Kupffer (KC), car elles ont été identifiées par le professeur Carl Wilhelm Von Kupffer (Haubrich, 2004), constituent environ 30 % du nombre total des cellules du foie. Ils se situent autour des vaisseaux sanguins et jouent un rôle dans l'élimination de pathogènes provenant entre d'autres du système digestif.

### **b. Initiation et persistance du processus de fibrose hépatique.**

En situation d'atteinte hépatique, indépendamment de la source, la sécrétion paracrine de cytokines, de réactifs oxygénés, la présence de corps apoptotiques et de lipopolysaccharide (LPS) vont agir sur les CSHs. Ceci va entraîner un nombre important de modifications dans le transcriptome des CSHs ayant pour objectif de les rendre plus sensibles aux signaux de prolifération et de fibrose, comme le *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) et le *platelet derived growth factor* (PDGF) (Friedman, 2008; Wong et al., 1994).



**Figure 1. Représentation de l'architecture hépatique normale.**

Les hépatocytes reposent sur la matrice extracellulaire, les échanges sanguins sont assurés par la fenestration de l'endothélium. Les cellules stellaires hépatiques sont quiescentes, peu nombreuses et retiennent les acides rétinoïques sous forme de gouttelettes cytoplasmiques. Les macrophages résidents du foie : les cellules de Kupffer assurent leur fonction de sentinelle. (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Réimprimé avec la permission de copyright clearance center.



Les caractéristiques notables de l'initiation des CSHs sont la perte de la rétention des acides rétinoïques, l'acquisition d'un phénotype contractile similaire à un myofibroblaste avec la production de fuseaux d'*alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA), l'expression membranaire accrue des récepteurs au TGF- $\beta$ , et au PDGF, une prolifération accrue ainsi qu'une réponse chemiotaxique élevée (Seki et al., 2009; Shirakami et al., 2012; Tahashi et al., 2002).

La persistance de la fibrose hépatique correspond à la période de temps où les cellules stellaires vont maintenir leur état d'activation. En effet, en continuant de répondre aux signaux pro-fibrotiques (TGF- $\beta$ , PDGF), les CSHs vont commencer à remodeler la matrice extracellulaire *via* la sécrétion de métalloprotéases matricielles (ou MMPs pour *matrix metalloproteinase*), une famille d'environ 22 endopeptidases zinc-dépendante pouvant être secrétées ou bien associées aux membranes plasmiques (Loffek et al., 2011; Siefert and Sarkar, 2012; Somerville et al., 2003). Ces protéases ont pour but de dégrader les composants de la MEC saine. Celle-ci est alors remplacée par du collagène de type I et de la fibronectine majoritairement produite par les CSHs (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). De plus, les MMPs permettent d'activer un grand nombre de cytokines pro-fibrotiques. Certaines cytokines, comme l'IL-1 $\beta$ , IL-18, l'IL-22 et le TGF- $\beta$ , sont produites sous forme de complexes nécessitant une étape de clivage avant de devenir actives. MMP-2 et MMP-9, qui sont des gélatinase/collagénase de type IV, peuvent notamment induire l'activation du TGF- $\beta$  en clivant celui-ci à partir du complexe LAP pour *latent binding protein* (Wang et al., 2006; Yu and Stamenkovic, 2000), une protéine retenant le TGF- $\beta$  à la matrice et le rendant par la même occasion inactif. De plus, le TGF- $\beta$  module l'activité et la sécrétion des différents MMPs sur de nombreux types cellulaires, dont les CSHs. Cependant, les MMPs peuvent dégrader la « bonne » comme la « mauvaise » matrice. Ils sont de plus régulés par la sécrétion d'inhibiteurs qui, en se liant, vont bloquer l'activité catalytique de ces protéases. On appelle ces protéines les inhibiteurs de MMPs produits par les tissus (TIMPs). Chez l'homme, il existe quatre familles de TIMPs, couvrant ainsi le spectre de MMPs, chaque famille bloquant un nombre limité de MMPs (Murphy, 2011). Dans le processus de fibrose hépatique, TIMP-1 est considéré comme le plus important et peut réguler l'activité des MMPs les plus impliqués dans le processus de fibrose à savoir : MMP-1, MMP-2 et MMP-9. La conséquence directe de l'inhibition des MMPs par les TIMPs et une accumulation pathologique de collagène de type

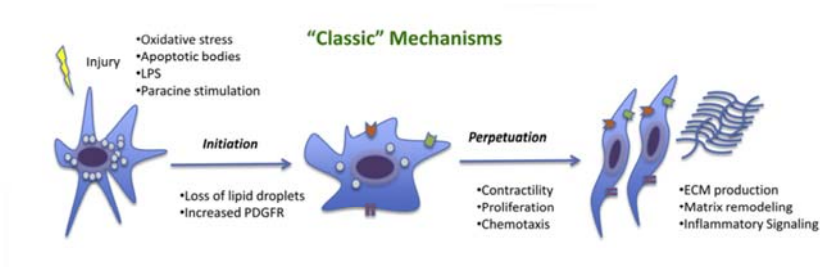
I. Ceci est bénéfique pendant la phase aigüe des lésions hépatiques, car la surexpression de matrice permet de maintenir l'architecture du tissu qui est altéré par la mort des hépatocytes. Néanmoins, à long terme, l'excès de matrice extracellulaire entraîne une altération de l'architecture et de la fonction hépatique.

### **c. Architecture d'un foie fibrotique**

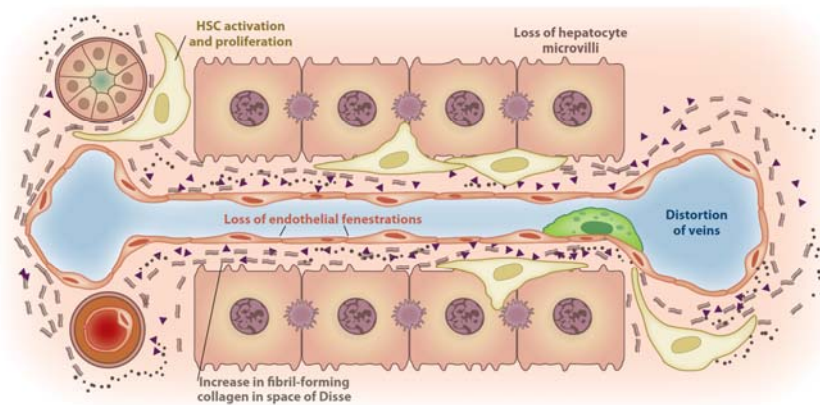
Il existe différents types et zones d'accumulation de la matrice extracellulaire dans le foie : ceci est dépendant des types de pathologie, comme le montre la figure 3. Notamment, la fibrose induite par les hépatites virales est caractérisée par sa localisation porte ou porto-centrale (Fernandez et al., 2009). Il existe des caractéristiques communes aux foies fibrotiques. Tout d'abord, l'accumulation de collagène de type I et de fibronectine entraîne la perte des fenestrations des cellules endothéliales (figure 2B). Il en résulte une baisse de l'irrigation tissulaire, une augmentation de la pression sanguine portale, amenant ainsi une diminution des échanges entre le sang et les hépatocytes.

Un autre point caractéristique d'un foie fibrotique est la prolifération et la migration des cellules stellaires hépatiques actives dans des zones fibrotique : les *septa*. Les *septa* sont des lieux de déposition importants de matrice extracellulaire où l'on retrouve un nombre important de cellules infiltrantes inflammatoires et des fibroblastes. La migration jusqu'aux *septa* est assurée par l'expression de récepteurs aux chimiokines, permettant aux CSHs de co-localiser avec d'autres cellules inflammatoires (Seki et al., 2009). Quant à la prolifération des cellules stellaires, elle peut être considérable; on dénote chez le rat que leur nombre peut augmenter jusqu'à 10 fois par rapport à un foie sain. Enfin au dernier stade de fibrose, l'accumulation de collagène de type I induit des interactions matrice/hépatocyte qui vont entraîner une baisse de la différenciation des hépatocytes qui se traduit par une perte des microvillosités du pôle apical (Hernandez-Gea and Friedman, 2011).

A.



B.



**Figure 2. L'initiation et la persistance de la fibrose hépatique entraîne des modifications de l'architecture hépatique.**

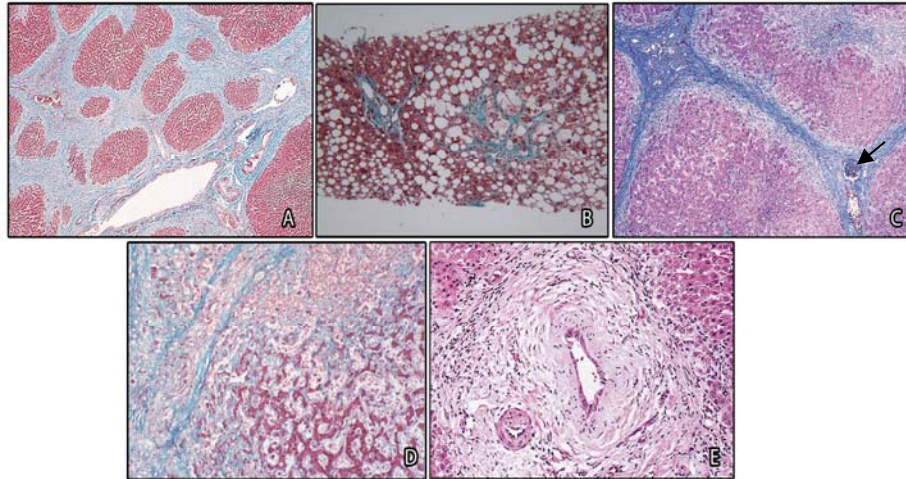
Après une lésion hépatique, les signaux de stress entraînent des changements dans les cellules stellaires (initiation). Ensuite, celles-ci vont répondre à d'autres molécules qui vont induire leur différenciation en myofibroblaste, la prolifération, et la production de matrice extracellulaire (A) (Friedman, 2008). L'accumulation pathologique de collagène de type I induit la perte des fenestrations sinusoidales, une perte de la différenciation des hépatocytes et une distorsion des veines (B). (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Réimprimé avec la permission de copyright clearance center.

## **2. Évaluation clinique de la fibrose hépatique.**

L'évaluation de la fibrose hépatique chez les patients souffrant d'hépatites chroniques a une grande importance pronostique et permet d'établir un plan de traitement adéquat. Il faut en effet suivre avec attention la progression de ce processus biologique avant que l'état cirrhotique soit atteint. On peut donc évaluer le degré ou le score de fibrose chez les patients, selon une classification en quatre niveaux dans la majorité des cas (Guido et al., 2011). Communément, un individu ayant un foie sain est considéré comme F0, une fibrose légère est nommée F1, F2 correspond à une fibrose modérée, F3 à une fibrose avancée et enfin F4 est souvent synonyme du début de la cirrhose (Bedossa and Poynard, 1996; Scheuer, 1991). Il existe deux types de techniques pour déterminer le score de fibrose chez les patients, celles qui sont invasives et les non invasives.

### **a. Technique invasive : la biopsie hépatique.**

Une technique invasive implique qu'un prélèvement de tissus doit être effectué, afin de pouvoir poser un diagnostic. Pour la fibrose hépatique, il faut donc prélever un échantillon de foie d'environ 3 cm de long, ce qui représente 1/50000 de l'organe total (Friedman, 2010). La taille de la biopsie est critique, car une biopsie de petite taille peut être non représentative de l'état de l'organe à cause de la variabilité des échantillons (Bedossa et al., 2003). On considère qu'un minimum de 11 espaces porte est indispensable à l'établissement d'un bon diagnostic (Colloredo et al., 2003). La biopsie est habituellement effectuée lors d'une journée d'hospitalisation, puisque le spécimen est récupéré *via* une aiguille sous anesthésie locale. Il est ensuite fixé dans du formol et soumis à un pathologiste qui va évaluer un certain nombre de facteurs par observations de la structure du tissu à l'aide de colorations effectuées sur des coupes. Principalement, on évalue l'apparition de nécrose dans les différentes zones du foie (zone périportale, par exemple), la surface totale de nécrose, la formation de septae, l'inflammation portale, l'apoptose, l'infiltration de cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes) et la déposition de collagène par des colorations par le Trichrome de Masson (tous les types de collagène apparaissant en bleu) ou par le rouge de picro Sirius (collagène de type I uniquement). À la suite de ces observations, le pathologiste dresse une table de score selon différentes échelles telles que : *l'Histological Activity Index* (HAI) de



**Figure 3. Différents types de fibrose sont observés sur les biopsies hépatiques.**

Une coloration au Trichrome de Masson révèle la répartition de collagène dans le tissu **(A-D)**. Cirrhoses alcoolique quiescente : nodules de régénération entourés de larges bandes de fibrose **(A)**. Stéatose non alcoolique, fibrose péricellulaire et formation de gouttelettes lipidiques macrovésiculaires **(B)**. Hépatite C, déposition de collagène porto-centraux avec nodules lymphoïdes (flèche) **(C)**. Fibrose hépatique lors d'insuffisance cardiaque chronique, fibrose sinusoidale et obstructions des veines hépatiques **(D)**. Cholangite sclérosante primitive, destruction des cellules du canal biliaire et accumulation de collagène autour des canaux biliaires **(E)**. (MacSween's Pathology of the liver, 5ème édition)

Knodell (Brunt, 2000), Scheuer (Scheuer, 1991), METAVIR utilisée pour les hépatites virales chroniques (Bedossa and Poynard, 1996) et celle d'Ishak basée elle-même sur le HAI de Knodell (Ishak et al., 1995). Il est important de noter que ces observations permettent de dresser un diagnostic sur l'avancement de la fibrose, mais aussi sur la forme (figure 3). Il est difficile de déterminer quelle échelle est la plus appropriée. Il en est du devoir du pathologiste de savoir quelle technique il préfère utiliser et celle qui lui permet au mieux de répondre à une question posée (Guido et al., 2011). Aucune de ces méthodes n'est parfaite et chacune reste subjective à l'évaluation du pathologiste.

De plus, la technique de biopsie hépatique peut se conjuguer d'effets secondaires liés à l'anesthésie locale, à des saignements ou des perforations qui bien que plus rares du fait que les biopsies sont réalisées sous échographies peuvent mettre la vie du patient en danger. Néanmoins, l'évaluation de la fibrose hépatique sur biopsie, malgré l'existence de différents systèmes de score, reste la technique la plus fiable et reste l'étalon-or de l'évaluation de la fibrose.

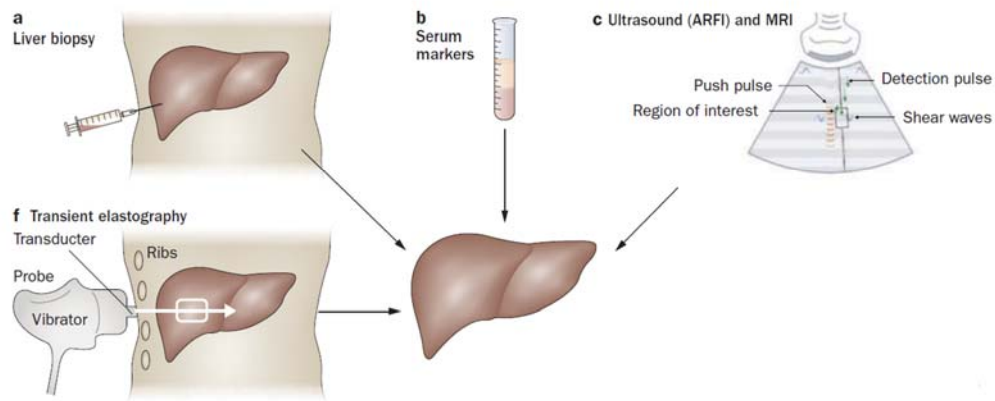
#### **b. Les techniques non invasives.**

Depuis plusieurs années, un des objectifs majeurs en santé est de développer des outils de diagnostics dits non invasifs ou se limitant simplement à une prise de sang. Il existe ainsi un petit nombre de méthodes non invasives utilisées par les services d'hépatologie dans le monde (Figure 4). Ces tests visent à être aussi efficaces qu'une biopsie, tout en étant moins chers et plus rapides.

Il existe donc des tests basés sur l'évaluation et la quantification de marqueurs biochimiques à partir du sérum des patients. Les plus connus et mieux validés sont le Fibrotest de la société Bio Protective (Paris, France) et le test ELF : « enhanced liver fibrosis » de la société iQur Ltd (Southampton, Royaume-Uni) et le score APRI. Le Fibrotest mesure le niveau d' $\alpha$ 2-macroglobuline, d'haptoglobine, de  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, de bilirubine totale, d'apolipoprotéine A1 et l'alanine aminotransférase (ALT) dans le sérum en plus d'utiliser l'âge et le sexe du patient. Le Fibrotest s'avère être d'une bonne précision et corrèle fortement avec le degré de fibrose hépatique selon le score METAVIR (Ngo et al., 2006). Il existe aussi des tests qui ne sont pas basés sur les marqueurs biochimiques, mais sur la mesure

de l'élasticité du foie : le Fibroscan de la société EchoSens (Londres, Royaume-Uni). En effet, il a été démontré que l'élasticité diminue avec l'accumulation de composant de collagène lors de la fibrose induite par les infections virales chroniques (Friedman, 2010). Cependant lors de la phase aigüe, une baisse de l'élasticité est le reflet d'une forte inflammation hépatique (Friedman, 2010). Cette mesure de l'élasticité se fait en envoyant un choc mécanique dans le foie et en mesurant la vitesse à laquelle cette onde se déplace dans le foie. Cette technique totalement indolore ne permet pas de déterminer avec précision les différents stades de fibrose. Cependant, de nombreuses études démontrent que la combinaison du Fibrotest avec le Fibroscan permet de déterminer et de prévoir la progression de la fibrose hépatique sur une période de 5 ans (Vergniol et al., 2011).

Malgré les importants progrès apportés aux tests non invasifs ils ne suffisent pas toujours à porter un diagnostic suffisamment précis. Ils sont donc utilisés pour le suivi des patients, mais si ceux-ci progressent rapidement vers un stade avancé de fibrose entre deux tests non-invasifs, la biopsie reste la meilleure technique pour valider que cette progression est significative. C'est pourquoi de nombreuses études sont encore nécessaires afin de perfectionner ces techniques non invasives.



**Figure 4. Représentation des différentes techniques d'évaluation de la fibrose hépatique.**

La biopsie hépatique (A) est une technique invasive. Les techniques non invasives sont nombreuses ; les tests utilisant les marqueurs biologiques dans le sérum (B). Les méthodes mesurant l'élasticité du foie (C, F) comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou l'élastographie. (Friedman, 2010). Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd.



### **3. Modèles expérimentaux de fibrose hépatique.**

#### **a. Les modèles *in vivo*.**

Ces modèles se basent majoritairement sur l'induction d'hépatites *via* l'injection de molécules sur de petits animaux de laboratoire, souris ou rat. L'induction de dommages hépatiques va induire l'initiation du processus de fibrose, et permet donc son étude. Il existe différentes molécules induisant différents types d'hépatites.

Un des moyens les plus classiques d'induire une hépatite chez la souris est l'injection de concanaviline-A (Con-A). Cette substance appartient à la famille des lectines, qui sont des glycoprotéines importantes dans l'immunité, car elles permettent des interactions cellules/cellules, l'activation de cellules immunitaires avec la production de cytokines et l'initiation de la cytotoxicité. La Con-A peut se lier à la surface des hépatocytes, notamment sur le récepteur à l'insuline (McMillan et al., 1984). Cette liaison va recruter des lymphocytes cytotoxiques activés à proximité des hépatocytes. Ceux-ci vont mourir par apoptose suite à la sécrétion de cytokines comme l'interféron- $\gamma$  ou le TNF- $\alpha$  : cette mort cellulaire se traduit par une augmentation significative d'ALT dans le sérum huit heures après l'injection. L'hépatite ainsi induite est dépendante des lymphocytes T et elle est non spécifique (Tiegs et al., 1992)

Une autre molécule souvent employée chez les rongeurs pour induire une hépatite sévère est le tétrachlorure de carbone (CCL<sub>4</sub>). Cette substance était utilisée comme vermifuge au début du XXe siècle, mais des études réalisées en Angleterre sur des prisonniers condamnés à la peine capitale a permis de démontrer que le CCL<sub>4</sub> induit de forts dommages hépatiques (Docherty and Burgess, 1922). En effet, une nécrose hépatocellulaire modérée est induite en seulement six heures, puis une forte augmentation d'ALT dans le sérum au bout de 12 heures. Le mécanisme d'action du CCL<sub>4</sub> s'effectue via la peroxydation des lipides et donc la libération de réactifs oxygénés connus pour induire l'activation des CSHs.

On peut aussi induire une hépatite alcoolique chez les souris, en rajoutant une dose d'éthanol dans l'eau. Les rongeurs vont ainsi ingurgiter des concentrations importantes d'alcool mimant les effets biologiques observés chez l'homme (Dou et al., 2012). Une hépatite

sévère peut aussi être induite par l'altération de la fonction des cellules dendritiques (Aloman et al., 2011) et la translocation massive de LPS venant de l'intestin : ceci entraîne l'apoptose des hépatocytes, de l'inflammation, ainsi que l'activation des cellules stellaires en diminuant l'expression de BAMBI, un récepteur inhibiteur du TGF- $\beta$  (Seki et al., 2007). De plus, l'alcool altère des facteurs reconnus pour leur capacité à moduler l'activation des CSHs, comme le métabolisme des lipides et la production des réactifs oxygénés (Baillie, 1971; Seth et al., 2010).

Les modèles d'hépatites virales chez les rongeurs sont en nombre limités, il existe des souris transgéniques exprimant des protéines virales du VHB et du VHC. Ils permettent d'établir le rôle de ces protéines dans un contexte biologique ; cependant ils ne sont pas physiologiques, car les protéines sont exprimées à un niveau beaucoup plus élevé que celui rencontré dans les hépatites virales chez l'homme. Pour le virus de l'hépatite B, il existe un modèle murin exprimant le génome complet du virus : il est souvent utilisé pour étudier la progression de la fibrose hépatique (Zhang et al., 2011). Pour le virus de l'hépatite C, de nouveaux modèles d'infection ont été développés, où on reconstitue un système immunitaire et un foie humain à l'aide de cellules souches issues de sang de cordon (Dorner et al., 2011; Washburn et al., 2011) qui ont permis d'étudier l'entrée du virus. L'infection de ces souris par les virus isolés de plasma permet l'évaluation de la progression de la fibrose. Un des facteurs limitants de ce modèle est que la reconstitution du foie par des hépatocytes humains implique une destruction des hépatocytes murins, créant ainsi une inflammation et des dommages hépatiques qui peuvent se confondre avec ceux induit par l'infection virale.

Enfin, on peut effectuer une ligature du choléduque.. Au bout de quelques jours, on observe une nécrose progressive du foie avec une diminution du nombres d'hépatocytes associée à de l'inflammation et par conséquent l'accumulation de matrice extracellulaire (Johnstone and Lee, 1976).

#### **b. Les modèles *ex vivo*.**

Ils consistent à étudier le phénomène de fibrose en se procurant des échantillons humains et en conduisant les expériences requises. L'obtention des spécimens primaires

humains est coûteuse et difficile. De plus, il y a de nombreux facteurs limitants : chaque individu étant unique, les réponses observées peuvent être variables ; l'âge de l'individu va influencer la viabilité du spécimen et la conservation des cellules ou des tissus obtenus est complexe. À ce jour, il existe trois moyens d'étudier la fibrose *ex vivo* : obtenir des biopsies hépatiques, isoler des cellules primaires, ou travailler sur des cultures de microsection hépatique.

Le travail sur biopsie de patients peut être réalisé si les biopsies une fois fixées dans du paraformaldéhyde sont conservées dans une banque après évaluation par un pathologiste. Ces fragments peuvent servir à effectuer des expériences d'immunofluorescence ou d'immunohistochimie sur des facteurs d'intérêts, et par la suite établir des corrélations avec des marqueurs d'inflammation et de fibrose dans le sérum des patients ou bien avec le score de fibrose établi par le pathologiste. De plus, des extractions d'ARNm sur des biopsies, directement après obtention, permettent de réaliser des études par micro-arrays entre les différents stades de fibrose, pour développer une signature génétique de la fibrose hépatique.

L'isolation de cellules primaires issues de petits rongeurs est plus courante, bien qu'il soit également possible d'obtenir des CSHs primaires humaines. Pour ce faire, il faut obtenir un fragment de foie considéré comme sain. Il s'agit le plus souvent de tissu prélevé autour d'une métastase hépatique, qui provient d'un cancer d'origine non hépatique. La séparation des CSHs des autres types cellulaires est possible après digestion du tissu par de la collagénase qui libère l'ensemble des types cellulaires du foie. Ensuite, l'isolation se fait sur un gradient : après centrifugation, les hépatocytes et les cellules endothéliales vont précipiter dans le culot et les CSHs vont flotter à cause de la présence des vésicules contenant les acides rétinoïques (Friedman et al., 1992; Mendoza-Figueroa et al., 1988). Une des limitations majeures de cette technique est que les CSHs se retrouvent à la même hauteur que les neutrophiles et monocytes. Il y a donc contamination à hauteur de 20 % par des cellules pouvant influencer les résultats des expériences de par la nature pro-inflammatoire de ces cellules. Une méthode d'ultrapurification encore peu utilisée est apparue et se base sur une seconde étape de sélection des CSHs. On utilise alors des billes magnétiques liant les monocytes et neutrophiles (CD11b,

CD11c, CD14 et CD16) et, par sélection négative sur colonne magnétique, on peut obtenir des cellules stellaires d'une pureté supérieure à 99 % (Seki et al., 2007).

Enfin, il est possible de réaliser des cultures de microsections hépatiques. Après récupération d'un fragment de tissus sains, on coupe des sections ultrafines de 1µm (van de Bovenkamp et al., 2005). On y retrouve des hépatocytes, des cellules endothéliales, des cellules stellaires ainsi que toutes les cellules immunitaires résidentes du foie. Ceci permet d'évaluer de manière physiologique l'action de certaines molécules et du processus de fibrose. On peut ainsi avoir accès à toutes les cellules cibles et aux interactions cellulaires. Cependant, le coût des outils nécessaires à la réalisation de ces expériences, sans compter la rareté des échantillons, limite l'utilisation de cette élégante technique (Seki et al., 2007).

### **c. Les modèles in vitro.**

Le dernier type de modèle de fibrose hépatique est basé sur des lignées de CSHs humaines; ce modèle permet d'étudier uniquement les processus d'activation et de persistance de la fibrose hépatique. Il permet de valider des observations chez la souris et de tester l'effet direct de molécules sur les CSHs. À ce jour, il existe deux lignées libres de droits, que l'on peut se procurer gratuitement.

Tout d'abord, la première lignée de cellules stellaires humaines (LI 90) a été générée en 1995 par une équipe japonaise. Ils ont isolé des CSHs à partir du foie d'une patiente, et ont gardé ces cellules en culture pendant plusieurs passages (Murakami et al., 1995). Ils ont produit un stock important de cellules à chaque passage qu'ils ont congelé. Cependant, on ne peut parler de véritable lignée cellulaire, car elles ne sont pas immortalisées et cessent de proliférer après 25 passages environ. Néanmoins, ce modèle était le seul disponible jusqu'en 2005, et a permis de réaliser un certain nombre d'études permettant de mieux caractériser la fonction biologique de ce type cellulaire, notamment la capacité de répondre au TGF-β (Ueki et al., 1998).

En 2005, l'équipe du Dr Scott Friedman décida de générer une nouvelle lignée humaine de cellules stellaires hépatiques. Leur objectif était de générer une vraie lignée dans

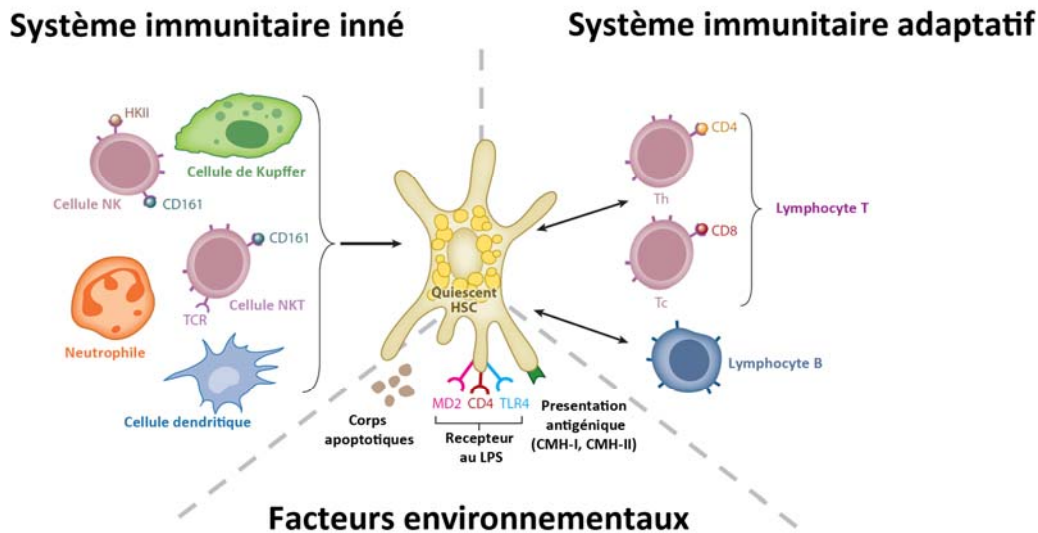
le sens où celle-ci serait immortalisée. Ils ont donc isolé des CSHs primaires qu'ils ont transfecté de manière stable avec l'antigène T du virus simien 40 (SV40). Après plusieurs passages, les cellules nommées LX1 ont été séparées en deux, une partie a continué la culture en présence de sérum de veau foetal (10 %) et l'autre moitié mise en culture en absence de sérum. Les cellules ayant survécu à ce traitement ont été nommées LX2 (Xu et al., 2005). Les avantages de ces cellules sont qu'elles prolifèrent bien, sont facilement transfectables, ont une homologie de plus de 98 % avec des cellules primaires et peuvent être gardées en culture avec peu de sérum ce qui représente un avantage économique. En seulement 7 ans, elles sont devenues le modèle *in vitro* le plus utilisé de l'étude de la fibrose hépatique.

#### **4. Modulation immunitaire de la fibrose hépatique.**

Le système immunitaire est capable de produire des cytokines agissant sur un large spectre de cellules dans notre organisme. Les cytokines sécrétées peuvent avoir des actions pro ou anti-inflammatoires, et par conséquent influencer de manière positive ou négative d'une maladie. Chaque population immunitaire est caractérisée par un phénotype, un spectre de sécrétion de cytokines et une fonction biologique donnée. Il est donc important de comprendre les mécanismes d'actions de chaque population, ainsi que de comprendre les conditions menant à leur développement. De nombreuses associations entre les cellules du système immunitaire et la fibrose hépatique ont été établies, mais de nombreux phénomènes restent à élucider. À ce jour, on sait qu'une relation à trois existe (Hernandez-Gea and Friedman, 2011), représentée dans la figure 5, entre les cellules stellaires, les cellules du système immunitaire inné (cellules de Kupffer, neutrophiles, monocytes, etc.) et adaptatif (lymphocytes T CD4+, CD8+, etc.) Dans cette partie, nous allons d'abord nous intéresser aux rôles des CSHs dans l'immunité, puis comment les cellules immunitaires innées influencent la fibrose hépatique et, enfin, aux fonctions des lymphocytes T dans ce même processus.

##### **a. Propriétés immunologiques des cellules stellaires hépatiques.**

Les cellules stellaires, en plus de leur rôle dans le métabolisme et de leur implication dans le processus de fibrose hépatique, possèdent des propriétés immunologiques. En effet, plusieurs groupes ont démontré que ces cellules possèdent des propriétés de cellules



**Figure 5. Interactions entre le système immunitaire et les cellules stellaires hépatiques.**

Les cellules stellaires hépatiques interagissent fortement avec le système immunitaire inné et adaptatif. Les cellules de Kupffer, neutrophiles et cellules NKT ont un rôle pro-fibrotique et agissent par la sécrétion de cytokines. Les cellules NK limitent la fibrose en induisant l'apoptose des CSHs. Les CSHs agissent aussi comme des cellules présentatrices d'antigènes et modulent donc la réponse adaptative. Enfin, les différentes populations de lymphocytes T CD4+ ou CD8+ peuvent moduler l'activation des cellules stellaires hépatiques. (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Réimprimé avec la permission de copyright clearance center.

présentatrices d'antigènes. Ceci est observé par l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilités (CMH-I, CMH-II), molécules de co-stimulation (CD80, CD86) ou co-inhibition (PD-L1, PD-L2) et par la production de cytokines et chimiokines comme l'IL-6, TGF- $\beta$  et RANTES (Ichikawa et al., 2011).

Ainsi, elles peuvent moduler l'activité des lymphocytes T en présentant des antigènes *via* les CMH mais aussi en présentant des molécules inhibitrices qui s'avèrent importantes lors des infections par les hépatites virales (Chinnadurai and Grakoui, 2010). De plus, elles sont capables de favoriser le recrutement et le développement de certaines populations immunitaires inflammatoires (Yang et al., 2009).

#### **b. Modulation par le système immunitaire inné.**

Les cellules immunitaires innées du foie comprennent majoritairement les cellules de Kupffer. Elles représentent 80-90% des macrophages résidents dans les tissus, ce qui suggère que le foie est un organe très important pour lutter contre les infections systémiques (Seki and Schnabl, 2012). Les KCs expriment de forts niveaux de *Pattern recognition Receptors* (PRRs) comme le TLR-4, TLR-3 impliqués respectivement dans la reconnaissance des liposaccharides et de l'ARN simple brin viral, ce qui leur permet d'agir comme de véritables sentinelles. Lors de leur activation, par le LPS par exemple, elles sont capables de produire un nombre de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL- $\beta$  et l'IL-6 (Seki et al., 2007). Ces cytokines induisent de l'activation des CSHs et la production de composants de la matrice extracellulaire. Lors des hépatites, les hépatocytes sécrètent de grandes quantités d'IL-8 menant au recrutement des macrophages périphériques dans le foie, ce qui va exacerber le phénomène (Zimmermann et al., 2011). De plus, les chimiokines produites par les KCs permettent le recrutement d'autres cellules immunitaires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes, etc.), dont le potentiel à sécréter des molécules pro-fibrotiques est amplifié par celles produites par les macrophages. Cependant, elles peuvent aussi produire des cytokines anti-inflammatoires/anti-fibrotiques comme l'IL-10 et pro-fibrotique comme le TGF- $\beta$ . L'IL-10 a une action anti-fibrotique, car elle peut limiter la réponse des CSHs à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-4 et l'IL-13 en diminuant l'expression des récepteurs à la surface

membranaire (Barron and Wynn, 2011) et en augmentant la sécrétion du pseudo récepteur de l'IL-13Ralpha2 (Mentink-Kane et al., 2011). De plus, l'IL-10 induit aussi l'apoptose des cellules stellaires actives (Zhang et al., 2006). Cette double capacité à produire des signaux pro ou anti-inflammatoires peut être contrôlée par les différentes populations de lymphocytes de type «Helper» (ces interactions seront décrites en détail plus bas).

Les cellules NK pour « natural killer » sont une population cellulaire importante dans le contrôle de la fibrose hépatique. Elles sont enrichies dans le foie représentant de 30 % à 50 % des lymphocytes intrahépatiques contre 5-15% des lymphocytes du sang périphériques (Doherty and O'Farrelly, 2000). Ces cellules sont identifiées comme CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, puis divisées en deux sous populations selon l'intensité d'expression du CD56. On parle ainsi de cellules CD56 « bright » et CD56 « dim » respectivement en cours de maturation et pleinement différenciées. Ces deux populations sont capables d'avoir une activité cytotoxique et possèdent la capacité de sécréter des cytokines comme le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  (De Maria et al., 2011; Fauriat et al., 2010). Elles jouent ainsi un rôle important dans le contrôle des infections virales, notamment les hépatites virales C et B, et dans la surveillance antitumorale (Zhang and Friedman, 2012). Dans le contexte de la fibrose, l'activité cytotoxique des NKs sur les hépatocytes provoque de l'inflammation et la libération de signaux activant les cellules stellaires. Cependant, elles possèdent des propriétés anti-fibrotiques, qui sont attribuées à la sécrétion de cytokines et à leur activité cytotoxique. Premièrement, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  agit sur les CSHs *via* son récepteur et induit la phosphorylation de STAT-1. STAT-1 est un facteur de transcription nécessitant d'être phosphorylé pour être relocalisé au noyau. Dès lors, il agit comme un répresseur du promoteur du collagène de type I et limite la transmission du signal du TGF- $\beta$  en induisant SMAD-7 (Baroni et al., 1996; Inagaki and Okazaki, 2007; Jeong et al., 2006). Ceci limite alors l'activation et la prolifération des cellules stellaires, mais aussi leur capacité à produire de la matrice extracellulaire pathogène. De plus, une nouvelle population de NK exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et capable de produire de l'IL-22, une cytokine de type Th17 de la famille de l'IL-10, a été découverte (Colonna, 2009). Ces cellules sont nommées NK-22, elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'inflammation dans les maladies intestinales, et pourraient limiter l'inflammation hépatique par les propriétés hépato-protectives de l'IL-22 (Zenewicz et al., 2007). Néanmoins, les NK-22 sécrètent aussi



une grande quantité de TNF- $\alpha$  qui peut rendre l'IL-22 pathologique. De récentes études ont d'ailleurs associé les NK-22 à la progression et à la pathogenèse de l'arthrite rhumatoïde (Ren et al., 2011). Enfin, les propriétés cytotoxiques des cellules NK contrôlent le nombre et la prolifération des CSHs actives. Elles induisent l'apoptose par une interaction cellule/cellule et la sécrétion de granzyme B/perforine (Melhem et al., 2006). Cependant, cette activité est souvent limitée lors des stades avancés de fibrose, car la production massive de TIMPs limite la circulation des NKs dans la matrice cellulaire. Le déplacement des NKs est dépendant de la sécrétion de MMPs qui permet de se frayer un chemin jusqu'à la cellule cible. Or, l'activité des MMPs est bloquée, ce qui, par extension, emprisonne les cellules et diminue leur fonction anti-fibrotique et anti-tumorale (Zhang and Friedman, 2012).

Les cellules NKT sont aussi enrichies dans le foie et leur contribution positive ou négative à la progression de la fibrose hépatique est très controversée (Swain, 2008). Ces cellules ont un phénotype intermédiaire entre les cellules NK et les lymphocytes T, car elles expriment à la surface cellulaire le CD56 ainsi que des molécules du *T-cell receptor* (TCR) (Santodomingo-Garzon and Swain, 2011). Ce TCR peut être variable, ou bien reconnaître toujours la même glycoprotéine et est donc qualifié d'invariable. On retrouve ces cellules dans les espaces sinusoidaux ce qui suppose une fonction de surveillance immunitaire. Elles sont capables de produire des cytokines de types Th1 anti-fibrotiques comme l'IFN- $\gamma$ , ou bien Th2 pro-fibrotiques, comme l'IL-4 et l'IL-13 (Kronenberg, 2005). Ainsi, dans les modèles murins d'induction de fibrose par le CCL<sub>4</sub> ou la Con-A, les NKT sont décrites comme anti-fibrotiques (Park et al., 2009), tandis que chez l'homme, l'accumulation des NKT est associée à la progression de la fibrose hépatique dans plusieurs pathologies hépatiques virales ou non (Harada et al., 2003; Syn et al., 2010).

Pour finir, les cellules infiltrantes, comme les neutrophiles et les monocytes, sont fortement enrichies dans le foie lors des hépatites du fait que de nombreux ligands des récepteurs aux chimiokines, comme l'IL-8, sont sécrétés lors de l'inflammation. Les neutrophiles et les monocytes vont ensuite contribuer eux-mêmes à l'inflammation et à la progression de la fibrose hépatique principalement par la sécrétion d'IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ .

### **c. Modulation par le système immunitaire adaptatif.**

Le système immunitaire adaptatif représente un ensemble de cellules spécifiques à des antigènes. Il se compose des lymphocytes T, répartis entre les T-CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et les T-CD4<sup>+</sup> dits « *Helper* », et les lymphocytes B produisant des anticorps. On sait depuis longtemps que les lymphocytes T et B sont impliqués dans diverses pathologies inflammatoires qu'elles soient auto-immunes ou bien d'origine virale. La progression de la fibrose hépatique est reliée à des mécanismes immunitaires, et de nombreuses populations lymphocytaires ont été impliquées dans ce processus biologique. Les mécanismes d'actions comprennent la phagocytose des lymphocytes par les CSHs (Muhanna et al., 2008), et la sécrétion de cytokines agissant de manière directe ou indirecte sur les CSHs (Barron and Wynn, 2011). De plus, le ratio de lymphocytes T-CD4<sup>+</sup>/lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> est inversé dans le foie par rapport au sang périphérique. La diminution de ce ratio hépatique est reliée à la progression de la fibrose chez les individus atteints d'hépatites virales (Muhanna et al., 2008). Ces travaux indiquent que les T-CD8<sup>+</sup> seraient liés à la progression de la fibrose hépatique, alors que certaines populations de T-CD4<sup>+</sup> ont des propriétés anti-fibrotiques.

Les lymphocytes B se caractérisent par leur habilité à sécréter des anticorps, des cytokines et par la capacité d'agir comme cellules présentatrices d'antigènes. Ils sont impliqués dans diverses pathologies inflammatoires, et influencent la progression de la fibrose hépatique. En effet, une étude utilisant diverses souris KO démontre qu'ils favorisent la déposition de collagène suite à une hépatite par des mécanismes indépendants de la sécrétion d'anticorps et de leurs interactions avec d'autres cellulaires immunitaires, comme les neutrophiles, les cellules NKT et lymphocytes T (Novobrantseva et al., 2005). Ils influencent donc ce processus par le type de sécrétion de cytokines qui est de type Th2 (Harris et al., 2000), dont les effets sont décrits plus bas. Ces cytokines sont inflammatoires et activent différentes populations cellulaires, dont les cellules stellaires hépatiques.

Les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> classiques Tc1 contribuent à générer de l'inflammation en éliminant les hépatocytes infectés. Ceci entraîne la libération de cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et IL-1 $\beta$ , et de corps apoptotiques qui vont entraîner l'activation persistante des CSHs. De plus, les lymphocytes cytotoxiques expriment de forts niveaux de MMPs. Ceci leur

permettrait entre autres de pénétrer de l'espace vasculaire vers le parenchyme tissulaire (Sitia et al., 2004). De plus, ces MMPs aurait un rôle à jouer dans l'activation de chimiokines induites par l'IFN- $\gamma$ , comme CXCL9 et (Van den Steen et al., 2003a; Van Den Steen et al., 2003b). Ces chimiokines permettent le recrutement des neutrophiles, qui ont un rôle profibrotique de par leur profil cytokinique et leur habilité à recruter les macrophages, monocytes et les cellules NKT circulants (Ando et al., 1994). Cependant, les cellules cytotoxiques produisent de l'IFN- $\gamma$  qui, comme décrit plus haut, peut limiter l'activation des CSHs.

Enfin, des études récentes ont démontré qu'une sous-population de T-CD8<sup>+</sup> avait un phénotype de type Th17 (décrit plus bas). Ces cellules sont nommées Tc17 : elles possèdent une activité cytotoxique et sécrètent de forts niveaux d'IFN- $\gamma$  et de cytokines associées aux Th17 comme l'IL-17A, IL-17F et IL-21. On peut les identifier selon le phénotype suivant CD161<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup>CD26<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (Bengsch et al., 2012). Leur fréquence en périphérie est faible, mais elles sont enrichies dans les organes comme l'intestin, le foie et la peau (Foster et al., 2012). La fonction biologique des lymphocytes Tc17 n'est pas claire; ils ont été impliqués dans le contrôle de l'infection par le VIH (Gaardbo et al., 2012; Guillot-Delost et al., 2012; Nigam et al., 2011). On suppose que ces cellules sont extrêmement inflammatoires de par leur profil de sécrétion. Elles sont fortement enrichies dans les lésions cutanées lors du psoriasis, et sont recrutées très rapidement aux sites inflammatoires (Res et al., 2010; Zhao et al., 2009). Dans le foie, des études ont démontré que ces cellules sont enrichies dans les carcinomes hépatocellulaires et que le milieu tumoral induit leur développement *via* les monocytes (Kuang et al., 2010). Dans les années futures, cette population va devenir un centre majeur d'intérêt en immunologie.

Les lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> vont aider les autres cellules immunitaires (T helper), notamment les T-CD8<sup>+</sup>, à éliminer les infections par la sécrétion de cytokines et chimiokines. Par exemple, dans le contexte de l'infection par le virus de l'hépatite C, des études chez le chimpanzé ont démontré que la réponse CD8<sup>+</sup> est importante pour contrôler l'infection (Shoukry et al., 2003). Cependant, l'absence de CD4<sup>+</sup>, induite par l'utilisation d'anticorps neutralisants, limite l'action de protection des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> (Grakoui et al., 2003). Il

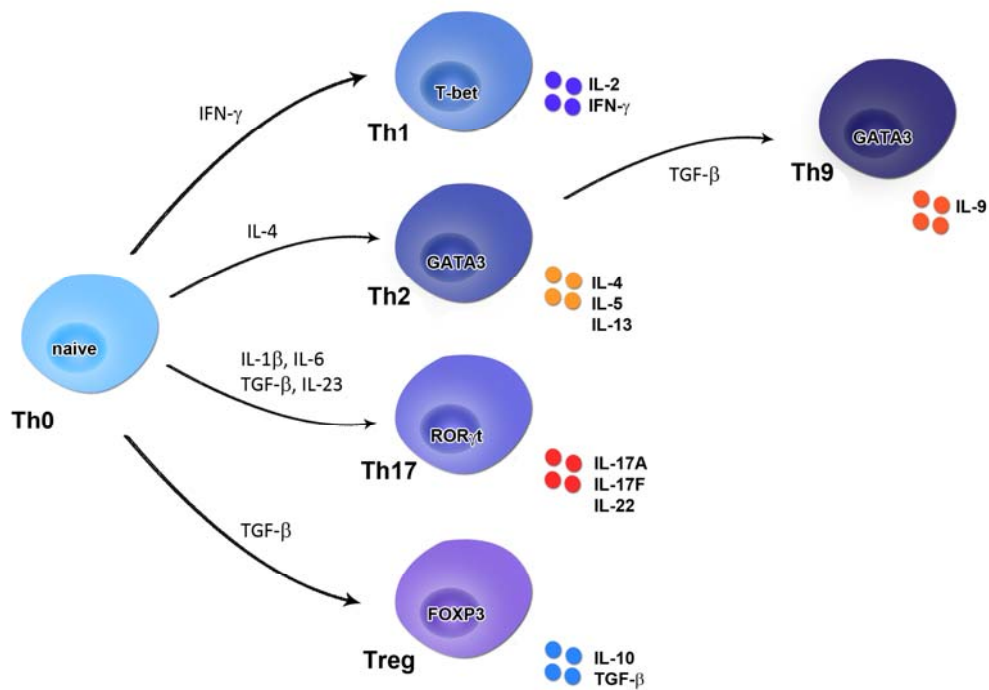
existe plusieurs sous-populations de T-CD4<sup>+</sup> qui possèdent des fonctions immunitaires différentes et se développent selon des conditions de polarisation distinctes (figure 6).

Tout d'abord, les Th1 jouent un rôle dans l'élimination des infections intracellulaires. Ils se développent en répondant à l'IFN- $\gamma$ , expriment un fort niveau du facteur de transcription T-bet. Ce facteur de transcription est caractéristique du profil Th1. Les Th1 sont une source majeure de cytokines comme l'IL-2, une cytokine importante pour la survie et l'expansion lymphocytaire, et d'IFN- $\gamma$  qui dispose de propriétés inflammatoires et fibrolytiques. De plus, une étude chez la souris démontre que, lors des hépatites, le profil Th1 est fortement inflammatoire et induit le recrutement de neutrophiles et macrophages. Ceci induit de forts dommages hépatiques sévères, mais aucune déposition de composants de la matrice cellulaire n'est observée (Hoffmann et al., 2001).

Les lymphocytes Th2 permettent de lutter contre les pathogènes extracellulaires. L'IL-4 est nécessaire à leur développement, et ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription GATA3. Ces cellules influencent la réponse fibrotique en agissant de manière directe sur l'activation des cellules stellaires ou indirectement en modulant l'activité profibrotique des cellules du système immunitaire inné comme les neutrophiles, macrophages et monocytes (Barron and Wynn, 2011). Les Th2 sont une source majeure d'IL-4, d'IL-13, et produisent aussi du TGF- $\beta$ . Ces cytokines agissent directement sur les CSHs, et aident au maintien du phénotype de myofibroblaste, à la production de collagène et à la sécrétion des MMPs et des TIMPs qui sont importantes dans la progression de la fibrose hépatique (Chiaromonte et al., 1999; Weng et al., 2009). De plus, l'IL-4 et l'IL-13 agissent directement sur l'activation des cellules de Kupffer, qui vont amplifier le processus fibrotique en sécrétant du PDGF et du TGF- $\beta$ , les deux signaux fibrotique majeurs. De plus, les macrophages produisent en réponse à l'IL-4 et IL-13 des cytokines (IL-1 $\beta$ ) et des chimiokines (IL-8, MCP-1) impliquées dans l'activation et le recrutement des monocytes et neutrophiles profibrotiques. Ces observations confirment le rôle de pivot dans la balance du processus de fibrose des macrophages qui, en fonction des signaux perçus, vont amplifier ou limiter le phénomène.

Les lymphocytes Th9 se différencient sous les mêmes conditions que les Th2, mais ils requièrent le TGF- $\beta$  pour finaliser leur phénotype. Ils expriment le facteur de transcription GATA3, mais aussi un fort niveau d'IRF4. Ils secrètent majoritairement de l'IL-9, une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans un nombre important de maladies inflammatoires comme la sclérose en plaques, l'arthrite, les allergies, l'inflammation pulmonaire et les colites (Jabeen and Kaplan, 2012). L'IL-9 peut aussi favoriser le développement et le recrutement au site d'inflammation des Th17, une sous-population inflammatoire et souvent pathogénique (Elyaman et al., 2012; Zhou et al., 2011). De plus, ils produisent les cytokines classiques des Th2. On peut donc supposer que ces cellules pourraient jouer un rôle important dans la progression de la fibrose hépatique, mais aucune étude n'a encore évalué leur fonction dans le foie.

Les cellules T régulatrices sont une composante importante du système immunitaire. Ces lymphocytes contrôlent la réponse immunitaire et limitent ainsi que celle-ci soit trop importante et devienne pathogénique. Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FOXP3, une forte expression à la surface cellulaire du CD25, le récepteur de l'IL-2, et une faible expression membranaire du CD127, le récepteur de l'IL-7 (Chen et al., 2003). Ils peuvent limiter l'action des lymphocytes par des interactions de type contact cellule/cellule, la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10, ou par la sécrétion de galactine-9, le ligand de la molécule d'épuisement Tim-3 (Elahi et al., 2012; Shevach, 2011). Pendant une hépatite il a été observé une expansion des cellules T régulatrices, et leur fréquence corrèle avec le niveau d'inflammation hépatique (Speletas et al., 2011). De plus, l'infection par le VHC induit les chimiokines, CCL17 et CCL22, nécessaires au recrutement des Tregs (Riezu-Boj et al., 2011). Ces cellules anti-inflammatoires limitent la progression de la fibrose hépatique en diminuant l'activation des lymphocytes, *via* la galactine-9 (Lv et al., 2012) mais aussi par l'action de l'IL-10.



**Figure 6. Mécanismes de différenciation et de sécrétion des sous-populations de lymphocytes T-CD4+.**

Les lymphocytes T-CD4+ naïfs ont la capacité de se différencier en différentes sous-populations de cellules T helper. Les Th1 sont induits par l'IFN- $\gamma$ , expriment le facteur de transcription T-bet et secrètent l'IL-2 et l'IFN- $\gamma$ . Les Th2 sont induits par l'IL-4, expriment le facteur de transcription GATA3 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Ils peuvent ensuite évoluer en Th9 sous l'influence du TGF- $\beta$ . La différenciation en Th17 requiert l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, IL-23 et le TGF- $\beta$  : ces cellules expriment le facteur de transcription ROR $\gamma$ t et secrètent principalement de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Enfin les lymphocytes T régulateurs sont induits par le TGF- $\beta$ , expriment le facteur de transcription FOXP3 et secrètent les cytokines immunomodulatrices IL-10 et TGF- $\beta$ .

En effet, l'IL-10 peut agir directement sur les CSHs comme décrit précédemment, en limitant l'action de l'IL-4 et de l'IL-13 et par l'induction de l'apoptose des CSHs actives. De plus, l'IL-10 agit sur les macrophages pour induire un phénotype anti-inflammatoire. Ceci se traduit par l'arrêt de la sécrétion des chimiokines qui recrutent les neutrophiles, les monocytes

et les lymphocytes. Les macrophages vont aussi cesser de sécréter les signaux majeurs de fibrose, comme le TGF- $\beta$  et le PDGF, et s'orienter vers la sécrétion d'IL-10 amplifiant ainsi le processus anti-fibrotique (Barron and Wynn, 2011). Enfin, l'IL-10 limite l'activité des populations de cellules T « helper » inflammatoires comme les Th2 et les Th17 (Huber et al., 2011).

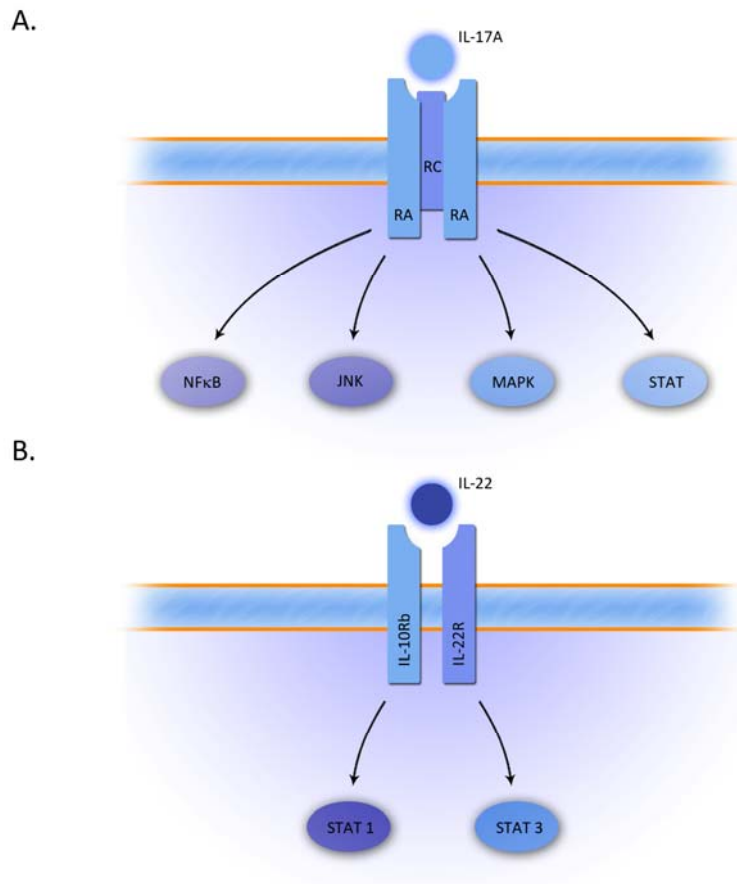
Les cellules « helper » Th17 jouent un rôle important dans l'immunité des muqueuses et dans l'élimination des infections aux champignons. Ces lymphocytes nécessitent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IL-23 en combinaison avec du TGF- $\beta$  pour se développer (Korn et al., 2007). L'IL-23 n'est pas nécessaire pour leur développement, mais permet de maintenir le phénotype des Th17, ainsi que la production d'IL-22 (Bettelli et al., 2008). En plus de l'IL-22, les Th17 produisent un nombre important de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-17A et l'IL-17F. Cette population de lymphocytes peut être identifiée par le phénotype suivant : CD161+CCR6+CD26+CD4+ (Bensch et al., 2012). Ils sont enrichis dans le foie par rapport au sang périphérique et les Th17 hépatiques sont plus aptes à produire l'IL-17 en combinaison avec l'IL-22 (Foster et al., 2012). Le CD26 est une peptidase dipeptidique, capable de cliver CXCL10 (IP-10), une chimiokine impliquée dans le recrutement des monocytes, neutrophiles et lymphocytes inflammatoires (Casrouge et al., 2011; Tacke et al., 2011). De plus, de nombreuses études ont démontré que les Th17, *via* les cytokines qu'ils sécrètent, amplifient le processus inflammatoire initié dans différentes pathologies comme l'arthrite, la colite et la sclérose en plaques. Des observations chez les patients atteints par le virus de l'hépatite B ou souffrants d'hépatite alcoolique ont corrélé positivement la fréquence des cellules produisant l'IL-17 avec la progression de la fibrose hépatique (Lemmers et al., 2009; Zhang et al., 2010).

La famille de l'interleukine 17, composée de l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E et l'IL-17F, semble donc être impliquée dans la progression de la fibrose. Les Th17 produisent uniquement l'IL-17A ou l'IL-17F dont les fonctions biologiques sont similaires; cependant l'IL-17F pourrait avoir un effet plus puissant. Les autres membres de la famille sont quant à eux sécrétés par les cellules épithéliales et leurs fonctions biologiques sont moins bien caractérisées. L'IL-17A et l'IL-17F agissent *via* un récepteur hétérodimérique exprimé par les

cellules épithéliales, les macrophages et les autres cellules du système immunitaire inné. Ils se composent de deux chaînes IL-17RA et de la chaîne commune à la famille l'IL-17RC (Gaffen, 2009), comme le démontre la figure 7A. Le signal est transmis par l'activation de plusieurs facteurs intracellulaires comme NFκB, JNK, MAK et STAT (Zepp et al., 2011), qui sont associés à la progression de la fibrose (Kluwe et al., 2010; Luedde and Schwabe, 2011; Meng et al., 2012). L'IL-17A peut agir sur un certain nombre de cellules dans le foie comme les hépatocytes, les cellules du système immunitaire et les cellules stellaires. Il a été démontré que les hépatocytes répondant à l'IL-17A produisent des chimiokines importantes dans le recrutement des neutrophiles pro-fibrotiques (Sparna et al., 2010). L'IL-17A agit aussi sur les cellules stellaires hépatiques et induit aussi la sécrétion de chimiokines comme l'IL-8 et GRO-α lié au recrutement des neutrophiles et des monocytes inflammatoires (Lemmers et al., 2009). Enfin, l'IL-17A active la sécrétion d'IL-6 par les cellules recrutées par les hépatocytes et les CSHs, amplifiant ainsi le processus fibrotique (Zhao et al., 2011). Jusqu'à récemment aucune étude n'avait démontré un rôle pro-fibrotique direct pour l'IL-17A. En 2012, un groupe a démontré sur un modèle murin d'hépatite que l'IL-17A peut induire l'activation des CSHs par un mécanisme dépendant de STAT3 (Meng et al., 2012).

L'interleukine 22 appartient à la grande famille de l'IL-10, avec des cytokines comme l'IL-26. Cette cytokine agit sur un récepteur hétéromérique composé de la chaîne commune à la famille de l'IL-10Rb et la chaîne spécifique de l'IL-22 (Kotenko et al., 2001), comme le démontre la figure 7B. Ce récepteur est principalement présent sur les cellules épithéliales ce qui suppose que cette cytokine est immunomodulatrice et anti-inflammatoire (Sanjabi et al., 2009). La signalisation intracellulaire est induite par la voie JAK/STAT. En fonction de la phosphorylation de STAT1 ou STAT3, l'IL-22 peut avoir différents rôles. De plus, les fonctions biologiques de cette cytokine sont extrêmement controversées, car en fonction de la pathologie et de la combinaison de cytokines avec laquelle elle agit, l'IL-22 peut être pro- ou anti-inflammatoire (Zenewicz and Flavell, 2011). Ce changement de fonction est influencé par les cytokines co-sécrétées, comme le TNF-α et l'IL-17A. Ce point a été démontré dans une étude chez la souris sur l'inflammation pulmonaire où l'IL-22 seule induisait un phénotype anti-inflammatoire, mais en combinaison avec de l'IL-17A elle pouvait amplifier le processus inflammatoire et la pathologie associée (Sonnenberg et al., 2010). L'IL-22 protège des





**Figure 7. Représentation du récepteur et des voies de signalisation cellulaire des cytokines de type Th17.**

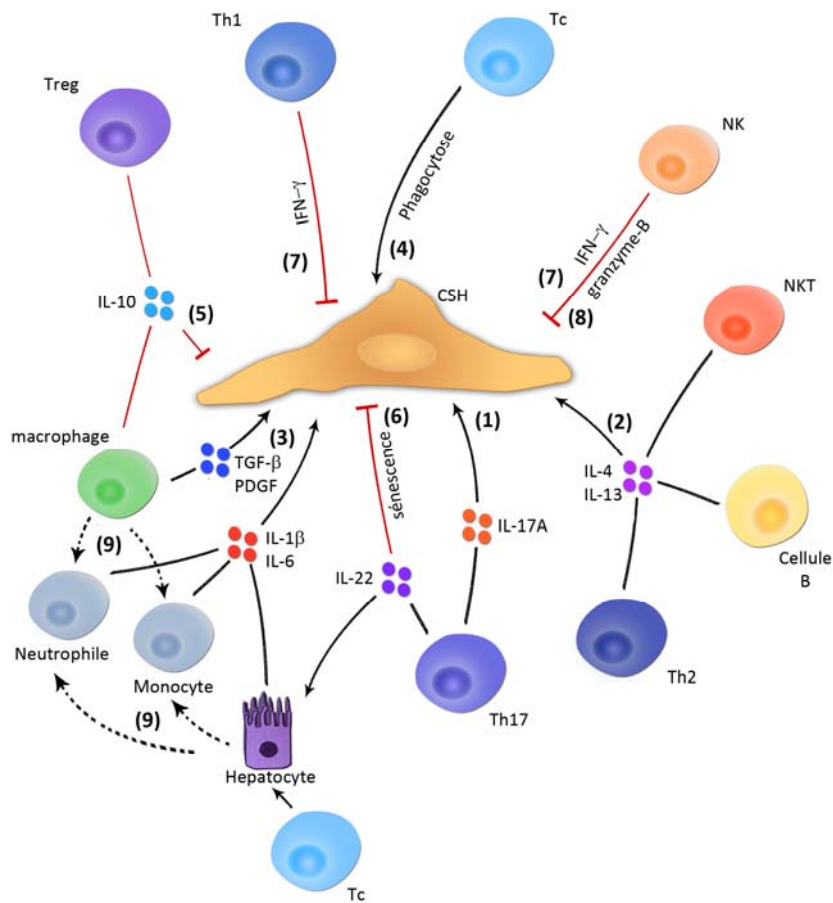
L'IL-17A et IL-17F signalent *via* un récepteur hétérodimérique composé de deux chaînes d'IL-17RA et une chaîne d'IL-17RC pouvant activer les voies de signalisation NFκB, JNK, MAPK et JAK/STAT (A). L'IL-22 agit par un récepteur hétérodimérique composé de la chaîne commune à la famille de l'IL-10, l'IL-10Rb et la chaîne de spécifique de l'IL-22, l'IL-22R (B). Cette cytokine active la voie JAK/STAT et plus précisément STAT1 ou STAT3.

maladies inflammatoires intestinales et des hépatites aiguës par l'activation de STAT3 (Zenewicz et al., 2007; Zenewicz et al., 2008).

Ce dernier est un facteur de transcription qui permet l'expression de facteurs de survie cellulaire, comme des molécules anti-apoptotiques (Radaeva et al., 2004). Lors des hépatites aiguës, la survie des hépatocytes permet de limiter l'inflammation et par extension la fibrose hépatique. Néanmoins, l'activation sur le long terme de STAT3 peut induire des pathologies graves comme le carcinome hépatocellulaire (Jiang et al., 2011). De plus, il a été établi que dans les maladies intestinales chroniques, l'activité de l'IL-22 doit être modulée par la sécrétion de l'IL-22BP (pour *IL-22 binding protein*), au risque d'induire la formation de tissu cicatriciel et de cancer (Huber et al., 2012).

Cependant, l'activation de STAT3 dans les cellules stellaires hépatiques pourrait entraîner un phénotype pro-fibrotique, car l'IL-6, une cytokine associée à la progression de la fibrose, agit par ce facteur de transcription. En 2012, une équipe a démontré que la surexpression d'IL-22, par un vecteur adénoviral, limite la fibrose hépatique en induisant la sénescence des CSHs dans un modèle murin de fibrose hépatique (Kong et al., 2012). Ce phénotype se ferait par l'activation de STAT3 induisant le *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) un facteur de sénescence. Mais ce point reste à être validé chez l'homme et dans un contexte physiologique.

La modulation de la fibrose par le système immunitaire est complexe et résulte de la balance de cytokines produites par les différentes populations innées comme adaptatives. Il existe de nombreux effets synergiques visant à augmenter la réponse fibrotique ou bien à l'atténuer. Certaines cellules comme les macrophages jouent un rôle de pivot dans ce processus. La figure 8 résume les interactions connues entre les CSHs et le système immunitaire qui sont décrites dans ce chapitre.



**Figure 8. Modulation de la fibrose par les cellules du système immunitaire : une balance complexe de cytokines.**

Ce schéma est représentatif des données de la littérature : les cellules stellaires au centre reçoivent des signaux des différentes populations. Les flèches noires représentent les signaux activateurs comme l'IL-17A des Th17 (1), l'IL-4, l'IL-13 des Th2, des lymphocytes B et des NKT (2), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, le TGF- $\beta$  et le PDGF des monocytes, des neutrophiles et des macrophages (3) et la phagocytose des lymphocytes cytotoxiques (4). Les signaux inhibiteurs sont en rouge : ils sont transmis par les cytokines IL-10 des macrophages et Tregs (5), l'IL-22 des Th17 (6), l'IFN- $\gamma$  des Th1 et des NK (7), et par l'activité cytotoxique des NK (8). Enfin, les flèches en pointillés indiquent les capacités de recrutement des neutrophiles et monocytes par les hépatocytes et les macrophages via la sécrétion de chimiokines (9).

## **Hypothèse et objectifs**

### **Hypothèse.**

Les données de la littérature montrent que le système immunitaire joue un rôle important dans la progression des maladies inflammatoires chroniques et dans le processus de fibrose. La fonction biologique des populations les plus classiques est bien caractérisée, mais l'action des populations récemment identifiées, comme les Th17 et les Tregs, ainsi que les cytokines qu'elles sécrètent reste relativement floue. La majorité des études ont établi des corrélations entre la fréquence des Th17 hépatiques et la progression de la fibrose chez l'homme. D'autres études ont associé le niveau plasmatique d'IL-10 dans le sérum à une progression lente de la fibrose hépatique. Une étude récente a essayé de déterminer les différences immunologiques entre les individus ayant une progression rapide ou lente de la fibrose. Les résultats démontrent qu'aucune différence significative dans les profils de sécrétion Th1 et Th2 n'est observable (Li et al., 2012b). Ceci laisse supposer que les Th17 et Treg seraient plus puissants pour prédire la progression de la fibrose hépatique. De plus, les études sur la fonction des cytokines de types Treg et Th17 chez la souris démontrent clairement qu'elles sont capables d'agir sur les CSHs. Mais les fonctions fibrotiques de l'IL-17A et l'IL-22 chez l'homme n'ont pas encore été démontrées. On a donc émis l'hypothèse selon laquelle l'interleukine-17A induit un phénotype fibrotique sur les cellules stellaires, tandis que l'IL-22 limite l'activation des CSHs par des mécanismes similaires à l'IL-10.

### **Objectifs.**

Nos objectifs sont dans un premier temps d'optimiser un modèle *in vitro* d'activation des cellules stellaires hépatiques humaines basé sur l'expression et la production de molécules fibrotiques, puis de valider la fonction pro-fibrotique ou anti-fibrotique de l'IL-17A et de l'IL-22 respectivement *via* notre modèle.

# Matériels et méthodes

## Anticorps

Pour les expériences de cytométrie en flux, ces anticorps conjugués directement ont été utilisés pour le marquage de surface : TGF- $\beta$  RII-PE (polyclonal) (R&D Systems, Minneapolis, MN), IL-10 R $\beta$ -Alexa Fluor®488 (clone 90220) (R&D Systems) et CD217 (IL-17 RA)-APC (clone 424LTS) (eBioscience, San Diego, CA). De plus, les anticorps suivants ont été utilisés pour l'immunobuvardage : TIMP-1 (clone SPM355) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), MMP-2 (clone 8B4) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.),  $\alpha$ -SMA (clone 1A4) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) et GAPDH (clone 6C5) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

## Matériels et conditions de culture

Les manipulations de culture cellulaire et celles nécessitant des conditions stériles ont été effectuées sous des hottes à flux laminaire vertical dans un laboratoire de Niveau de confinement 2 (NC-2) (Lignes directrices en matière de biosécurité en laboratoire, 3<sup>ième</sup> édition, 2004). Pour les manipulations des cellules, le matériel plastique utilisé est stérile et à usage unique et la verrerie est stérilisée pendant 90 minutes à 180°C à l'autoclave.

## Culture cellulaire.

La lignée de cellules stellaires humaines LX2, nous a été gracieusement fournie par le Dr Scott Friedman. Les cellules ont été mises en culture dans un milieu Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) (Wisent Inc, St-Bruno, QC) contenant 4.5 g/L de glucose et sans pyruvate de sodium. Le milieu est supplémenté à 10% final en sérum de veau fœtal (SVF) (HyClone, Nepean, ON) avec du GlutaMAX<sup>TM</sup> (Life Technologies, Burlington, ON). Le milieu a été change tous les deux jours et la trypsine 0.05 % EDTA (Life Technologies, Burlington, ON) est utilisée pour remettre les cellules en suspension lorsque la confluence atteint 80 % à un ratio 1:3. Pour les expériences de PCR quantitative, d'immunobuvardage et de cytométrie en flux,  $2 \cdot 10^4$  cellules LX2 par puits de plaque 48 puits,  $2 \cdot 10^5$  cellules LX2 par puits de plaque de

6 puits et  $1.10^5$  cellules LX2 par puits de plaque de 12 puits respectivement furent mises en culture jusqu'à une confluence de 70 %. Dès lors, le milieu est remplacé par un milieu dépourvu de SVF pour 48 heures puis les cellules sont stimulées par l'ajout de cytokines pour un autre cycle de 48 heures toujours en absence de SVF.

### **Cytokines et réactifs.**

L'interleukine 17A recombinante humaine, l'interleukine 22 recombinante humaine et le TGF- $\beta$  recombinant humain ont été obtenus de la compagnie R&D Systems Inc, (Minneapolis, MN). Le TNF- $\alpha$  recombinant humain a été obtenu de PeproTech (Rocky Hill, NJ). Toutes ces cytokines ont été utilisées selon les conditions établies par le fabricant.

### **PCR quantitative.**

Après stimulation, l'ARNm des cellules LX2 fut obtenu en utilisant le *Realtime Ready Cell Lysis kit* (Roche, Laval, QC) dans un volume total de 40 $\mu$ L. Ce kit permet la purification d'ARNm en seulement 5 minutes avec une sensibilité allant jusqu'à trois cellules. Les brins d'ADNc furent générés *via* le *Transcriptor Universal cDNA Master kit* (Roche) à partir de 6 $\mu$ L d'ARNm dans un volume total de 20 $\mu$ L puis dilués à un ratio 1:5 avec de l'eau ultrapure (Roche). L'expression relative des gènes pro-fibrotiques ACTA2 (codant pour l' $\alpha$ -SMA), COL1A1 et TIMP-I fut mesurée et normalisée sur l'ARN ribosomal du 28S à l'aide du LightCycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I Master par un LightCycler<sup>®</sup> 480 (Roche). La technique de quantification relative avancée de Roche fut utilisée, selon la formule :  $\text{efficacité}_{\text{gène cible}}^{-\Delta C_p} / \text{efficacité}_{\text{gène référence}}^{-\Delta C_p}$ . Le Tableau 1 fournit les informations sur les amorces utilisées qui ont été générées avec l'outil Primerblast du NCBI.

### **Gel d'électrophorèse.**

Les produits de PCR sont analysés sur un gel d'électrophorèse contenant 1% d'agarose ultra-pure (Life Technologies), 1% de Sybr safe (Life Technologies) un colorant de l'ADN et une échelle 100 paires de bases (Life Technologies).

### **Clonage.**

Les standards de PCR quantitative ont été cloné dans un vecteur TOPO-TA (Life Technologies) selon les conditions d'utilisations du fabricant. La validité du clonage a été vérifiée par digestion du vecteur pendant une heure avec l'enzyme de digestion EcoRI (Life Technologies). Le produit de digestion est ensuite analysé sur un gel d'électrophorèse.

### **Immunobuvardage.**

Après stimulation, les protéines totales des cellules LX2 furent obtenues par lyse avec tampon RIPA (NaCl, Nonidet N-40 (NP40), Dodécylsulfate de sodium (SDS), tampon Tris-HCL pH=8) avec Phospho-stop (Roche) et Complete Mini EDTA-Free (Roche). Afin d'éliminer les débris cellulaires, les échantillons sont centrifugés à 10000rpm à 4 degrés Celsius pendant 15 min et les surnageants sont par la suite récupérés. Pour la détection d' $\alpha$ -SMA, MMP-2 et TIMP-I, 20 $\mu$ g de protéines totales, quantifiées par la méthode de Bradford, furent chargées sur un gel de polyacrylamide à 20 %, puis transférées pendant la nuit sur une membrane de nitrocellulose. Les membranes furent bloquées pendant une heure avec du lait à 10 %, avant d'être incubées à 4 degrés Celsius pendant la nuit. Ensuite, les membranes furent rincées 5 fois pendant 5 minutes avec un tampon phosphate salin (Phosphate-buffered saline, PBS) avec du tween 0.1 %, et incubées une heure avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort HRP (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). La révélation fut effectuée en utilisant le kit ECL<sup>TM</sup> Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Les résultats sont normalisés sur l'expression du GAPDH.

### **Coloration à l'aide du rouge de picro Sirius.**

La production de collagène de type I fut évaluée par coloration au rouge de picro Sirius. Brièvement,  $5 \cdot 10^5$  cellules LX2 furent mises en culture sur une lame de 8 chambres (BD Biosciences, San José, CA); à 70 % de confluence, le milieu est remplacé par du milieu sans SVF pendant 48 heures avant d'être stimulé par l'ajout de cytokines pour 48 heures supplémentaires. Après stimulation, les cellules LX2 sont fixées dans un bain d'acétone à -20 degrés Celsius pendant 15 minutes. Ensuite, les lames sont incubées pour 1 heure dans une solution 1X de rouge de picro Sirius (Sigma-Aldrich), puis lavées 2 fois 5 minutes dans de

l'acide acétique 0.5%; puis les lames sont montées avec le milieu de montage de Sigma-Aldrich, (St-Louis, MO). Les photographies des lames sont ensuite obtenues à l'aide d'un microscope, puis la quantification de la coloration sur 3 différents clichés par conditions de stimulation est réalisée *via* Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA). Puis, le ratio d'induction de la coloration rouge est calculé selon la formule : intensité de rouge<sub>cellules non-traitées</sub> / intensité de rouge<sub>cellules traitées</sub>.

### **Cytométrie en flux.**

Après stimulation avec différentes cytokines, les cellules LX2 sont ensuite mises en suspension en utilisant du Versene (Life Technologies), empêchant ainsi la perte de l'expression des protéines à la surface membranaire. Les cellules sont ensuite lavées deux fois dans du tampon de lavage *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) (PBS, 1 % SVF, 0.02 % azide de sodium), puis incubées pendant 30 minutes à 4°C avec des anticorps de marquages de surface. Lorsque le marquage est complété, les cellules sont lavées une fois dans du tampon FACS, avant d'être fixées dans une solution de fixation (PBS 1X, 1% Formaldéhyde). L'acquisition des données est effectuée à l'aide d'un cymomètre BD LSR-II équipé de laser bleu (488 nm), rouge (633 nm) et violet (405 nm) *via* le logiciel FACSDIVA (Version 5.0.3) (BD Biosciences), tandis que l'analyse est réalisée avec le logiciel FlowJo (Version 9.4.11) pour Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

### **Analyses statistiques.**

Toutes les données sont ensuite traitées avec le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les différences entre les moyennes de chaque condition sont évaluées statistiquement par la méthode ANOVA suivie d'un post-hoc de Tukey avec p=0.05.



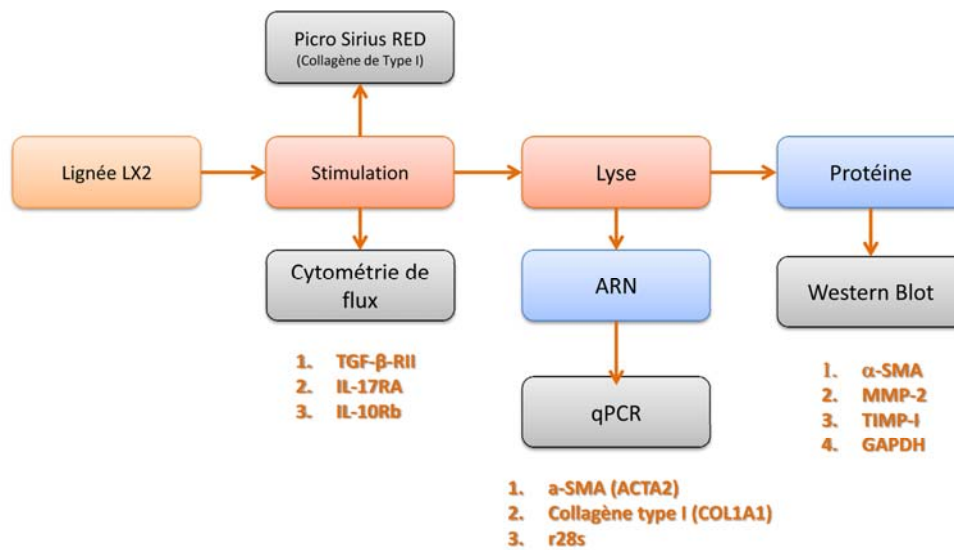
**Tableau 1. Amorces de PCR.**

Gène	Amorce	Référence	N.accession	Séquence	Taille (bp)
r28S	Topo-28S-F	—	NR_003287.	GGCGGGAGTAACTATGACTCT	481
	Topo-28S-R	—		GACACCTGCGTTACCGTTTG	
	q-28S-F	—	2	CGAGATTCCCCTGTCCCTA	158
	q-28S-R	—		GGGGCCTCCCCTTATTCTA	
COL1A1	Topo-COL1A1-F	—	NM_000088	ACGGCCAAGAGGAAGGCCAAGT	437
	Topo-COL1A1-R	—		GCCATAAGACAGCTGGGGAGCA	
	q-COL1A1-F	—	—	TCTGCGACAACGGCAAGGTGT	147
	q-COL1A1-R	—		CGACGCCGTGTTTCTTGGT	
ACTA2	Topo-ACTA2-F	—	NM_001613	GAGCAAAAGAGGAATCCTGACCC	697
	Topo-ACTA2-R	—		GACTCCATCCCCTGATGAAGGATGG	
	q-ACTA2-F	—	.2	CCAAGGCCAACCGGGAGAAAATGA	97
	q-ACTA2-R	—		GCATAGAGAGACAGCACCGCCTGG	
TIMP-I	Topo-TIMP-I-F	—	NM_003254	TCTGGCATCCTGTTGTTGCT	429
	Topo-TIMP-I-R	—		TGTGCATTCTCACAGCCAA	
	q-TIMP-I-F	—	.2	AATTCCGACCTCGTCATCAGG	123
	q-TIMP-I-R	—		ATCCCCTAAGGCTTGAACC	

## Résultats.

### 1. Développement d'un modèle in vitro de fibrose hépatique.

L'objectif principal de notre modèle est de pouvoir étudier l'expression et la production de facteurs associés à l'activation des cellules stellaires hépatiques et donc, par extension, la fibrose hépatique. Nous souhaitons aussi que ce système puisse répondre à des cytokines humaines. Obtenir des CSHs humaines primaires est difficile, car il faut se procurer des spécimens de foies humains sains de taille suffisamment importante, les CSHs ne représentant que 1 % de la masse totale du foie (Friedman, 2004). Nous avons obtenu les différentes lignées de CSHs humaines qui sont au nombre de deux, les LI90 (Murakami et al., 1995) et les LX2 (Xu et al., 2005). Il nous a été impossible de constituer un stock convenable de LI90, car ces cellules ne proliféraient pas. Cependant, la lignée LX2 qui prolifère bien, qui a 98 % d'homologie avec des CSHs primaires et qui est facilement transfectable (Xu et al., 2005), nous a permis de réaliser nos expériences. Nous avons donc décidé de travailler pour la suite, uniquement avec la lignée de cellules LX2. Notre modèle représenté sur la figure 9 est basé sur la stimulation de cette lignée par les cytokines de types Th17, IL-17A et IL-22, que l'on compare à une stimulation contrôle par le TGF- $\beta$ . Les cellules sont ensuite lysées pour obtenir l'ARNm nous permettant d'évaluer l'expression de COL1A1,  $\alpha$ -SMA et TIMP-I par PCR quantitative au *sybr green* en utilisant des amorces que nous avons générées. Ce choix est justifié par le fait que les amorces commerciales sont relativement coûteuses et que celles issues de publications n'étaient parfois pas spécifiques du gène cible, ou bien ne répondaient pas aux exigences du guide de la PCR quantitative au niveau de la taille de l'amplicon, de la température de fusion ou du pourcentage de G/C (Bustin et al., 2009; Lefever et al., 2009). Les protéines sont récupérées pour évaluer la production d' $\alpha$ -SMA, de TIMP-I et de MMP-2. La sécrétion de collagène de type I est évaluée par le rouge de picro Sirius, une coloration communément utilisée par les pathologistes pour évaluer la déposition de collagène sur les biopsies de patients. Enfin, nous pouvons évaluer l'expression à la surface cellulaire des récepteurs d'intérêts à l'étude, comme le TGF- $\beta$ -RII, l'IL-17RA et l'IL-10Rb.



**Figure 9. Schéma expérimental utilisé.**

La lignée de cellules stellaires LX2 est stimulée avec des cytokines, puis l'expression et la production de molécules pro-fibrotiques est évaluée par cytométrie en flux, coloration au rouge de picro Sirius, immunobuvardage et PCR quantitative.

## 2. Validation de nos amorces de PCR quantitative.

Pour mesurer l'activation des cellules stellaires hépatiques, l'expression de gènes profibrotiques peut être réalisée par PCR quantitative. Ces gènes sont nombreux, mais un nombre restreint sont les plus représentatifs, comme ceux codant pour le collagène de type I, l' $\alpha$ -SMA et TIMP-I (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Du fait que les amorces que nous avons utilisées pour cette étude ne sont pas issues de publications, nous nous devons de valider leur spécificité. Pour ce faire, nous avons généré pour chaque gène testé (COL1A1, ACTA2, TIMP-I et r28S), une paire d'amorces dites « TOPO » amplifiant un long fragment de 400 à 600 paires de bases et une paire d'amorces dite « quantitative » amplifiant un fragment court entre 80 et 160 paires de bases, un pourcentage de G/C entre 40 % et 60 % et un  $T_m$  d'environ 60 degrés Celsius (Bustin et al., 2009). Ceci correspond, à l'encadré 1 de la figure 10. Par la suite, nous avons utilisé les amorces « TOPO » sur des ARNm totaux de cellules LX2 quiescentes, vérifié par gel d'électrophorèse qu'un seul fragment était amplifié puis nous avons cloné ce fragment dans un vecteur TOPO-TA (life technologies). Une fois le clonage validé par digestion enzymatique *via* EcoRI, celui-ci a été séquencé à la plateforme de Génome Québec. Le résultat de séquençage est ensuite comparé à la banque des transcrits humains. Pour nos quatre gènes d'intérêt, les résultats montrent une homologie de 100 % avec la séquence ayant servi à l'élaboration des amorces, ainsi qu'une E value (pour *error value*) proche de 0 validant ainsi le résultat de la comparaison (figure 10, encadré 2). Dès lors, nous réalisons une PCR classique en utilisant nos amorces « quantitatives » avec comme échantillons notre vecteur contenant le produit de PCR « TOPO ». Nous validons par gel d'électrophorèse qu'une seule bande soit présente et que celle-ci se trouve au poids moléculaire attendu. Ensuite, nous réalisons une PCR quantitative au *sybr green*, toujours avec les mêmes amorces et échantillons, en validant par un génotypage de fusion qu'un seul produit soit amplifié par l'apparition d'un seul pic de fluorescence (figure 10, encadré 3). Enfin, nous réalisons une PCR quantitative en utilisant nos amorces quantitatives avec des ARNm totaux de cellules stellaires hépatiques, un seul produit devant être amplifié avec un pic de fluorescence identique à la PCR utilisant le vecteur comme échantillon (figure 10, encadré 4). Un exemple, pour le 28S est représenté à la figure 10B ; la courbe rouge représente la courbe du contrôle négatif (H<sub>2</sub>O) tandis que les courbes bleues représentent l'échantillon

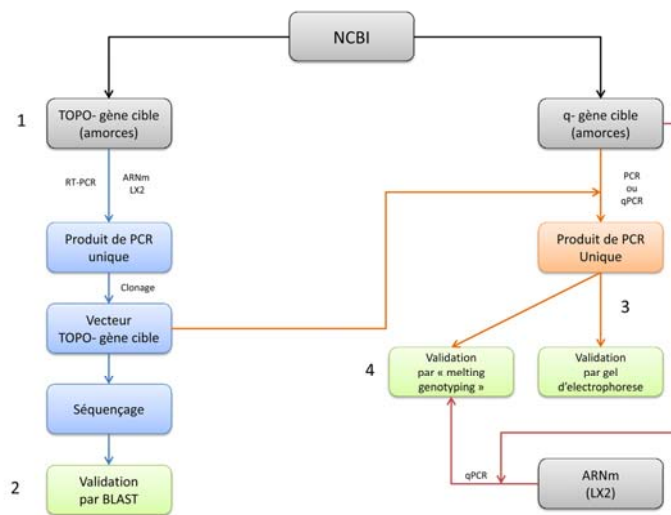
issu des ARNm totaux de LX2 et le contrôle positif (vecteur TOPO-28S). Les deux courbes ont le même point de fusion confirmant ainsi que les deux produits sont identiques, et donc, que l'amplicon est spécifique du 28S. Si nos amorces passent toutes ces étapes de sélection, nous considérons que notre expérience est spécifique. Les informations concernant nos amorces sont représentées dans le Tableau 1.

### **3. Confirmation de l'expression de l'IL-17RA et de l'IL-10Rb par la lignée de cellules stellaires hépatiques LX2.**

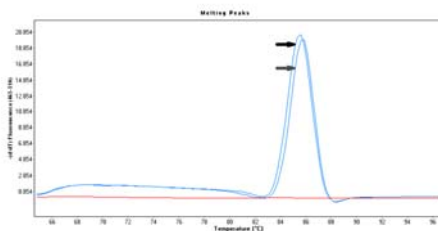
L'IL-17A se lie à un récepteur hétérodimérique composé de deux chaînes IL-17RA et IL-17RC. L'IL-22 transmet son signal *via* un récepteur hétérodimérique composé d'une chaîne IL-10Rb et IL-22R. Afin de confirmer l'expression membranaire des récepteurs à l'interleukine 17A et à l'interleukine 22 par la lignée de cellules stellaires hépatiques LX2, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux. Des cellules quiescentes mises en culture dans des conditions normales (DMEM+glutamax 10%SVF) ont été passées au Versene (Life Technologies, Burlington, ON). Ce produit permet de décoller les cellules tout en empêchant l'altération de l'expression des récepteurs à la surface cellulaire, contrairement à la trypsine. Directement après le passage, les cellules LX2 ont été marquées avec des anticorps anti-IL17RA couplés à l'APC, anti-IL-10Rb couplés à l'Alexa-488 et anti-TGF- $\beta$ -RII couplés au PE. L'expression membranaire du TGF- $\beta$ -RII est utilisée comme contrôle positif, ce récepteur étant fortement exprimé par les cellules stellaires hépatiques, le TGF- $\beta$  étant un des signaux majeurs de fibrose hépatique (Friedman, 2008; Seki et al., 2007).

Les résultats sont présentés dans la figure 11, la surface grise indique la fluorescence moins un (FMO), l'abscisse représente l'intensité de fluorescence, l'ordonnée le nombre de cellules et cette figure est un exemple illustratif de 6 expériences différentes. Le premier panel de cytométrie montre une forte expression du TGF- $\beta$ -RII; le deuxième démontre une forte expression de l'IL-17RA tandis que le troisième valide l'expression de l'IL-10Rb par les cellules stellaires hépatiques quiescentes. L'IL-10Rb est une chaîne commune à toute la famille de l'IL-10 dont l'IL-22 fait partie.

A.



B.



**Figure 10. Processus de validation des expériences de PCR quantitative.**

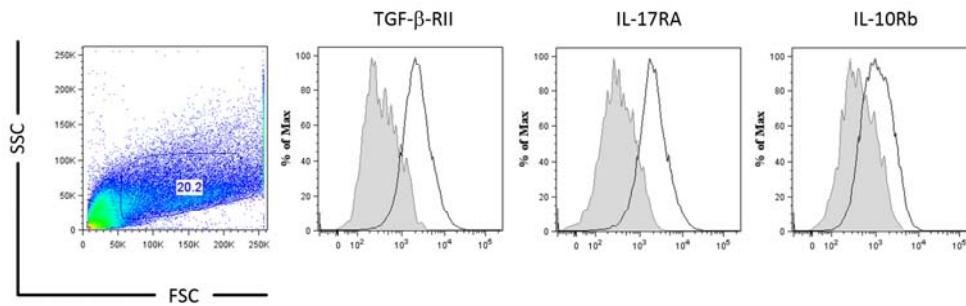
Schéma représentatif du processus de validation des expériences de PCR quantitatives (A), génération des amorces de PCR (1), validation des amorces « TOPO » par séquençage (2), validation des amorces « quantitatives » par gel d'électrophorèse et génotypage de fusion (3) et confirmation des résultats par génotypage de fusion des échantillons d'ARNm. Représentation des « melting peaks » (B) pour le contrôle positif « TOPO » (flèche noire), contrôle négatif H<sub>2</sub>O (courbe rouge) et ARNm de LX2 (flèche grise).

Malheureusement, un anticorps dirigé contre la chaîne spécifique de l'IL22 n'est pas encore disponible. Néanmoins, afin de valider que l'IL-22R est produit par les CSHs, les ARNm codant pour l'IL-10Rb et l'IL-22R ont été amplifiés par RT-PCR à partir des ARNm totaux de LX2 quiescentes. Nous avons confirmé que ces deux gènes sont transcrits (donnée non représentée).

Ces résultats confirment les observations sur les CSHs primaires humaines exprimant IL-17RA (Lemmers et al., 2009), ainsi que les cellules primaires de souris (Meng et al., 2012). De plus, nous avons montré que les CSHs quiescentes peuvent exprimer l'IL-22R, car les transcrits des deux chaînes ont été amplifiés par RT-PCR, et la sous-unité IL-10Rb est fortement exprimée à la surface cellulaire. Ceci suggère que la lignée LX2 peut répondre à l'IL-17A et à l'IL-22, nous permettant de réaliser notre étude fonctionnelle.

#### **4. L'interleukine 17A agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques.**

Afin d'étudier le potentiel rôle pro-fibrotique de l'IL-17A, la lignée de cellules stellaires hépatiques humaines LX2 a été stimulée avec deux doses d'IL-17A : une dose considérée comme « physiologique » de 1ng/mL et une dose forte de 40ng/mL. Des cellules stimulées au TGF- $\beta$  servent de contrôle positif, tandis que les cellules traitées au PBS constituent notre contrôle négatif. Nous avons d'abord évalué la dose de TGF- $\beta$  permettant d'obtenir le plateau d'activation des cellules stellaires LX2 en utilisant une gamme de 0,1ng/mL à 10ng/mL (donnée non représentée). Une dose de 2,5ng/mL permet d'induire une activation robuste des cellules LX2. En effet une forte induction des gènes COL1A1, ACTA2 et TIMP-I au moins 5 fois supérieure ( $n=3$ ,  $p<0,001$ ) à des cellules quiescentes est observée (figure 12A), confirmé en immunobuvardage (figure 12B). De même, une forte coloration rouge 5 fois supérieure aux cellules quiescentes ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ) est révélée par le rouge de picro Sirius, significative d'une sécrétion accrue de collagène de type I par les CSHs (figure 12C). Une dose intermédiaire de TGF- $\beta$  à 1ng/mL est aussi utilisée, et induit une activation intermédiaire des cellules LX2, avec une induction de 2 fois pour le COL1A1 ( $n=3$ ,  $p<0,001$ )



**Figure 11. Validation de l'expression de l'IL-17RA et de l'IL-10Rb par les cellules LX2 quiescentes.**

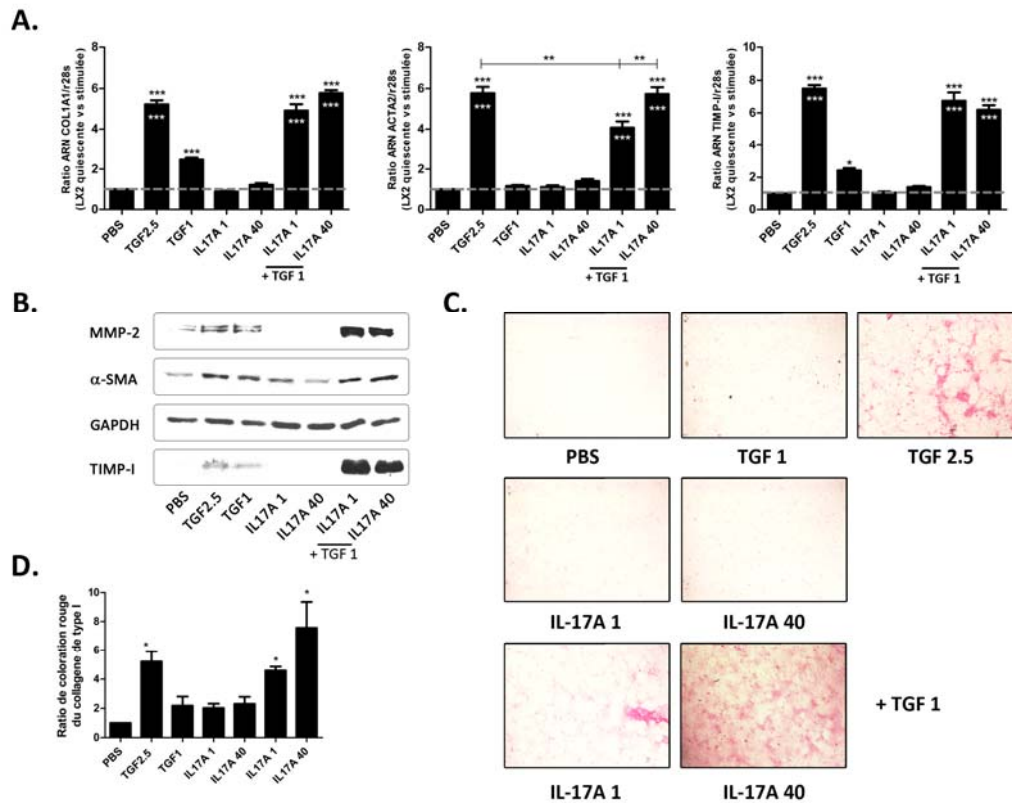
Analyse de l'expression en cytométrie en flux du TGF- $\beta$ -RII, de l'IL-17RA et de l' IL-10Rb par la lignée de cellules humaines LX2. Les cellules LX2 sont d'abord identifiées selon leur taille et leur granulosité (panneau 1). Puis, les données sont présentées en un histogramme représentatif de 6 expériences. L'abscisse représente l'intensité de fluorescence, l'ordonnée le pourcentage de cellules. La surface grise indique l'autofluorescence, la courbe noire indique le marquage spécifique.



et TIMP-I (n=3, p<0,05) uniquement, confirmé de la même manière en immunobuvardage et par une faible coloration rouge par le rouge de picro Sirius. L'interleukine 17A ne permet pas d'activer les cellules stellaires hépatiques, à faible comme à forte doses. Aucune induction des gènes pro-fibrotiques n'est observée, le niveau restant équivalent à celui des cellules quiescentes (figure 12A).

Ce résultat est validé au niveau protéique par une intensité identique d' $\alpha$ -SMA entre cellules traitées au PBS et celles stimulées par l'IL-17A (figure 12B), ainsi que l'absence de coloration rouge significative (figure 12C, 12D). Cependant, la stimulation des cellules LX2 par une dose intermédiaire de TGF- $\beta$  (1ng/mL) en combinaison avec de l'IL-17A à faible (1ng/mL) ou forte (40ng/mL) dose induit une activation robuste. L'expression du gène codant pour le collagène de type I est 5 fois supérieure aux cellules quiescentes (n=3, p<0,0001), 2 fois supérieure au TGF- $\beta$  à 1ng/mL (n=3, p<0,0001) et équivalente au TGF- $\beta$  à 2.5ng/mL (figure 12A). Le même profil est observé pour TIMP-I (n=3, p<0,0001), tandis que pour ACTA2 un effet similaire se dessine avec néanmoins une plus forte induction du gène avec l'IL-17A à 40ng/mL *versus* 1ng/mL (n=3, p<0,001). Au niveau protéique, les résultats indiquent une forte production d' $\alpha$ -SMA, de TIMP-I et de MMP-2 lors de co-stimulation par le TGF- $\beta$  et l'IL-17A de manière dose dépendante. Enfin, la sécrétion de collagène de type I, évalué par rouge de picro Sirius, démontre que le maximum est atteint de la même manière (n=3, p<0.05) corrélant ainsi avec les données de PCR quantitative.

Ensemble ces résultats indiquent que l'IL-17A n'est pas suffisante pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques, mais que cette cytokine peut agir en synergie avec le TGF- $\beta$ . Ceci amène à un phénotype pro-fibrotique des LX2 caractérisé par une production élevée de collagène de type I, d' $\alpha$ -SMA et de TIMP-I *via* des doses plus faible de TGF- $\beta$ .



**Figure 12. L'IL-17A agit en synergie avec le TGF- $\beta$  pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques.**

Expression par la lignée LX2 des gènes pro-fibrotique, COL1A1, ACTA2 et TIMP-I (A) : les résultats sont exprimés par le ratio d'induction entre cellules quiescentes et cellules stimulées à l'IL-17A. La ligne grise en pointillé représente l'expression basale des différents gènes, les étoiles noires indiquent un niveau significatif par rapport au niveau basal et les étoiles blanches indiquent un niveau significatif par rapport à l'expression du TGF- $\beta$ . Analyse par immunobuvardage de TIMP-I, MMP-2,  $\alpha$ -SMA normalisée sur GAPDH (B). Cliché de microscopie de cellules LX2 après coloration au rouge de picro Sirius (C), le marquage rouge est spécifique du collagène de type I. Histogramme de la quantification du marquage entre les différentes conditions réalisée sur trois champs (D). \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*,  $p < 0,0001$

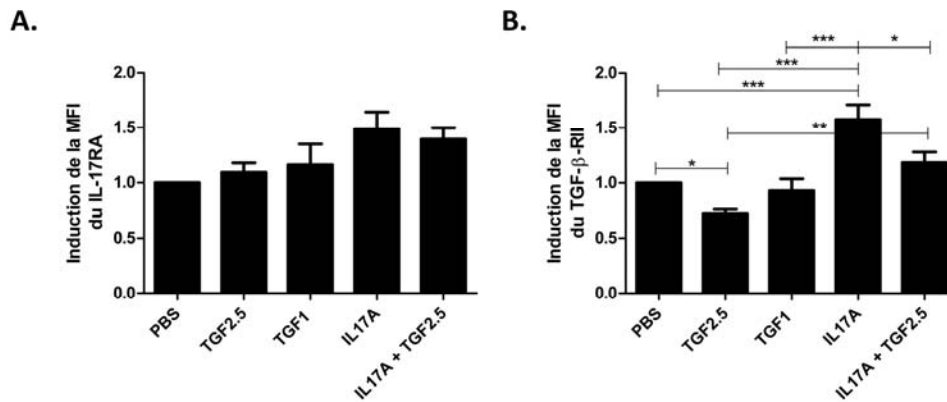
## **5. L'interleukine 17A module l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires.**

Afin de déterminer les mécanismes impliqués dans l'activation accrue des cellules LX2 par la combinaison de TGF- $\beta$  et d'interleukine-17A, nous avons évalué comment ces cytokines peuvent moduler l'expression à la surface membranaire de leurs récepteurs respectifs. Pour ce faire, nous avons comparé par cytométrie en flux l'expression du TGF- $\beta$ -RII et du IL-17RA entre des cellules quiescentes et traitées avec de l'IL-17A et/ou de TGF- $\beta$ . Les résultats sont représentés en induction de l'intensité de fluorescence moyenne (n=6), par calcul de l'intensité de fluorescence des cellules traitées sur celle des cellules quiescentes. Tout d'abord, aucune variation significative de l'IL-17A récepteur n'est observée tel que démontré à la figure 13A, avec une tendance d'augmentation de l'expression de l'IL17RA par l'IL-17A (p=0,010).

De manière intéressante, des variations importantes du TGF- $\beta$ -RII sont observées après stimulation. Tout d'abord, une baisse de 30 % de l'expression du TGF- $\beta$ -RII (n=6, p<0,05) est induite par la dose activatrice de

TGF- $\beta$  (2,5ng/mL), tandis qu'une tendance à la baisse se dégage avec une dose intermédiaire de TGF- $\beta$ . Ceci nous suggère que les cellules LX2 répondent au TGF- $\beta$  et, par un mécanisme de contrôle négatif, réduisent l'expression membranaire de son récepteur. Ce phénomène est commun en immunologie et permet de limiter le temps et l'intensité de la réponse à des signaux émis par les cytokines.

De plus, l'IL-17A induit une surexpression de 1,57 fois à la surface cellulaire du TGF- $\beta$ -RII par rapport à des cellules quiescentes ou traitées au PBS (p<0,0001) ou bien au TGF- $\beta$  (p<0,0001). Nous avons donc cherché à voir si l'IL-17A, en plus d'augmenter l'expression membranaire du TGF- $\beta$ -RII, pouvait limiter la perte de l'expression induite par la stimulation au TGF- $\beta$ . Pour répondre à cette question, nous avons stimulé des cellules LX2 avec une dose activatrice de TGF- $\beta$  en combinaison avec de l'IL-17A. Après 48heures, on peut observer (figure 13B) que le TGF- $\beta$ -RII est induit 1,2 fois par la combinaison IL-17A/TGF- $\beta$  contre 0,72 fois par le TGF- $\beta$  seul (p<0,001). Ce résultat indique que l'IL-17A est



**Figure 13. L'interleukine 17A module l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires.**

Histogramme, représentatif de six expériences indépendantes, démontrant l'induction de l'intensité de fluorescence de l'IL-10Rb (**A**) et du TGF- $\beta$ -RII (**B**) à la surface des cellules LX2. Le ratio résulte de la différence de MFI entre cellules quiescentes ou stimulées. \*, p<0,05, \*\*, p<0,001, \*\*\*, p<0,0001

capable de prévenir en partie la baisse de l'expression induite par le TGF- $\beta$ , mais ne permet pas d'atteindre le niveau de 1,57 fois induit par l'IL-17A ( $p < 0,05$ ). Ensemble, ces résultats laissent suggérer que lors d'une co-stimulation IL-17A et TGF- $\beta$ , les cellules stellaires sont capables d'atteindre un niveau d'activation élevé, puisqu'elles vont répondre de manière plus efficace au TGF- $\beta$ , du fait que son récepteur reste fortement exprimé à la surface cellulaire *via* l'action de l'interleukine 17A. On peut ainsi conclure que l'IL-17A sensibilise les cellules stellaires hépatiques à l'action de la molécule pro-fibrotique TGF- $\beta$ .

#### **6. L'interleukine 22 agit en synergie avec le TGF- $\beta$ pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques.**

L'IL-22 est une cytokine dont la fonction est assez controversée. Elle est décrite comme ayant des rôles pro-inflammatoires et anti-inflammatoires qui dépendent de la durée de sécrétion des autres cytokines présentes dans le milieu ainsi que de l'organe ou de la pathologie ciblée (Sanjabi et al., 2009). De ce fait, nous avons soumis notre modèle d'activation des CSH *in vitro* à une stimulation par l'IL-22 à dose « physiologique » (1ng/mL) ou « non physiologique » (40ng/mL), comparé au contrôle négatif PBS et positif TGF- $\beta$  (2,5ng/mL) comme pour l'IL-17A. Comme pour l'IL-17A, on peut voir que l'IL-22 seul ne suffit pas à induire l'activation des cellules stellaires quiescentes.

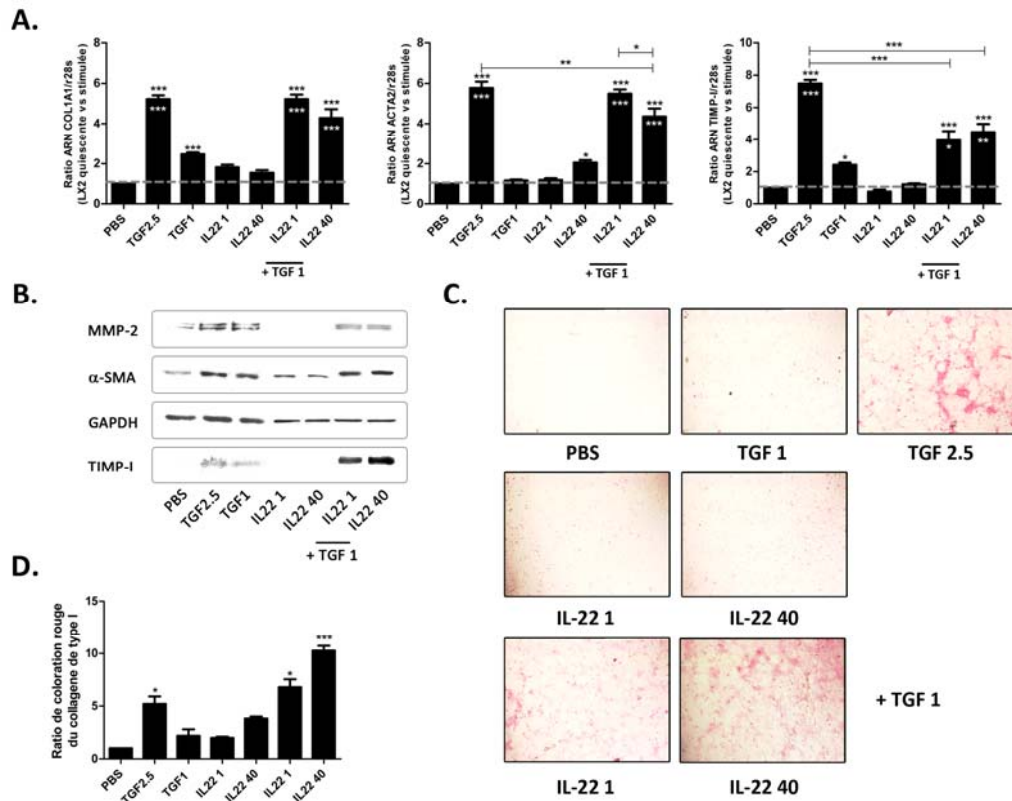
L'expression des gènes COL1A1 et TIMP-I n'est pas augmentée de manière significative par rapport au niveau de base (figure 14A). ACTA2 est légèrement plus exprimé (2 fois) en présence de dose non physiologique ( $n=3$ ,  $p < 0,05$ ). Cependant, cet effet n'est pas confirmé par immunobuvardage (figure 14B), et laisse suggérer la présence d'un artéfact induit par une dose trop forte de cytokine. De plus, aucune production significative de collagène de type I évaluée par rouge de picro Sirius n'est observée lors des stimulations par l'IL-22. Nous avons donc décidé d'évaluer si une synergie entre l'IL-22 et le TGF- $\beta$  pouvait être possible. Comme précédemment, nous avons stimulé les cellules LX2 avec une combinaison de TGF- $\beta$  à dose intermédiaire (1ng/mL) avec de l'IL-22 à faible ou forte concentration. Nous avons observé une forte induction de l'expression de COL1A1 (figure 14A), d'environ 5,2 fois par rapport au niveau de base ( $n=3$ ,  $p < 0,0001$ ) pour l'IL-22 1ng/mL + TGF- $\beta$  1ng/mL et 4,3 fois ( $n=3$ ,  $p < 0,0001$ ) pour l'IL-22 40ng/mL + TGF- $\beta$  1ng/mL. De plus, cette surexpression était 2 fois

supérieure au TGF- $\beta$  1ng/mL seul (n=3, p<0,0001) et équivalente à l'induction par la dose activatrice de TGF- $\beta$  (2,5ng/mL). Ces résultats sont confirmés par rouge de picro Sirius, une forte coloration rouge de plus de 6 fois supérieure au niveau de base étant aussi apparente. Pour ACTA2, les résultats sont similaires au COL1A1, avec une induction de plus de 5 fois par rapport au niveau de base et au TGF- $\beta$  1ng/mL seul (n=3, p<0,0001). La haute dose d'IL-22 ne permet cependant pas d'atteindre le niveau d'activation maximale induite par le TGF- $\beta$  2,5 ng/mL (n=3, p<0,001) ou par l'IL-22 1ng/mL avec TGF- $\beta$  1ng/mL (n=3, p<0,05). Cependant, les résultats de l'immunobuvardage indiquent une forte production d' $\alpha$ -SMA par la combinaison de TGF- $\beta$  et d'IL-22 (figure 14B). Enfin, TIMP-I est aussi surexprimé par la co-stimulation par le TGF- $\beta$  et l'IL-22 par rapport au niveau basal d'expression (n=3, p<0,0001) et par rapport au TGF- $\beta$  1ng/mL (n=3, p<0,05). Le niveau maximal d'expression de TIMP-I induit par la dose activatrice de TGF- $\beta$  n'est pas atteint (n=3, p<0,0001) contrairement à ce qui était observé avec l'IL-17A. Ceci se confirme aussi en immunobuvardage où une induction de TIMP-I est observée (figure 14B), mais moindre comparée à la figure 12B.

Ces résultats indiquent que, comme l'IL-17A, l'IL-22 agit en synergie avec le TGF- $\beta$  pour induire une activation robuste des cellules stellaires hépatiques. Ceci nous indique un potentiel rôle pro-fibrotique de cette molécule.

#### **7. L'interleukine 22 ne module pas l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface membranaire des cellules stellaires.**

Afin de déterminer si l'effet de l'IL-22 sur les cellules stellaires hépatiques était similaire à celui induit par l'IL-17A, nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux pour évaluer l'expression membranaire du TGF- $\beta$ -RII, ainsi que de la chaîne IL-10Rb du récepteur à l'IL-22. Tout d'abord, aucune variation significative de l'IL-10Rb n'est observé par l'IL-22 comme par le TGF- $\beta$  (n=6), comme le démontre la figure 15A. De plus, contrairement à l'IL-17A, l'IL-22 n'est pas capable d'induire l'expression du



**Figure 14. L'interleukine 22 agit en synergie avec le TGF- $\beta$  pour induire l'activation des cellules stellaires hépatiques.**

Expression par la lignée LX2 des gènes pro-fibrotique, COL1A1, ACTA2 et TIMP-I (A) : les résultats sont exprimés le ratio d'induction entre cellules quiescentes et cellules stimulées à l'IL-22. La ligne grise en pointillé représente l'expression basale des différents gènes, les étoiles noires indiquent un niveau significatif par rapport au niveau basal et les étoiles blanches indiquent un niveau significatif par rapport à l'expression du TGF- $\beta$ . Analyse par immunobuvardage de TIMP-I, MMP-2,  $\alpha$ -SMA normalisée sur GAPDH (B). Cliché de microscopie de cellules LX2 après coloration au *picro sirius red* (C), le marquage rouge est spécifique du collagène de type I. Histogramme de la quantification du marquage entre les différentes conditions réalisé sur trois champs (D). \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*,  $p < 0,0001$

TGF- $\beta$ -RII à la surface cellulaire ni de prévenir la diminution de l'expression induite par le TGF- $\beta$  à dose activatrice (figure 15B).

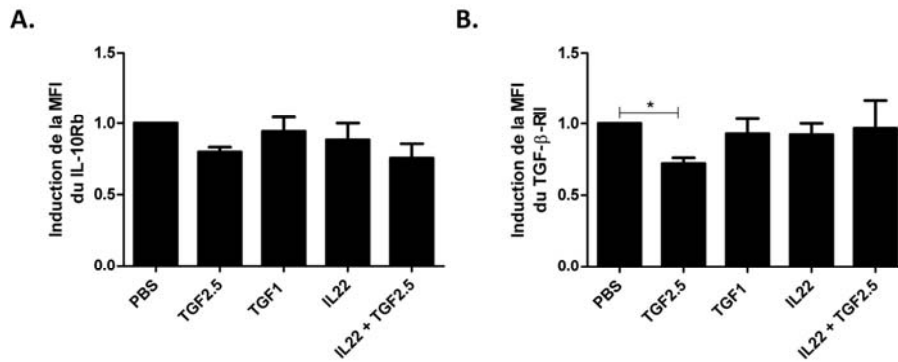
Ces résultats laissent suggérer que l'IL-22 n'est pas capable de moduler l'expression membranaire du récepteur au TGF- $\beta$ . Malgré cela, la combinaison IL-22 + TGF- $\beta$  induit une forte activation des cellules stellaires hépatiques indiquant que d'autres mécanismes cellulaires interviennent dans ce phénotype.

#### **8. L'interleukine 17A et l'interleukine 22 ne modulent pas l'expression de l'IL-10Rb et de l'IL-17RA respectivement.**

Afin de déterminer si les cytokines de type Th17, IL-17A et IL-22, pouvaient sensibiliser les CSHs à leur action respective, nous avons évalué le potentiel de l'IL-17A à induire l'expression de l'IL-10Rb (figure 16A). L'IL-17A seule, ou en combinaison avec le TGF- $\beta$ , n'est pas capable d'augmenter de manière significative l'expression de l'IL-10Rb à la surface cellulaire.

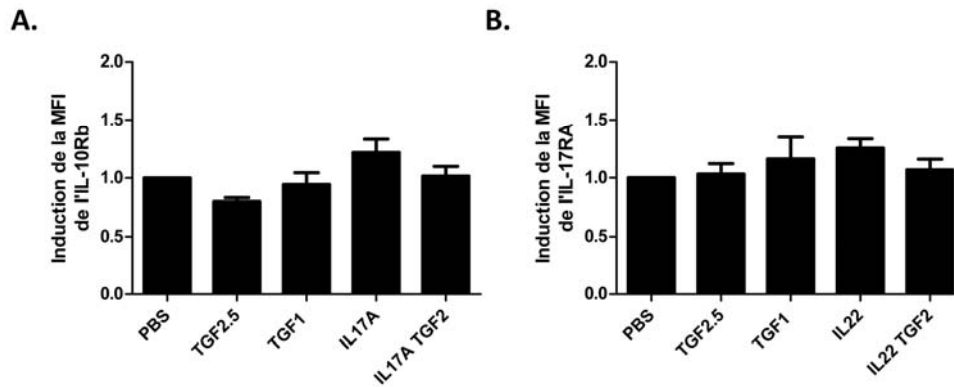
De même, aucune augmentation significative de l'expression membranaire de l'IL-17RA n'est observable lorsque les CSHs sont traitées avec de l'IL-22 seule ou en combinaison avec le TGF- $\beta$  (figure 16B). Cette observation laisse supposer que ces cytokines ne sensibilisent pas les CSHs à l'action des autres cytokines de type Th17, ceci pouvant empêcher que l'action pro-fibrotique de l'IL-17A et l'IL-22 soit trop importante.





**Figure 15. L'interleukine 22 ne module pas l'expression du TGF-β-RII à la surface membranaire des cellules stellaires.**

Histogramme, représentatif de six expériences indépendantes, démontrant l'induction de l'intensité de fluorescence de l'IL-10Rb (**A**) et du TGF-β-RII (**B**) à la surface des cellules LX2. Le ratio résulte de la différence de MFI entre cellules quiescentes ou stimulées. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*,  $p < 0,0001$ .



**Figure 16. L'interleukine 17A et l'interleukine 22 ne modulent pas l'expression de l'IL-10Rb et de l'IL-17RA respectivement.**

Histogramme, représentatif de six expériences indépendantes, démontrant l'induction de l'intensité de fluorescence de l'IL-10Rb (**A**) et de l'IL-17RA (**B**) à la surface des cellules LX2. Le ratio résulte de la différence de MFI entre cellules quiescentes ou stimulées. \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,001$ , \*\*\*,  $p < 0,0001$ .

## Discussion.

Nous avons démontré grâce à notre modèle *in vitro* de fibrose hépatique que l'IL-17A et l'IL-22 sont des cytokines pro-fibrotiques capables de sensibiliser les cellules stellaires hépatiques à l'action du TGF- $\beta$  par des mécanismes cellulaires différents. L'IL-17A est capable d'augmenter l'expression membranaire du TGF- $\beta$ -RII, contrairement à l'IL-22. Nous n'avons observé aucune variation dans le niveau d'expression des récepteurs de l'IL-17A et de l'IL-22.

Nous avons donc optimisé un modèle de fibrose hépatique *in vitro*, basé sur l'activation des CSHs, qui nous permet d'évaluer l'expression ainsi que la production de protéines pro-fibrotiques (figure 9). Ce modèle devait être basé sur deux lignées de CSHs humaines : les LI90 et les LX2. Malheureusement, nous avons été dans l'incapacité de générer un nombre suffisant de cellules LI90 dans notre laboratoire. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces cellules ne sont pas immortalisées et prolifèrent pendant un nombre de passages limité (Murakami et al., 1995). Le passage que nous avons obtenu était relativement avancé, passage 16 sur un maximum de 25. Il est donc probable que l'échantillon de cellules ait déjà atteint sa limite de prolifération. De plus, comme nous étions dans l'impossibilité d'obtenir des LI90 avec un passage moins élevé, nous avons abandonné le travail avec cette lignée. Aucun problème de culture n'a été rencontré avec la lignée LX2, et comme celle-ci est la référence en termes de lignée humaine de CSHs, nous avons poursuivi uniquement avec celle-ci. Il est possible que nos résultats soient sous-représentatifs par rapport à des CSHs primaires, car les LX2 ont une expression réduite d'environ 15% des gènes pro-fibrotiques (Xu et al., 2005). Cependant, ceci n'affecte pas le processus d'activation et donc nos observations. Cependant, l'utilisation de cellules primaires humaines resterait le meilleur modèle afin de valider nos résultats.

L'optimisation des expériences de PCR quantitative et d'immunobuvardage a donc été effectuée en mesurant l'activation des LX2 par le TGF- $\beta$ , une des cytokines pro-fibrotiques les plus importantes (Friedman, 2008). Nous avons ainsi obtenu des résultats semblables au niveau de l'expression génique du collagène de type I (figure 12), c'est-à-dire une induction

d'environ 4,5 fois avec une dose de TGF- $\beta$  de 2.5ng/mL, résultats comparables à ceux générés dans l'article original des LX2 (Xu et al., 2005). Nos résultats d'immunobuvardage pour l' $\alpha$ -SMA sont aussi similaires, et ressemblent à ceux obtenus avec la lignée LI90 (Ueki et al., 1998). Ces résultats suggèrent que les différences entre les deux lignées ne sont pas significatives, et proches des cellules primaires humaines de par la forte homologie des lignées avec les CSHs primaires. Nous voulions pouvoir corrélérer l'expression de nos gènes d'intérêts avec la production de protéines. Ceci est important lors de l'étude de la fonction biologique des cytokines pour pouvoir différencier les régulations transcriptionnelles des régulations post-transcriptionnelles. Comme les anticorps anti-COL1A1 n'offrent pas une qualité de marquage satisfaisante, nous avons pour la première fois optimisé la réalisation de coloration au rouge de picro Sirius sur des cultures cellulaires, habituellement réalisée sur des tissus. Ainsi, nous pouvons évaluer de manière qualitative la production de collagène de type I. Enfin, nous voulions pouvoir détecter l'expression quantitative des récepteurs des cytokines d'intérêts à notre étude, l'IL-17A, l'IL-22 et le TGF- $\beta$ . Nous avons donc optimisé des expériences de cytométrie en flux, malheureusement l'importante auto-fluorescence due à la taille des cellules et possiblement aux acides rétinoïques nous empêche d'évaluer la co-expression des récepteurs.

Notre étude est la première à démontrer l'expression de l'IL-17RA à la surface des CSHs humaines quiescentes à l'aide la lignée de cellules LX2 (figure 11). Cette expression avait auparavant été démontrée sur des CSHs humaines primaires issues de foies cirrhotiques, et donc sur des CSHs actives et non quiescentes (Lemmers et al., 2009). L'expression de l'IL-17RA a aussi été validée récemment sur des CSHs primaires murines (Meng et al., 2012). Ce résultat est en accord avec les données de la littérature qui indiquent que ce récepteur est exprimé par un grand nombre de types cellulaires dans l'organisme, et plus particulièrement par les fibroblastes (Iwakura et al., 2011; Kehlen et al., 2002; Shen and Gaffen, 2008). De plus, nous avons confirmé que les CSHs expriment l'IL-10Rb, la chaîne commune de la famille de l'IL-10 (Donnelly et al., 2004), ainsi qu'elles expriment le gène codant pour l'IL-22R. L'expression membranaire de la chaîne du récepteur spécifique de l'IL-22 n'a pu être démontrée faute d'anticorps spécifiques. Néanmoins, nos résultats avec les données de la

littérature indiquent que les cellules LX2 peuvent répondre aux cytokines de la famille de l'IL-10 ainsi qu'à l'IL-17A et à l'IL-17F (Zhang et al., 2006).

Par la suite, nous avons décidé d'évaluer l'action de l'IL-17A et de l'IL-22 sur l'activation des CSHs, un des points clés de la fibrose hépatique. Nos résultats démontrent que l'IL-17A seule ne suffit pas à induire l'activation des CSHs car aucune augmentation de l'expression et de la production d' $\alpha$ -SMA, de COL1A1, de MMP-2 et de TIMP-I n'a été observée (figure 12). Ceci est surprenant pour l'IL-17A qui, de par ses propriétés pro-inflammatoires, semblait être un bon candidat pour l'activation des CSHs (Hammerich et al., 2011). De plus, la fréquence des cellules IL-17<sup>+</sup> est positivement corrélée à la progression de la fibrose hépatique (Lemmers et al., 2009; Zhang et al., 2010). En utilisant un modèle murin d'hépatite, Meng *et al.* ont démontré que l'IL-17A est capable d'induire l'activation directe des CSHs primaires murines, par l'augmentation de l'expression des ARNm de l'ACTA2, de COL1A1 et de TIMP-I (Meng et al., 2012). Nos résultats sont différents de ceux obtenus par ce groupe car, premièrement, leur technique de purification des CSHs contient des monocytes, des neutrophiles et des macrophages. Deuxièmement, la stimulation par l'IL-17A est induite pendant seulement 2 heures contrairement à 48 heures dans nos expériences. Ce temps de stimulation est extrêmement court sachant que le signal optimal induit par l'IL-17A est obtenu après 24 heures et que l'expression optimale de TIMP-I (le premier facteur pro-fibrotique induit) est obtenue en 6 heures (Hernandez-Gea and Friedman, 2011; Zimmermann et al., 2011). Pour s'assurer que l'effet direct de l'IL-17A est spécifique, ces auteurs réalisent la neutralisation de l'IL-17A dans le milieu via des anticorps neutralisants. Cependant, des études démontrent que les monocytes, les neutrophiles et les macrophages produisent aussi de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$ , du PDGF et du TGF- $\beta$  en réponse à l'IL-17A (Barron and Wynn, 2011). Or, toutes ces cytokines sont impliquées dans l'activation des CSHs.

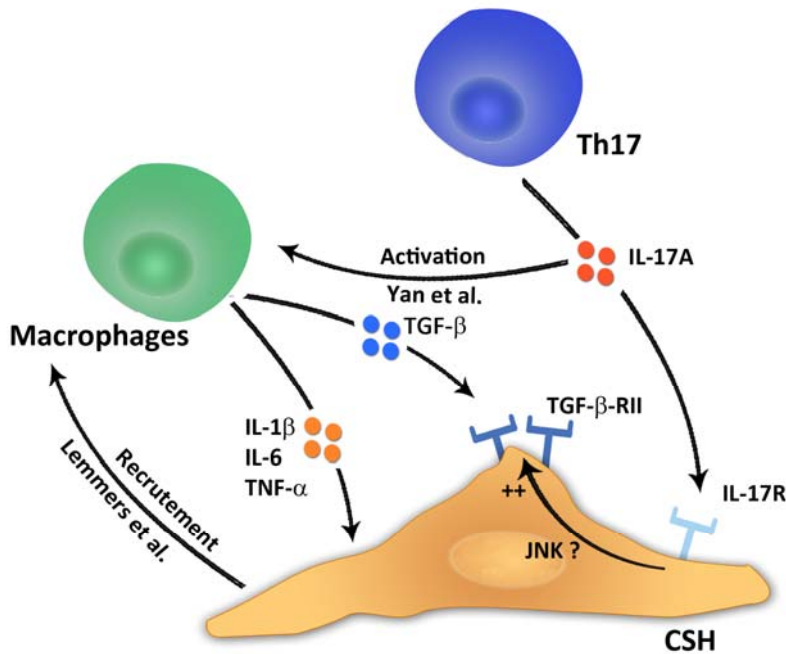
De plus, Shu Yan *et al.* ont démontré que l'axe IL-17/IL-17R est important pour les dommages hépatiques et la fibrose dans un modèle d'hépatite induite par la Con-A. L'effet de l'IL-17A était aboli si les macrophages sont supprimés chez la souris, par injection de chlorure de gadolinium, ou bien par élimination des cytokines pro-fibrotiques sécrétées par les macrophages, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (Yan et al., 2012). Enfin chez l'homme, la stimulation de

CSHs primaires par l'IL-17A induit l'expression de chimiokines (comme l'IL-8 et le GRO- $\alpha$ ) importantes dans le recrutement des monocytes, des neutrophiles et des macrophages (Lemmers et al., 2009). La fonction biologique de l'IL-17A sur les CSHs reste donc controversée et elle dépend du système biologique utilisé ainsi que des temps de stimulation. Néanmoins, nos résultats s'alignent sur ceux de Lemmers et de Shu Yan car nous n'avons pas observé l'activation directe des stellaires par l'IL-17A.

Cependant, nous avons observé un effet synergique d'activation des CSHs par l'IL-17A et le TGF- $\beta$  (figure 12). Lors de l'optimisation de notre modèle, nous avons déterminé la dose plateau d'activation par le TGF- $\beta$  (2,5ng/mL) ainsi qu'une dose permettant une activation intermédiaire (1ng/mL). Ainsi, la co-stimulation des cellules LX2 par de l'IL-17A, à doses physiologique et non-physiologique, et par une faible dose de TGF- $\beta$  permet d'atteindre le pic d'activation. Afin d'évaluer le mécanisme menant à ce phénotype, nous avons étudié l'expression des récepteurs à l'IL-17A et au TGF- $\beta$  suite à nos différentes conditions de stimulation (figure 13). L'IL-17RA est fortement exprimé par les CSHs quiescentes ou activées par le TGF- $\beta$ , et aucune variation significative de l'expression membranaire n'est observée en réponse à l'IL-17A, à l'IL-22 et au TGF- $\beta$ . Les CSHs possèdent donc la même sensibilité à l'IL-17A selon leurs différents stades d'activation. De manière intéressante, nous avons démontré que l'IL-17A module à la hausse l'expression à la surface des CSHs du TGF- $\beta$ -RII.

Ceci explique en partie l'effet de synergie observé entre l'IL-17A et le TGF- $\beta$ , qui augmente la réponse des CSHs à l'action de la molécule pro-fibrotique TGF- $\beta$ . L'expression du TGF- $\beta$ -RII est liée au facteur de transcription AP-1 qui est activé par la phosphorylation de JNK (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Or l'IL-17A signale par différents facteurs cellulaires dont la voie JNK, ce qui laisse supposer que cette voie est privilégiée par l'IL-17A sur les CSHs (Iwakura et al., 2011).

Nos résultats et les données de la littérature indiquent donc que l'IL-17A a une fonction pro-fibrotique dans le foie en induisant le recrutement des monocytes, des neutrophiles et des macrophages (Lemmers et al., 2009), la sécrétion par ces cellules d'IL-1 $\beta$ ,



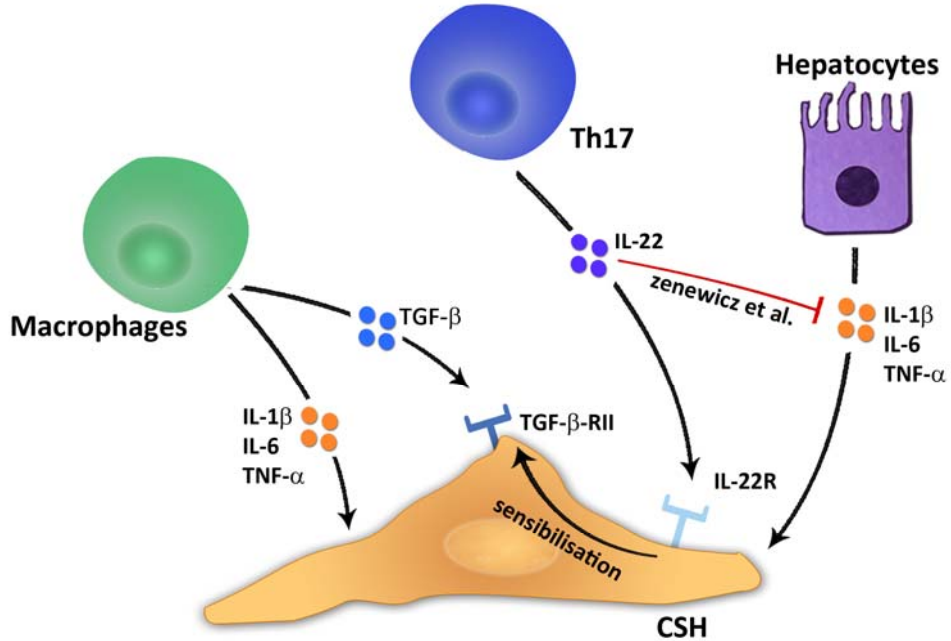
**Figure 17. Modèle proposé d'action de l'IL-17A dans la fibrose hépatique.**

L'IL-17A sécrétée par les lymphocytes Th17 induit l'activation des macrophages qui vont produire les cytokines pro-fibrotiques IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ . L'IL-17A agit sur les CSHs et induit la sécrétion de chimiokines recrutant les macrophages. Enfin, l'IL-17A (probablement en activant la voie JNK) induit l'expression membranaire accrue du TGF- $\beta$ -RII : ceci rend les CSHs plus sensibles au TGF- $\beta$ . La conséquence est une production accrue de collagène de type I, d' $\alpha$ -SMA, de MMPs et de TIMP-I.

de l'IL-6, de TNF- $\alpha$ , de TGF- $\beta$  et de PDGF (Barron and Wynn, 2011), et enfin en sensibilisant les CSHs à l'action du TGF- $\beta$  (figure 17).

Par la suite, nous avons étudié l'action de l'IL-22, une cytokine de la famille de l'IL-10, dont la fonction pro ou anti-inflammatoire est controversée (Sanjabi et al., 2009). Nous avons montré que l'IL-22, à dose physiologique ou non, n'est pas capable d'induire l'activation des CSHs (figure 14). De plus, nous n'avons observé aucune baisse de l'expression des gènes pro-fibrotiques, ACTA2 et COL1A1, contrairement aux observations du modèle murin de Kong *et al.* où l'IL-22 limite l'activation des CSHs murines primaires au cours du temps. En effet, il est connu que les CSHs primaires ont tendance à s'autoactiver en culture. Or l'addition d'IL-22 dans le milieu limite l'expression d'ACTA2 et de COL1A1 (Kong et al., 2012). De plus, ils ont démontré que l'IL-22 induit la sénescence des CSHs primaires par l'expression accrue de SOCS3 *via* l'activation de STAT3. Or, l'activation de STAT3 est liée à la survie accrue et la prolifération de nombreux types cellulaires, tel que démontré dans la figure 1 de Kong et al. (Jiang et al., 2011; Radaeva et al., 2004). Dans notre modèle expérimental, l'addition de TGF- $\beta$  avec de l'IL-22 ne prévient pas l'activation des CSHs. Au contraire, comme avec l'IL-17A, l'IL-22 sensibilise les cellules LX2 à l'action du TGF- $\beta$  et donc l'activation des CSHs (figure 14). Nos résultats sont donc différents de ceux obtenus par Kong *et al.* : il se peut que ces différences soient dues aux types de cellules utilisées (primaire murine contre lignée humaine) ou aux doses d'IL-22 utilisées. De plus, nous n'avons pas observé d'augmentation de la mort cellulaire *in vitro* lorsque les cellules LX2 étaient stimulées avec l'IL-22. Enfin, l'effet anti-fibrotique décrit par Kong et al. est observé dans un modèle d'hépatite aigüe au CCL4, et s'explique sûrement par une diminution des dommages hépatiques. En effet, l'IL-22 va induire la phosphorylation de STAT-3 qui aura pour conséquence d'augmenter la survie des hépatocytes (Radaeva et al., 2004; Zenewicz et al., 2007). L'IL-22 est une cytokine dont la fonction est bénéfique pendant les phases aigües d'inflammation, mais la persistance du signal induit une réponse cicatricielle et favorise les carcinomes dans divers tissus (Huber et al., 2012; Zenewicz and Flavell, 2011). Chez l'homme l'IL-22 plasmique est augmentée dans les cas de cirrhose et de carcinome hépatocellulaire, où la production de matrice extracellulaire par les CSHs est importante (Jiang et al., 2011).





**Figure 18. Modèle proposé d'action de l'IL-22 dans la fibrose hépatique.**

L'IL-22 à faible dose agit sur les CSHs pour induire une sensibilisation au TGF-β, indépendante de l'expression du TGF-β-RII. De même, elle augmente la survie des hépatocytes par l'activation de STAT3 limitant la libération des facteurs pro-fibrotiques IL-1β, IL-6 et TNF-α par les hépatocytes. A forte dose, l'IL-22 induit, en plus de la survie des hépatocytes, la sénescence des CSHs par l'induction de SOCS3 (Kong et al., 2012).

Ces données peuvent être intégrées avec nos résultats *in vitro*. En effet, dans la phase aiguë des hépatites, l'IL-22 protège les hépatocytes de l'apoptose *via* l'activation de STAT3, et donc inhibe la libération des cytokines pro-fibrotiques IL-1 $\beta$  et IL-6. Dans le même temps, l'IL-22 sensibilise, par un mécanisme indépendant de l'augmentation du TGF- $\beta$ -RII (figure 15), les CSHs au TGF- $\beta$ . Ceci va donc favoriser, si les dommages hépatiques persistent, la réponse cicatricielle induite par les CSHs. Ainsi, l'IL-22 est sans doute une cytokine dont la fonction anti-fibrotique diminue dans le temps et laisse place à une fonction pro-fibrotique au long terme, comme démontré dans l'intestin (Huber et al., 2012).

Nos données indiquent donc que les cytokines de type Th17, IL-17A et IL-22, sensibilisent les CSHs à l'action du TGF- $\beta$ . Afin de valider que ce phénotype n'est pas un artéfact *in vitro*, nous avons réalisé des expériences similaires avec le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ .

Aucun effet de synergie entre ces cytokines et le TGF- $\beta$  n'a été observé, validant ainsi que le phénotype est spécifique à l'IL-17A et à l'IL-22. De plus, nous avons montré que l'IL-17A et l'IL-22 n'induisent pas de la même manière la sensibilisation au TGF- $\beta$  des CSHs (figures 13 et 15). Seule l'IL-17A induit la surexpression du TGF- $\beta$ -RII qui peut être expliqué par l'activation de la voie JNK/AP-1 par l'IL-17A (Gaffen, 2009), alors que l'IL-22 ne peut activer que la voie JAK/STAT qui ne permet pas d'activer AP-1 (Donnelly et al., 2004). L'activation de JNK est importante pour la progression des hépatites et de la fibrose hépatique (Das et al., 2009; Kluwe et al., 2010). Ainsi, si on valide que l'IL-17A induit aussi la voie JNK dans les CSHs, cela pourrait confirmer son rôle pro-fibrotique et placer cette voie de signalisation comme centrale dans l'initiation de la fibrose hépatique.

Dans le futur, il serait donc intéressant d'étudier plus en détail les voies de signalisation induites par les cytokines de type Th17 dans notre modèle, afin d'évaluer avec une plus grande précision comment elles sensibilisent à l'action du TGF- $\beta$ . Il faudrait évaluer si la signalisation du TGF- $\beta$  est aussi favorisée, notamment par l'augmentation de la phosphorylation de SMAD2/3 et une baisse de la phosphorylation des facteurs inhibiteurs STAT1 et SMAD7 (Baroni et al., 1996; Inagaki and Okazaki, 2007; Jeong et al., 2006).

Cependant, il n'existe pas d'anticorps spécifique de la phosphorylation de SMAD7, ce qui limite l'étude de ce facteur.

Notre modèle est focalisé sur l'activation des CSHs, et ne s'intéresse pas à la capacité des CSHs à recruter des cellules immunitaires par la sécrétion de chimiokines. Or ce phénomène est important pour la progression de la fibrose hépatique (Lemmers et al., 2009; Riezu-Boj et al., 2011; Seki et al., 2009; Tacke et al., 2011). Il serait donc intéressant dans le futur d'étudier comment l'IL-17A et l'IL-22 influencent la sécrétion des chimiokines permettant de recruter les cellules anti-inflammatoires comme les Tregs, et les cellules pro-inflammatoires comme les Th17, les neutrophiles et les monocytes.

## Perspectives

Nous n'avons pas étudié l'action combinée de l'IL-17A et de l'IL-22, car il est trop complexe de combiner de manière physiologique des cytokines *in vitro*. Néanmoins, il serait intéressant dans le futur de générer des surnageants de lymphocytes Th17 humains et d'étudier l'effet sur notre modèle. Pour ce faire, il faudrait procéder au recrutement de patients souffrant d'hépatite avec différents degrés de fibrose, et évaluer la réponse Th17 dans le sang périphérique et le foie pour établir des corrélations entre la fréquence, le type de sécrétion et le score de fibrose. Ensuite, il faudrait valider la fonction pro-fibrotique de l'IL-17A et de l'IL-22 en stimulant notre modèle avec les différents surnageants avec des doses croissantes d'anticorps neutralisant dirigés contre ces deux cytokines. Les résultats attendus seraient que les patients avec un score de fibrose avancé ont une fréquence enrichie en Th17 intra-hépatiques capables de la double production de l'IL-17A et de l'IL-22, et une diminution de la fréquence des Tregs (Foster et al., 2012; Li et al., 2012a). De plus, nous pourrions évaluer avec notre modèle *in vitro* si le potentiel pro-fibrotique/inflammatoire de l'IL-22 peut être augmenté par l'IL-17A, comme démontré dans le modèle murin de fibrose pulmonaire de Sonnenberg. Enfin, il serait important de déterminer si l'effet est direct sur les CSHs ou bien indirect par le recrutement de monocytes et de neutrophiles inflammatoires (Sonnenberg et al., 2010).

Enfin, il pourrait être intéressant dans le futur de valider les observations obtenues avec notre modèle *in vitro* de fibrose hépatique sur des CSHs primaires humaines. Il faudrait comparer la technique de purification standard qui contient des macrophages, des neutrophiles et des monocytes, à la technique d'ultra-purification par billes magnétiques (Friedman et al., 1992; Seki et al., 2007). Ainsi, nous pourrions comparer la fonction pro-fibrotique de l'IL-17A et de l'IL-22 sur des CSHs ultra-pures et à des CSHs en présence de cellules du système immunitaire. Ces expériences pourraient permettre de mieux expliquer les différences observées entre les groupes, les expériences et les modèles d'induction de fibrose.

## Conclusion

Nous avons optimisé un modèle *in vitro* d'activation du processus fibrotique, en mesurant l'activation de la lignée de CSHs humaines LX2. Ce modèle compare l'expression des gènes pro-fibrotiques ACTA2, COL1A1, MMP-2 et TIMP-I entre des cellules quiescentes, activées par la molécule contrôle TGF- $\beta$  et stimulées par des cytokines d'intérêt. Notre modèle *in vitro* a été utilisé pour étudier le rôle de l'IL-17A et de l'IL-22 dans la fibrose hépatique.

Pour la première fois, nous avons démontré que la lignée de CSHs humaines LX2 exprime les récepteurs IL-17RA et IL-10Rb aux cytokines de type Th17 : IL-17A et IL-22. Cette expression ne varie pas entre les cellules quiescentes et actives, et indique que les stellaires sont capables de répondre à ces signaux dès l'initiation des dommages hépatiques. L'IL-17A et l'IL-22 seules ne sont pas suffisantes pour induire l'expression d' $\alpha$ -SMA, de COL1A1, de MMP-2 et de TIMP-I et donc d'activer les CSHs. Cependant, ces deux cytokines, par des mécanismes indépendants, sont capables de sensibiliser les CSHs à l'action de la cytokine pro-fibrotique majeure TGF- $\beta$ . En effet, les cellules stimulées par l'IL-17A ou l'IL-22 nécessitent des doses plus faibles de TGF- $\beta$  pour atteindre le plateau d'activation maximal. L'IL-17A sensibilise les CSHs à l'action du TGF- $\beta$  en augmentant l'expression du TGF- $\beta$ -RII à la surface cellulaire, ainsi qu'en limitant la perte de l'expression induite par le TGF- $\beta$ . L'IL-22 n'est pas capable de moduler l'expression du TGF- $\beta$ -RII ; son mode d'action s'effectue probablement *via* les voies de signalisation cellulaires assurant la transduction du signal au TGF- $\beta$ . De plus, nos résultats de cytométrie en flux laissent supposer que l'IL-17A n'augmente pas l'action de l'IL-22 et inversement, car aucune variation des récepteurs IL-17RA et IL-10Rb n'a été observée.

En conclusion, nous avons donc démontré que l'IL-17A et l'IL-22 sont des cytokines pro-fibrotiques agissant sur les CSHs pour les sensibiliser au signal fibrotique du TGF- $\beta$ . Ces observations confirment donc l'implication des Th17 dans le processus de fibrose, et pourront mener dans le futur à une meilleure caractérisation de cette population dans les maladies hépatiques en apportant les mécanismes d'actions cellulaires aux corrélations établies dans la

littérature. De plus, ce modèle permet une caractérisation rapide de la fonction pro- ou anti-fibrotique des cytokines. Il pourrait permettre d'étudier rapidement les nouvelles cytokines associées aux pathologies inflammatoires comme l'IL-9, l'IL-26, l'IL-32 et l'IL-28B.

## Bibliographie

- Aloman, C., Friedman, S.L., and Merad, M. (2011). Dendritic cells in alcoholic liver injury and fibrosis. *Alcoholism, clinical and experimental research* 35, 776-781.
- Ando, K., Guidotti, L.G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., Schreiber, R.D., Schlicht, H.J., Huang, S.N., and Chisari, F.V. (1994). Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 152, 3245-3253.
- Baillie, M. (1971). Alcohol and the liver. *Gut* 12, 222-229.
- Baroni, G.S., D'Ambrosio, L., Curto, P., Casini, A., Mancini, R., Jezequel, A.M., and Benedetti, A. (1996). Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 23, 1189-1199.
- Barron, L., and Wynn, T.A. (2011). Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 300, G723-728.
- Bedossa, P., Dargere, D., and Paradis, V. (2003). Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38, 1449-1457.
- Bedossa, P., and Poynard, T. (1996). An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 24, 289-293.
- Bensch, B., Seigel, B., Flecken, T., Wolanski, J., Blum, H.E., and Thimme, R. (2012). Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 188, 5438-5447.
- Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453, 1051-1057.
- Brunt, E.M. (2000). Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 31, 241-246.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum

- information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611-622.
- Casrouge, A., Decalf, J., Ahloulay, M., Lababidi, C., Mansour, H., Vallet-Pichard, A., Mallet, V., Mottez, E., Mapes, J., Fontanet, A., *et al.* (2011). Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *The Journal of Clinical Investigation* 121, 308-317.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine* 198, 1875-1886.
- Chiaromonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of Clinical Investigation* 104, 777-785.
- Chinnadurai, R., and Grakoui, A. (2010). B7-H4 mediates inhibition of T cell responses by activated murine hepatic stellate cells. *Hepatology* 52, 2177-2185.
- Colloredo, G., Guido, M., Sonzogni, A., and Leandro, G. (2003). Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *Journal of Hepatology* 39, 239-244.
- Colonna, M. (2009). Interleukin-22-producing natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells in mucosal immunity. *Immunity* 31, 15-23.
- Das, M., Sabio, G., Jiang, F., Rincon, M., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2009). Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha. *Cell* 136, 249-260.
- De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., and Moretta, L. (2011). Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 728-732.
- Docherty, J.F., and Burgess, E. (1922). The action of carbon tetrachloride on the liver. *British Medical Journal* 2, 907-908.
- Doherty, D.G., and O'Farrelly, C. (2000). Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews* 174, 5-20.



- Donnelly, R.P., Sheikh, F., Kotenko, S.V., and Dickensheets, H. (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *Journal of Leukocyte Biology* 76, 314-321.
- Dorner, M., Horwitz, J.A., Robbins, J.B., Barry, W.T., Feng, Q., Mu, K., Jones, C.T., Schoggins, J.W., Catanese, M.T., Burton, D.R., *et al.* (2011). A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection. *Nature* 474, 208-211.
- Dou, X., Li, S., Wang, Z., Gu, D., Shen, C., Yao, T., and Song, Z. (2012). Inhibition of NF-kappaB activation by 4-hydroxynonenal contributes to liver injury in a mouse model of alcoholic liver disease. *The American Journal of Pathology* 181, 1702-1710.
- Elahi, S., Niki, T., Hirashima, M., and Horton, H. (2012). Galectin-9 binding to Tim-3 renders activated human CD4+ T cells less susceptible to HIV-1 infection. *Blood* 119, 4192-4204.
- Elyaman, W., Bassil, R., Bradshaw, E.M., Orent, W., Lahoud, Y., Zhu, B., Radtke, F., Yagita, H., and Houry, S.J. (2012). Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* 36, 623-634.
- Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167-2176.
- Fernandez, M., Semela, D., Bruix, J., Colle, I., Pinzani, M., and Bosch, J. (2009). Angiogenesis in liver disease. *Journal of Hepatology* 50, 604-620.
- Foster, R.G., Golden-Mason, L., Rutebemberwa, A., and Rosen, H.R. (2012). Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Digestive Diseases and Sciences* 57, 381-389.
- Friedman, S.L. (2004). Stellate cells: a moving target in hepatic fibrogenesis. *Hepatology* 40, 1041-1043.
- Friedman, S.L. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134, 1655-1669.
- Friedman, S.L. (2010). Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* 7, 425-436.

- Friedman, S.L., Rockey, D.C., McGuire, R.F., Maher, J.J., Boyles, J.K., and Yamasaki, G. (1992). Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 15, 234-243.
- Gaardbo, J.C., Hartling, H.J., Thorsteinsson, K., Ullum, H., and Nielsen, S.D. (2012). CD3+CD8+CD161high Tc17 cells are depleted in HIV-infection. *AIDS (London, England)*.
- Gaffen, S.L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews Immunology* 9, 556-567.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., and Walker, C.M. (2003). HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science (New York, NY)* 302, 659-662.
- Guido, M., Mangia, A., and Faa, G. (2011). Chronic viral hepatitis: the histology report. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* 43 Suppl 4, S331-343.
- Guillot-Delost, M., Le Gouvello, S., Mesel-Lemoine, M., Cherai, M., Baillou, C., Simon, A., Levy, Y., Weiss, L., Louafi, S., Chaput, N., *et al.* (2012). Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 188, 981-991.
- Hammerich, L., Heymann, F., and Tacke, F. (2011). Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clinical & Developmental Immunology* 2011, 345803.
- Harada, K., Isse, K., Tsuneyama, K., Ohta, H., and Nakanuma, Y. (2003). Accumulating CD57 + CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver International : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 23, 94-100.
- Harris, D.P., Haynes, L., Sayles, P.C., Duso, D.K., Eaton, S.M., Lepak, N.M., Johnson, L.L., Swain, S.L., and Lund, F.E. (2000). Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology* 1, 475-482.
- Haubrich, W.S. (2004). Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology* 127, 16.

- Hernandez-Gea, V., and Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual Review of Pathology* 6, 425-456.
- Hoffmann, K.F., McCarty, T.C., Segal, D.H., Chiaramonte, M., Hesse, M., Davis, E.M., Cheever, A.W., Meltzer, P.S., Morse, H.C., 3rd, and Wynn, T.A. (2001). Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15, 2545-2547.
- Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor, W., Jr., Huber, F.J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, C.J., Rudensky, A.Y., *et al.* (2011). Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* 34, 554-565.
- Huber, S., Gagliani, N., Zenewicz, L.A., Huber, F.J., Bosurgi, L., Hu, B., Hedl, M., Zhang, W., O'Connor, W., Murphy, A.J., *et al.* (2012). IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*.
- Ichikawa, S., Mucida, D., Tyznik, A.J., Kronenberg, M., and Cheroutre, H. (2011). Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 5549-5555.
- Inagaki, Y., and Okazaki, I. (2007). Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* 56, 284-292.
- Ishak, K., Baptista, A., Bianchi, L., Callea, F., De Groote, J., Gudat, F., Denk, H., Desmet, V., Korb, G., MacSween, R.N., *et al.* (1995). Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of Hepatology* 22, 696-699.
- Iwakura, Y., Ishigame, H., Saijo, S., and Nakae, S. (2011). Functional specialization of interleukin-17 family members. *Immunity* 34, 149-162.
- Jabeen, R., and Kaplan, M.H. (2012). The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Current Opinion in Immunology* 24, 303-307.
- Jeong, W.I., Park, O., Radaeva, S., and Gao, B. (2006). STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* 44, 1441-1451.

- Jiang, R., Tan, Z., Deng, L., Chen, Y., Xia, Y., Gao, Y., Wang, X., and Sun, B. (2011). Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* *54*, 900-909.
- Johnstone, J.M., and Lee, E.G. (1976). A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *British journal of Experimental Pathology* *57*, 85-94.
- Kanwal, F., Hoang, T., Kramer, J.R., Asch, S.M., Goetz, M.B., Zeringue, A., Richardson, P., and El-Serag, H.B. (2011). Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* *140*, 1182-1188 e1181.
- Kehlen, A., Thiele, K., Riemann, D., and Langner, J. (2002). Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Experimental Immunology* *127*, 539-546.
- Kluwe, J., Pradere, J.P., Gwak, G.Y., Mencin, A., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Colmenero, J., Bataller, R., and Schwabe, R.F. (2010). Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology* *138*, 347-359.
- Kong, X., Feng, D., Wang, H., Hong, F., Bertola, A., Wang, F.S., and Gao, B. (2012). Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* *56*, 1150-1159.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., and Bettelli, E. (2007). Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in Immunology* *19*, 362-371.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Mirochnitchenko, O.V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R.P., and Pestka, S. (2001). Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta ) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of Biological Chemistry* *276*, 2725-2732.
- Kronenberg, M. (2005). Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual Review of Immunology* *23*, 877-900.
- Kuang, D.M., Peng, C., Zhao, Q., Wu, Y., Zhu, L.Y., Wang, J., Yin, X.Y., Li, L., and Zheng, L. (2010). Tumor-activated monocytes promote expansion of IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T

- cells in hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* *185*, 1544-1549.
- Lefever, S., Hellemans, J., Pattyn, F., Przybylski, D.R., Taylor, C., Geurts, R., Untergasser, A., and Vandesompele, J. (2009). RDML: structured language and reporting guidelines for real-time quantitative PCR data. *Nucleic acids research* *37*, 2065-2069.
- Lemmers, A., Moreno, C., Gustot, T., Marechal, R., Degre, D., Demetter, P., de Nadai, P., Geerts, A., Quertinmont, E., Vercruysse, V., *et al.* (2009). The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* *49*, 646-657.
- Li, J., Qiu, S.J., She, W.M., Wang, F.P., Gao, H., Li, L., Tu, C.T., Wang, J.Y., Shen, X.Z., and Jiang, W. (2012a). Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PloS one* *7*, e39307.
- Li, S., Vriend, L.E., Nasser, I.A., Popov, Y., Afdhal, N.H., Koziel, M.J., Schuppan, D., Exley, M.A., and Alatrakchi, N. (2012b). Hepatitis C virus-specific T cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. *Hepatology*.
- Loffek, S., Schilling, O., and Franzke, C.W. (2011). Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* *38*, 191-208.
- Luedde, T., and Schwabe, R.F. (2011). NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology* *8*, 108-118.
- Lv, K., Zhang, Y., Zhang, M., Zhong, M., and Suo, Q. (2012). Galectin-9 Ameliorates Con A-Induced Hepatitis by Inducing CD4(+)CD25(low/int) Effector T-Cell Apoptosis and Increasing Regulatory T Cell Number. *PloS one* *7*, e48379.
- McMillan, P.N., Ferayorni, L.S., Gerhardt, C.O., and Jauregui, H.O. (1984). Light and electron microscope analysis of lectin binding to adult rat liver in situ. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology* *50*, 408-420.
- Mehal, W.Z., Iredale, J., and Friedman, S.L. (2011). Scraping fibrosis: expressway to the core of fibrosis. *Nature Medicine* *17*, 552-553.

- Melhem, A., Muhanna, N., Bishara, A., Alvarez, C.E., Ilan, Y., Bishara, T., Horani, A., Nassar, M., Friedman, S.L., and Safadi, R. (2006). Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *Journal of Hepatology* *45*, 60-71.
- Mendoza-Figueroa, T., Arguello, C., and Kuri-Harcuch, W. (1988). Culture of proliferating and differentiating fat-storing cells in 3T3-conditioned medium. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* *64*, 29-38.
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S.I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwaisako, K., Liu, X., Zhang, M., *et al.* (2012). Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* *143*, 765-776 e761-763.
- Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., Wilson, M.S., Madala, S.K., Beers, L.M., Ramalingam, T.R., and Wynn, T.A. (2011). Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology* *141*, 2200-2209.
- Muhanna, N., Doron, S., Wald, O., Horani, A., Eid, A., Pappo, O., Friedman, S.L., and Safadi, R. (2008). Activation of hepatic stellate cells after phagocytosis of lymphocytes: A novel pathway of fibrogenesis. *Hepatology* *48*, 963-977.
- Murakami, K., Abe, T., Miyazawa, M., Yamaguchi, M., Masuda, T., Matsuura, T., Nagamori, S., Takeuchi, K., Abe, K., and Kyogoku, M. (1995). Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology* *72*, 731-739.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology* *12*, 233.
- Ngo, Y., Munteanu, M., Messous, D., Charlotte, F., Imbert-Bismut, F., Thabut, D., Lebray, P., Thibault, V., Benhamou, Y., Moussalli, J., *et al.* (2006). A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clinical Chemistry* *52*, 1887-1896.
- Nigam, P., Kwa, S., Velu, V., and Amara, R.R. (2011). Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* *186*, 745-753.

- Novobrantseva, T.I., Majeau, G.R., Amatucci, A., Kogan, S., Brenner, I., Casola, S., Shlomchik, M.J., Kotliansky, V., Hochman, P.S., and Ibraghimov, A. (2005). Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *The Journal of Clinical Investigation* 115, 3072-3082.
- Park, O., Jeong, W.I., Wang, L., Wang, H., Lian, Z.X., Gershwin, M.E., and Gao, B. (2009). Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology* 49, 1683-1694.
- Radaeva, S., Sun, R., Pan, H.N., Hong, F., and Gao, B. (2004). Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 39, 1332-1342.
- Ren, J., Feng, Z., Lv, Z., Chen, X., and Li, J. (2011). Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Rheumatology* 38, 2112-2118.
- Res, P.C., Piskin, G., de Boer, O.J., van der Loos, C.M., Teeling, P., Bos, J.D., and Teunissen, M.B. (2010). Overrepresentation of IL-17A and IL-22 producing CD8 T cells in lesional skin suggests their involvement in the pathogenesis of psoriasis. *PloS one* 5, e14108.
- Riezu-Boj, J.I., Larrea, E., Aldabe, R., Guembe, L., Casares, N., Galeano, E., Echeverria, I., Sarobe, P., Herrero, I., Sangro, B., *et al.* (2011). Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. *Journal of Hepatology* 54, 422-431.
- Rossi, C., Guantario, B., Ferruzza, S., Guguen-Guillouzo, C., Sambuy, Y., Scarino, M.L., and Bellovino, D. (2012). Co-cultures of enterocytes and hepatocytes for retinoid transport and metabolism. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 26, 1256-1264.
- Sanjabi, S., Zenewicz, L.A., Kamanaka, M., and Flavell, R.A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology* 9, 447-453.
- Santodomingo-Garzon, T., and Swain, M.G. (2011). Role of NKT cells in autoimmune liver disease. *Autoimmunity reviews* 10, 793-800.

- Scheuer, P.J. (1991). Classification of chronic viral hepatitis: a need for reassessment. *Journal of Hepatology* *13*, 372-374.
- Seki, E., De Minicis, S., Gwak, G.Y., Kluwe, J., Inokuchi, S., Bursill, C.A., Llovet, J.M., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2009). CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation* *119*, 1858-1870.
- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., and Schwabe, R.F. (2007). TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature Medicine* *13*, 1324-1332.
- Seki, E., and Schnabl, B. (2012). Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of Physiology* *590*, 447-458.
- Seth, D., D'Souza El-Guindy, N.B., Apte, M., Mari, M., Dooley, S., Neuman, M., Haber, P.S., Kundu, G.C., Darwanto, A., de Villiers, W.J., *et al.* (2010). Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcoholism, clinical and experimental research* *34*, 4-18.
- Shariff, M.I., Cox, I.J., Goma, A.I., Khan, S.A., Gedroyc, W., and Taylor-Robinson, S.D. (2009). Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert review of Gastroenterology & Hepatology* *3*, 353-367.
- Shen, F., and Gaffen, S.L. (2008). Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* *41*, 92-104.
- Shevach, E.M. (2011). Biological functions of regulatory T cells. *Advances in Immunology* *112*, 137-176.
- Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D., and Blaner, W.S. (2012). Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et Biophysica Acta* *1821*, 124-136.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., and Walker, C.M. (2003). Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *The Journal of Experimental Medicine* *197*, 1645-1655.
- Siefert, S.A., and Sarkar, R. (2012). Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* *20*, 210-216.



- Sitia, G., Isogawa, M., Iannacone, M., Campbell, I.L., Chisari, F.V., and Guidotti, L.G. (2004). MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *The Journal of Clinical Investigation* *113*, 1158-1167.
- Somerville, R.P., Oblander, S.A., and Apte, S.S. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome biology* *4*, 216.
- Sonnenberg, G.F., Nair, M.G., Kim, T.J., Zaph, C., Fouser, L.A., and Artis, D. (2010). Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of Experimental Medicine* *207*, 1293-1305.
- Sparna, T., Retey, J., Schmich, K., Albrecht, U., Naumann, K., Gretz, N., Fischer, H.P., Bode, J.G., and Merfort, I. (2010). Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF-alpha/IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes. *BMC Genomics* *11*, 226.
- Speletas, M., Argentou, N., Germanidis, G., Vasiliadis, T., Mantzoukis, K., Patsiaoura, K., Nikolaidis, P., Karanikas, V., Ritis, K., and Germenis, A.E. (2011). Foxp3 expression in liver correlates with the degree but not the cause of inflammation. *Mediators of inflammation* *2011*, 827565.
- Swain, M.G. (2008). Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical Science (London, England : 1979)* *114*, 457-466.
- Syn, W.K., Oo, Y.H., Pereira, T.A., Karaca, G.F., Jung, Y., Omenetti, A., Witek, R.P., Choi, S.S., Guy, C.D., Fearing, C.M., *et al.* (2010). Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* *51*, 1998-2007.
- Tacke, F., Zimmermann, H.W., Berres, M.L., Trautwein, C., and Wasmuth, H.E. (2011). Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver International : official journal of the International Association for the Study of the Liver* *31*, 840-849.
- Tahashi, Y., Matsuzaki, K., Date, M., Yoshida, K., Furukawa, F., Sugano, Y., Matsushita, M., Himeno, Y., Inagaki, Y., and Inoue, K. (2002). Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* *35*, 49-61.

- Tiegs, G., Hentschel, J., and Wendel, A. (1992). A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of Clinical Investigation* 90, 196-203.
- Ueki, N., Ohkawa, T., Yamamura, H., Takahashi, K., Tsutsui, T., Kawai, Y., Yokoyama, Y., Amuro, Y., Hada, T., and Higashino, K. (1998). Induction of calponin-h1 by transforming growth factor-beta1 in cultured human ito cells, LI90. *Biochimica et Biophysica Acta* 1403, 28-36.
- van de Bovenkamp, M., Groothuis, G.M., Draaisma, A.L., Merema, M.T., Bezuijen, J.I., van Gils, M.J., Meijer, D.K., Friedman, S.L., and Olinga, P. (2005). Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicological Sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 85, 632-638.
- Van den Steen, P.E., Husson, S.J., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2003a). Carboxyterminal cleavage of the chemokines MIG and IP-10 by gelatinase B and neutrophil collagenase. *Biochemical and Biophysical Research communications* 310, 889-896.
- Van Den Steen, P.E., Wuyts, A., Husson, S.J., Proost, P., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2003b). Gelatinase B/MMP-9 and neutrophil collagenase/MMP-8 process the chemokines human GCP-2/CXCL6, ENA-78/CXCL5 and mouse GCP-2/LIX and modulate their physiological activities. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 270, 3739-3749.
- Vergniol, J., Foucher, J., Terrebonne, E., Bernard, P.H., le Bail, B., Merrouche, W., Couzigou, P., and de Ledinghen, V. (2011). Noninvasive tests for fibrosis and liver stiffness predict 5-year outcomes of patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 140, 1970-1979, 1979 e1971-1973.
- Wang, M., Zhao, D., Spinetti, G., Zhang, J., Jiang, L.Q., Pintus, G., Monticone, R., and Lakatta, E.G. (2006). Matrix metalloproteinase 2 activation of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) and TGF-beta1-type II receptor signaling within the aged arterial wall. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1503-1509.

- Washburn, M.L., Bility, M.T., Zhang, L., Kovalev, G.I., Buntzman, A., Frelinger, J.A., Barry, W., Ploss, A., Rice, C.M., and Su, L. (2011). A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* *140*, 1334-1344.
- Weng, H.L., Liu, Y., Chen, J.L., Huang, T., Xu, L.J., Godoy, P., Hu, J.H., Zhou, C., Stickel, F., Marx, A., *et al.* (2009). The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology* *50*, 230-243.
- Wong, L., Yamasaki, G., Johnson, R.J., and Friedman, S.L. (1994). Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *The Journal of Clinical Investigation* *94*, 1563-1569.
- Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology* *214*, 199-210.
- Xu, L., Hui, A.Y., Albanis, E., Arthur, M.J., O'Byrne, S.M., Blaner, W.S., Mukherjee, P., Friedman, S.L., and Eng, F.J. (2005). Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* *54*, 142-151.
- Yamada, M., Blaner, W.S., Soprano, D.R., Dixon, J.L., Kjeldbye, H.M., and Goodman, D.S. (1987). Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* *7*, 1224-1229.
- Yan, S., Wang, L., Liu, N., Wang, Y., and Chu, Y. (2012). Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunology and Cell Biology* *90*, 421-428.
- Yang, H.R., Chou, H.S., Gu, X., Wang, L., Brown, K.E., Fung, J.J., Lu, L., and Qian, S. (2009). Mechanistic insights into immunomodulation by hepatic stellate cells in mice: a critical role of interferon-gamma signaling. *Hepatology* *50*, 1981-1991.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000). Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes & Development* *14*, 163-176.
- Zenewicz, L.A., and Flavell, R.A. (2011). Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology* *23*, 159-163.

- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., and Flavell, R.A. (2007). Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, 647-659.
- Zenewicz, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Stevens, S., and Flavell, R.A. (2008). Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29, 947-957.
- Zepp, J., Wu, L., and Li, X. (2011). IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends in Immunology* 32, 232-239.
- Zhang, D.Y., and Friedman, S.L. (2012). Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 56, 769-775.
- Zhang, J.Y., Zhang, Z., Lin, F., Zou, Z.S., Xu, R.N., Jin, L., Fu, J.L., Shi, F., Shi, M., Wang, H.F., *et al.* (2010). Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 51, 81-91.
- Zhang, L.J., Zheng, W.D., Shi, M.N., and Wang, X.Z. (2006). Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 12, 1918-1923.
- Zhang, Y., Cobleigh, M.A., Lian, J.Q., Huang, C.X., Booth, C.J., Bai, X.F., and Robek, M.D. (2011). A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* 141, 1897-1906.
- Zhao, L., Tang, Y., You, Z., Wang, Q., Liang, S., Han, X., Qiu, D., Wei, J., Liu, Y., Shen, L., *et al.* (2011). Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PloS one* 6, e18909.
- Zhao, Y., Balato, A., Fischelevich, R., Chapoval, A., Mann, D.L., and Gaspari, A.A. (2009). Th17/Tc17 infiltration and associated cytokine gene expression in elicitation phase of allergic contact dermatitis. *The British Journal of Dermatology* 161, 1301-1306.
- Zhou, Y., Sonobe, Y., Akahori, T., Jin, S., Kawanokuchi, J., Noda, M., Iwakura, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2011). IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 4415-4421.

Zimmermann, H.W., Seidler, S., Gassler, N., Nattermann, J., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2011). Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PloS one* 6, e21381.



