

2011.3011.9

Université de Montréal

**Étude du rôle pathogénique de la formiminotransférase-cyclodésaminase dans  
l'hépatite auto-immune de type 2**

Par

Réginald Rénoüs

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
En vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)  
en Sciences Biomédicales

Mars 2003

© Réginald Rénoüs, 2003



W

4

158

2003

m.019

## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

Page d'identification du jury

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude du rôle pathogénique de la formiminotransférase-cyclodésaminase dans  
l'hépatite auto-immune de type 2**

Présenté par :

Réginald Rénoüs

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Hugo Soudeyns Ph.D.	Président-rapporteur
Dr Fernando Alvarez	Directeur de recherche
Dr Steven R. Martin	Membre du jury

## Résumé

La formiminotransférase-cyclodésaminase humaine (hFTCD), une protéine octamérique retrouvée dans les hépatocytes, a été identifiée comme étant l'autoantigène reconnu par les autoanticorps anti-LC1. Ces autoanticorps sont retrouvés chez 71% des patients atteints d'hépatite auto-immune de type II (HAI de type 2). Des études effectuées avec la FTCD de rat ont montré que cette dernière est associée à la membrane cytosolique de l'appareil de Golgi et peut s'associer aux microtubules de cerveau et à la vimentine, ce qui laisse présager que la FTCD pourrait jouer un rôle de liaison entre l'appareil de Golgi et les différents constituants du cytosquelette des hépatocytes. À ce jour, outre sa double activité enzymatique dans le catabolisme de l'histidine chez les mammifères, aucune autre fonction ne lui a été décernée. De plus, son implication dans l'HAI de type 2 n'est toujours pas connue. Afin de mieux caractériser la hFTCD, nous avons déterminé sa localisation sous-cellulaire dans les hépatocytes, nous avons vérifié l'effet des autoanticorps anti-LC1 sur la liaison hFTCD/Golgi et, finalement, nous avons effectué des tests de liaison pour déterminer si la hFTCD s'associe aux constituants majeurs du cytosquelette des hépatocytes. Nos résultats nous ont permis de constater que la hFTCD est localisée à deux endroits dans les hépatocytes; soit au niveau du cytosol et au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi. Nous avons également constaté que l'association de la hFTCD à l'appareil de Golgi se fait de façon réversible; que les anticorps anti-LC1 favorisent la formation du complexe hFTCD/Golgi et, finalement, qu'aucune interaction entre la hFTCD et les constituants du cytosquelette des hépatocytes n'avait lieu. En conclusion, bien que des études aient montré que la FTCD se lie à des constituants cytosquelettiques extra-hépatiques, nous avons démontré qu'il en est tout autrement avec ceux des hépatocytes. Ce résultat nous mène à conclure que la hFTCD ne participe pas aux interactions entre l'appareil de Golgi et le cytosquelette des hépatocytes. De plus, les résultats obtenus ont montré que la hFTCD s'associe de façon réversible à la membrane de l'appareil de Golgi et que cette association est favorisée par la présence des autoanticorps anti-LC1. Ces autoanticorps reconnaissent les épitopes structuraux de la hFTCD, ce qui nous permet de spéculer que

la hFTCD pourrait avoir été exposée sous sa forme native (octamérique) au système immunitaire et probablement complexée à l'appareil de Golgi.

Mots clés: hépatite auto-immune, formiminotransférase-cyclodésaminase, autoantigène, autoanticorps anti cytosol de foie de type 1 (anti-LC1), appareil de Golgi, microtubules, cytokératine 8 et cytokératine 18.

## Abstract

Human formiminotransferase-cyclodeaminase (hFTCD) is an octameric protein found mainly in hepatocytes. This hepatic enzyme has been identified as the autoantigen recognized by anti-liver cytosol type 1 (anti-LC1) autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis (type 2 AIH) patients. These antibodies are found in 71% of patients with type 2 AIH. Studies have shown that rat FTCD is localized on the cytosolic membrane of the Golgi apparatus and has the ability to bind microtubules from the brain and vimentin. Until today, with the exception of its double enzymatic activity in histidine catabolism pathway, no other function has been discerned, and its implication in type 2 AIH is still unknown. To further understand the possible implication of hFTCD and its related autoantibodies in the pathogenesis of type 2 AIH we localized the hFTCD in liver subcellular fractions and in hepatocytes by, respectively, Western blot and immunofluorescence techniques. Binding studies were also performed between hFTCD and Golgi apparatus (with or without antibodies), or with components of hepatocyte cytoskeleton. This study shows that the hFTCD antigen has two distinct localizations in hepatocytes, in the cytosol and associated with the Golgi membrane. The hFTCD can bind reversibly to the Golgi membrane and, in presence of anti-LC1 antibodies, this Golgi/FTCD complex formation is increased. No interaction between hFTCD and hepatocyte cytoskeleton components was observed. Our results suggest that hFTCD does not bind hepatocyte cytoskeleton and consequently does not participate in Golgi/hepatocyte cytoskeleton interactions. Furthermore, recognition of conformational epitopes of hFTCD by anti-LC1 autoantibodies suggests that hFTCD may have been exposed to the immune system in its native conformation probably when complexed with the Golgi apparatus.

**Keywords:** Autoimmune hepatitis, formiminotransferase-cyclodeaminase, autoantigen, liver cytosol antibodies (anti-LC1), Golgi apparatus, microtubules, cytokeratine 8 and cytokeratine 18.



<b>2. Hépatite auto-immune</b>	26
2.1 Historique	26
2.2 Définition	27
2.3 Caractéristiques Communes	30
2.3.1 Signes cliniques, biologiques et évolution	30
2.3.2 Diagnostic	31
2.3.3 Physiopathologie	31
2.3.4 Histologie	31
2.3.5 Prévalence	32
2.4 Classification	32
2.4.1 Hépatite auto-immune de type 1	33
2.4.2 Hépatite auto-immune de type 2	34
2.4.3 Hépatite auto-immune de type 3	36
2.4.4 Hépatite médicamenteuse	38
2.4.5 Formes frontières de l'hépatite auto-immune	39
2.5 Association maladies cholestatiques et hépatites auto-immunes	39
2.6 Virus hépatotropes et hépatites auto-immunes	40
2.7 Traitements	42
2.8 hFTCD et autoanticorps anti-LC1	43
<b>3. Article: Characterization of the antigenicity of humaine formiminotransferase-cylodaéminase in type 2 autoimmune hepatitis</b>	47
Abstract	48
Introduction	49
Materials and Methods	51
Results	59
Discussion	63
Acknowledgments	69
References	70
Legends	79

Figures	81
<b>4. Discussion et conclusions générales</b>	<b>87</b>
<b>5. Sources documentaires</b>	<b>97</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> Exemples de certaines maladies auto-immunes spécifiques d'organe ou systémique	11
<b>Tableau 2 :</b> Divers types d'autoantigènes	12
<b>Tableau 3 :</b> Taux de concordance de quelques maladies auto-immunes chez les jumeaux monozygotes et dizygotes	19
<b>Tableau 4 :</b> Grille de scores pour le diagnostic de l'hépatite auto-immune tel que proposé par le Groupe International d'hépatite auto-immune	29
<b>Tableau 5 :</b> Les différents types d'hépatites auto-immunes	37

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Tolérance centrale et périphérique	8
<b>Figure 2</b> : Facteurs de susceptibilité	16
<b>Figure 3</b> : Facteurs de prédisposition	23
<b>Figure 4</b> : Différence de la prévalence des principales maladies auto-immunes chez les hommes et les femmes	24
<b>Figure 5</b> : Formes frontières de la maladie hépatique	41
<b>Figure 6</b> : Structure de la formiminotransférase-cyclodésaminase	45

## Liste des abréviations

<b>ALT</b>	<b>Alanine aminotransférase</b>
<b>ANA</b>	<b>Anticorps anti-noyau</b>
<b>ANCA</b>	<b>Anticorps anti-polynucléaire neutrophile</b>
<b>ARN</b>	<b>Acide ribonucléique</b>
<b>ARNm</b>	<b>Acide ribonucléique messenger</b>
<b>CBP</b>	<b>Cirrhose biliaire primitive</b>
<b>cDNA</b>	<b>Acide désoxyribonucléique complémentaire</b>
<b>CMH</b>	<b>Complexe majeur d'histocompatibilité</b>
<b>CSP</b>	<b>Cholangite sclérosante primitive</b>
<b>DOC</b>	<b>Acide désoxycholique</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acide éthylène diamine tétra acétique</b>
<b>EGTA</b>	<b>Acide bis (amino-éthyl) glycol éther NNN'N' tétraacétique</b>
<b>FTCD</b>	<b>Formiminotransférase-cyclodésaminase</b>
<b>g</b>	<b>Gramme</b>
<b>HAI</b>	<b>Hépatite auto-immune</b>
<b>HCA</b>	<b>Hépatite chronique active</b>
<b>HCl</b>	<b>Acide chlorhydrique</b>
<b>hFTCD</b>	<b>Formiminotransférase-cyclodésaminase humaine</b>
<b>HLA</b>	<b>Antigène leucocytaire humain</b>
<b>Ig</b>	<b>Immunoglobuline</b>
<b>IgA</b>	<b>Immunoglobuline A</b>
<b>IgD</b>	<b>Immunoglobuline D</b>
<b>IgE</b>	<b>Immunoglobuline E</b>
<b>IgG</b>	<b>Immunoglobuline G</b>
<b>IgM</b>	<b>Immunoglobuline M</b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropylthio-<math>\beta</math>-galactoside</b>
<b>K8</b>	<b>Cytokératine 8</b>
<b>K18</b>	<b>Cytokératine 18</b>

<b>kDa</b>	<b>Kilodalton</b>
<b>LC1</b>	<b>Antigène cytosolique de foie de type 1</b>
<b>LCHC1</b>	<b>Clone 1 de la partie C-terminale de la hFTCD</b>
<b>LKM1</b>	<b>Antigène microsomal de foie et de rein de type 1</b>
<b>M</b>	<b>Molaire</b>
<b>MAI</b>	<b>Maladies auto-immunes</b>
<b>mg</b>	<b>Milligramme</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>sulfate de magnésium</b>
<b>mM</b>	<b>Millimolaire</b>
<b>ml</b>	<b>Millilitre</b>
<b>mRNA</b>	<b>Acide ribonucléique messenger</b>
<b>MTs</b>	<b>Microtubules</b>
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	<b>Carbonate de sodium</b>
<b>NaCl</b>	<b>Chlorure de sodium</b>
<b>PBS</b>	<b>Tampon phosphate salin</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodécylsulfate de sodium</b>
<b>SMA</b>	<b>Anticorps anti-muscle lisse</b>
<b>TcR</b>	<b>Récepteur des cellules T</b>
<b>μg</b>	<b>Microgramme</b>
<b>μl</b>	<b>Microlitre</b>
<b>μM</b>	<b>Micromolaire</b>

## Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon Directeur de Maîtrise, Le Dr Fernando Alvarez pour son soutien académique, financier, moral ainsi que pour ses nombreux conseils. Sous sa supervision j'ai pu approfondir mes connaissances théoriques et pratiques en plus de développer mon sens critique. Je lui suis également très reconnaissant pour m'avoir fait confiance et m'avoir pris sous sa gouverne.

Je voudrais également remercier tous les Docteurs (es) et collègues de laboratoire avec qui j'ai eu l'honneur de travailler : Idriss Djilali-Saiah Ph.D., Pascal Lapierre, Susana Vitozzi, Gabriel Marceau, Kathie Béland, Dr Steven Martin, Dre Denise Herzog, Dre S.M Park, Thérèse Huynh, Alexi Cloutier et Dr Michel L'Allier. Ensemble nous avons réussi créer une ambiance amicale propice au bon fonctionnement du laboratoire.

J'aimerais remercier tous les gens des départements de Gastroentérologie-Nutrition et d'Immunologie/Microbiologie ainsi que tout le personnel du Centre de Recherche CHU Mère-enfant de l'Hôpital Sainte-Justine.

Finalement, j'aimerais remercier mes parents : Marie-France et Antoine Rénoüs; ma défunte Grand-mère Antonine Hubert-Rénoüs; mes deux frères : Jimmy et Patrick Rénoüs, ma famille, mes amis (es) et ma copine Marie-Chantal qui ont toujours été là pour moi. Ils m'ont toujours supporté et encouragé. Je leurs dédie donc ce mémoire du fond du cœur.

Merci à vous tous

## 1. INTRODUCTION

Le système immunitaire est un système de protection particulièrement sophistiqué qui est contrôlé par un réseau d'organes (moelle osseuse, thymus, rate, ganglions lymphatiques et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Ces organes produisent, stimulent et stockent des millions de cellules spécialisées capables de communiquer et de coopérer entre elles [1, 2]. Le système immunitaire réagit en permanence contre une multitude d'éléments étrangers (virus, bactéries, champignons et parasites) potentiellement pathogènes qui cherchent constamment à s'introduire ou à circuler dans l'organisme. Ce système de défense fait donc la différence entre les éléments appartenant à l'organisme, « *le soi* » qu'il préserve; et les éléments étrangers ou qui le sont devenus, « *le non-soi* » qu'il neutralise et détruit. L'immunité s'adapte ainsi parfaitement à la nature de l'agression et à sa virulence [3, 4].

L'ensemble des mécanismes de défense qui compose le système immunitaire fait appel aux défenses innées (non spécifiques), qui constituent la première ligne de défense; et aux défenses acquises (spécifiques ou adaptatives) qui agissent de concert avec l'immunité innée. Si cette dernière est rompue, l'immunité acquise est activée et produit des éléments spécifiques capables, dans des conditions normales, d'éliminer l'agent infectieux. La réponse immunitaire innée, tout comme l'acquise, repose sur un ensemble de cellules et de facteurs solubles distribués dans tout l'organisme. L'ensemble de ces cellules et de ces substances solubles peuvent agir dans les deux réponses [5].

## 1.1 LES TYPES D'IMMUNITÉ

### 1.1.1 Immunité innée (non-spécifique)

L'immunité innée est l'ensemble des mécanismes que possède un individu dès sa naissance. Étant non spécifique, cette immunité attaque toutes les cibles sans distinction tout en reconnaissant sans ambiguïté le soi du non-soi. Les mécanismes qui composent cette immunité ont une action rapide et agissent en collaboration pour former une première ligne de défense contre les macromolécules étrangères, les micro-organismes infectieux ou leurs produits (toxines) avant qu'ils ne causent des infections. Grâce à ces mécanismes, les maladies infectieuses sont heureusement très rare, et ce, bien que l'organisme soit constamment exposé à des agents infectieux [2, 3, 6].

#### 1.1.1.1 Les principaux mécanismes de l'immunité innée

La peau et les muqueuses agissent comme des barrières physiologiques, alors que les enzymes digestives (enzymes protéolytiques) retrouvées dans les liquides organiques ont le pouvoir de détruire certains organismes envahisseurs [6, 7]. De plus, les cellules ayant des fonctions immunitaires innées spécifiques répondent rapidement à l'invasion en détruisant les organismes étrangers. Parmi ces cellules on retrouve : **a)** les cellules tueuses naturelles (NK) qui sont des lymphocytes ayant une activité cytotoxique spontanée. Ces cellules sont capables de reconnaître des modifications au niveau des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH 1) se trouvant à la surface des cellules du corps sans stimulation préalable [4] ; **b)** les cellules productrices de médiateurs de l'inflammation ; **c)** les monocytes dont font partie les macrophages et **d)** les leucocytes polynucléaires qui peuvent, tout comme les monocytes, phagocyter les micro-organismes pour ensuite les détruire [2, 6]. Les leucocytes polymorphonucléaires circulent dans le sang, et peuvent migrer rapidement dans les tissus suite à des stimuli produits par les corps étrangers et les substances indésirables. Les monocytes circulant peuvent eux aussi migrer du sang vers les tissus. Certains d'entre eux, les macrophages, sont

généralement déjà présents dans tous les tissus organiques [7]. Toutes ces cellules peuvent également synthétiser et sécréter de nombreuses substances, dont les cytokines et certaines enzymes, qui protègent l'organisme contre les infections et qui facilitent le développement d'une réponse immunitaire appropriée [2, 6].

Une réponse inflammatoire induite par différents systèmes accompagne souvent la réponse immunitaire et constitue un mécanisme important dans la défense contre l'infection.

Le système du complément est un autre composant du système immunitaire qui participe à la protection contre certains micro-organismes. Il constitue l'un des principaux médiateurs des réactions inflammatoires. Le système du complément peut également jouer un rôle dans l'immunité acquise [5].

### **1.1.2 Immunité acquise (spécifique ou adaptative)**

Contrairement à l'immunité innée qui est présente chez tous les organismes vivants, l'immunité acquise est la forme la plus spécialisée de l'immunité. Cette dernière se développe tardivement dans l'évolution et est retrouvée exclusivement chez les vertébrés. La réponse immunitaire acquise complète la réponse innée et constitue un système de défense spécifique et très efficace [6]. Les principales caractéristiques de l'immunité acquise sont la spécificité et la mémoire [8]. Cette immunité permet de répondre spécifiquement au non-soi après une première infection. Elle reconnaît le non-soi par ses antigènes, des substances identifiées comme étrangères et potentiellement dangereuses pour l'organisme.

L'immunité acquise a développé deux voies de reconnaissance de l'antigène : l'immunité humorale, c'est-à-dire la production d'immunoglobulines (Ig) (ou anticorps) fabriquées par les lymphocytes B qui agissent sur des antigènes extra-cellulaires; et l'immunité à médiation cellulaire, c'est-à-dire la reconnaissance par les lymphocytes T des antigènes intra-cellulaires présentés par les molécules du CMH à la surface de cellules de l'organisme.

La différence majeure entre ces deux types d'immunité se situe au niveau de la reconnaissance de l'antigène. En effet, les anticorps reconnaissent généralement les antigènes intacts alors que les lymphocytes T peuvent uniquement distinguer des fragments antigéniques présentés en association avec des molécules du CMH présents à la surfaces des cellules présentatrices d'antigènes [4, 5].

### 1.1.2.1 Immunité humorale

La réponse humorale constitue l'élément défensif essentiel contre certains virus et les bactéries à multiplication extra-cellulaire [3, 4] (la plupart des bactéries pathogènes, notamment les staphylocoques et les streptocoques, les clostridies et de nombreux germes à Gram négatif). En revanche, les défenses contre de nombreux virus, les bactéries à multiplication intra-cellulaire (multiplication dans les phagocytes), les tumeurs et les greffes d'organes sont essentiellement assurés par la réponse à médiation cellulaire [3].

Les effecteurs moléculaires de la réponse humorale sont les anticorps constitués par les différentes immunoglobulines (Ig) présentes à la surface des plasmocytes ou à l'état soluble dans le plasma et la plupart des autres liquides biologiques de l'organisme.

Les mammifères produisent cinq isotypes différentes d'anticorps appelées IgG, IgA, IgM, IgD et IgE. Chacune de ces classes possède une structure chimique différente et joue un rôle biologique précis [7]. Les immunoglobulines portent à leur surface des sites de reconnaissances variables (Fab) capables d'interagir activement avec les antigènes du non-soi [4, 5]. La fraction constante (Fc) des anticorps assurent la coordination avec d'autres fonctions du système immunitaire telles que l'activation du complément et les interactions avec les macrophages et d'autres cellules du système immunitaire [5].

Toutes les classes d'immunoglobulines sont présentes dans le sang, mais l'immunoglobuline G (IgG) est la classe prédominante. Elle constitue même l'une des principales protéines du sérum. Les anticorps IgM sont activés dans le sang au

tout début de la réponse immunitaire et les IgA sont sécrétés dans les liquides gastro-intestinaux et pulmonaires, la sueur et la salive. L'IgE intervient dans les réponses anaphylactiques (libération d'histamine) et allergiques, et peut jouer un rôle important dans la protection contre les parasites. On ignore quelle est la fonction exacte des IgD circulantes [3, 7].

Les anticorps se lient spécifiquement aux organismes et aux substances du non-soi, ce qui a souvent pour résultat l'inactivation des propriétés indésirables. Les complexes antigènes/anticorps sont éliminés de l'organisme par divers processus, et les micro-organismes recouverts d'anticorps sont particulièrement vulnérables à la phagocytose des macrophages et d'autres cellules. Après avoir interagit avec un antigène, les anticorps déclenchent une multitude de mécanismes immunobiologiques annexes de protection [3, 5].

#### **1.1.2.2 Immunité à médiation cellulaire**

L'immunité à médiation cellulaire est assurée par les lymphocytes T. Pour chaque antigène détecté, des cellules T spécifiques sont produites et chaque clone de cellules T possède à sa surface des récepteurs moléculaires d'une même spécificité surnommés TcR (recepteur des cellules T). Chaque clone de lymphocytes T exprime un récepteur différent.

Contrairement à la réponse humorale, il n'existe pas dans la réponse à médiation cellulaire une forme soluble et diffusible du TcR similaire à l'anticorps. Ces récepteurs restent liés en permanence aux lymphocytes T [6]. Lorsque les récepteurs interagissent avec l'antigène, ils activent un certain nombre de fonctions immunobiologiques qui peuvent résulter en une production de lymphocytes T cytotoxiques (cellules T CD8+), macrophages et de lymphocytes B via les lymphocytes T auxiliaires CD4+ [1].

### 1.1.2.3 Contrôle du développement de l'immunité acquise

Le système immunitaire acquis est étroitement régulé. Ainsi, les lymphocytes T contrôlent la sécrétion des anticorps par les lymphocytes B. Ils libèrent des cytokines et d'autres molécules à action biologique puissante qui accroissent ou inhibent l'activation, la maturation et la capacité de sécréter les immunoglobulines appropriées chez les lymphocytes B. À leur tour, les lymphocytes B, ainsi que d'autres types de cellules, sécrètent des cytokines qui modulent l'immunité [1, 2].

## 1.2 TOLÉRANCE AU SOI : Discrimination entre le soi et le non-soi

On appelle tolérance un état d'incapacité à répondre à un antigène [2]. En temps normal le système immunitaire ne réagit pas contre les antigènes du soi. L'organisme humain dispose de plusieurs mécanismes immunitaires qui concilient la lutte contre les organismes étrangers et la sauvegarde du soi. Ainsi, les cellules du système immunitaire apprennent à tolérer toutes les cellules et substances propres à l'organisme, de sorte que notre système immunitaire ne réagit pas contre ses propres constituants [4, 9]. La tolérance face aux constituants du soi est normalement induite durant le développement du système immunitaire afin d'éviter les maladies auto-immunes. Par contre, l'insensibilité au soi doit être maintenue par une exposition constante des antigènes (désignée par le terme générique de tolérogène). L'exposition persistante des tolérogènes est importante pour induire la tolérance au soi tant lors du développement des précurseurs lymphoïdes immatures dans les organes lymphoïdes centraux que dans les organes lymphoïdes secondaires (périphériques) chez les cellules T et B matures [10].

La tolérance au soi est générée à deux niveaux. Le niveau supérieur : la tolérance centrale qui se développe principalement lors de la vie fœtale et lors des premières semaines de la vie; et le niveau inférieur : la tolérance périphérique qui se développe durant la période post-natale à titre de processus de protection supplémentaire. Il est à noter qu'une tolérance centrale défaillante pave la voie aux

maladies auto-immunes (MAI), alors qu'une tolérance périphérique défaillante permet le processus de développement des MAI [11] (Figure 1).

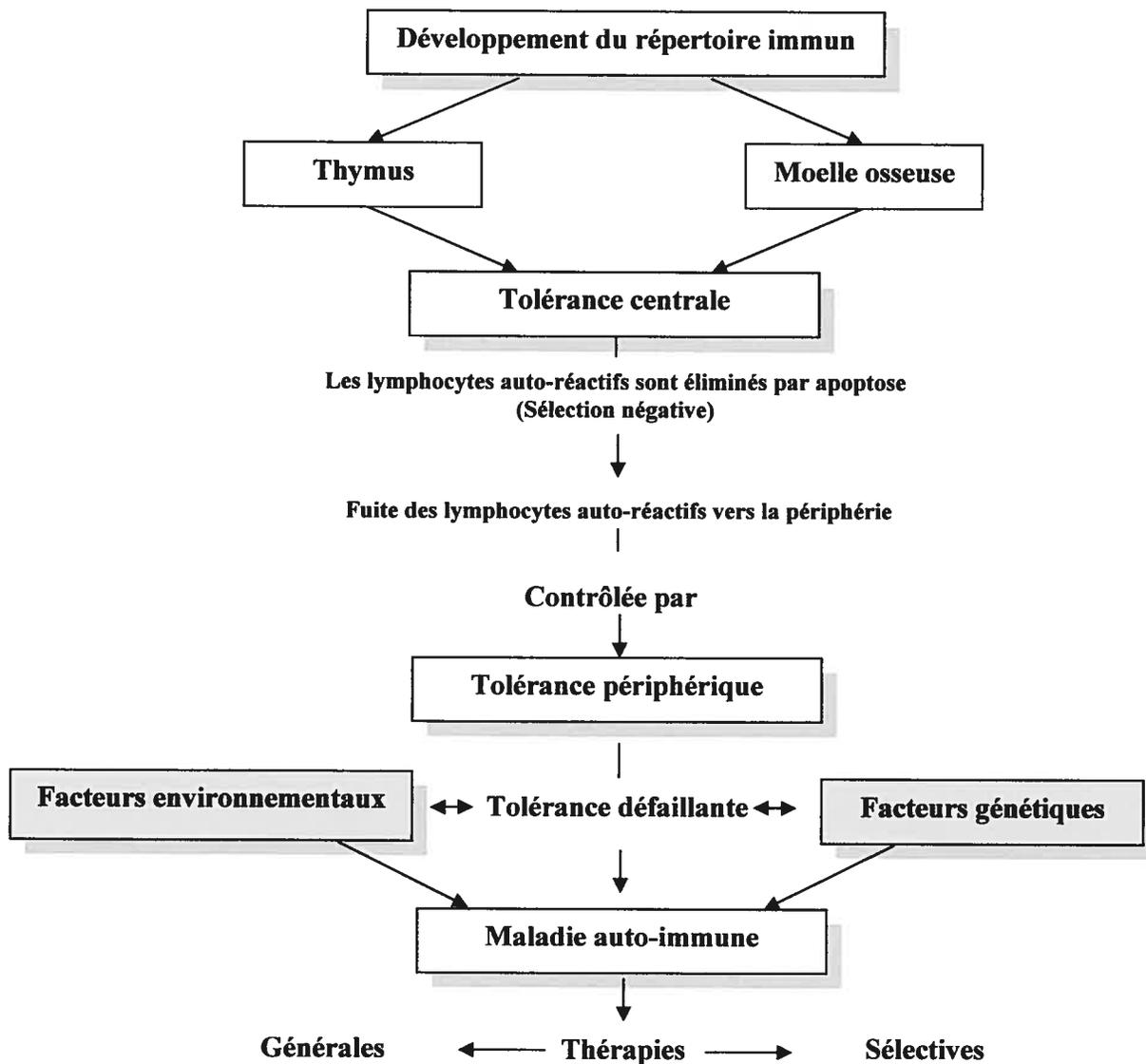
### 1.2.1 Tolérance centrale

Au cours de la lymphopoïèse, les lymphocytes apprennent à réagir avec les antigènes dans les organes lymphoïdes centraux (thymus et moelle osseuse). Durant le réarrangement aléatoire des gènes qui codent pour les récepteurs (TcR ou Anticorps), les lymphocytes T et B immatures sont exposés à des signaux antigéniques provenant des molécules du soi. Les cellules T ou B ayant une faible interaction et une faible affinité pour les constituants du soi sont préservées et sont aptes à faire partie du répertoire des cellules immunitaires. C'est ce qu'on surnomme la sélection positive. Par contre, les cellules T et B qui ont une trop forte interaction et une forte affinité avec les autoantigènes sont vouées à mourir par apoptose. C'est le phénomène de la sélection négative [12, 13].

### 1.2.2 Tolérance périphérique

La sélection négative n'assure pas la délétion complète de tous les lymphocytes auto-réactifs. Les lymphocytes T et B qui réussissent à fuir la sélection négative sont sujets aux mécanismes retrouvés dans la tolérance périphérique. Comme son nom l'indique, la tolérance périphérique est acquise par les lymphocytes matures dans les tissus périphériques, à l'opposé de la tolérance centrale qui est acquise par les lymphocytes immatures au cours de leur développement [2]. Les mécanismes d'homéostasie qui composent la tolérance périphérique incluent le maintien de l'ignorance des lymphocytes, l'anergie des lymphocytes (les lymphocytes sont paralysés c'est-à-dire incapables d'être activés) et la régulation par des lymphocytes T suppressifs (Ts) ou régulateurs (Tr) désignés (lymphocytes T CD4+ ou CD8+) qui peuvent induire l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes autoréactifs. [11, 14].

**Figure 1: Tolérance centrale et périphérique**



Basée sur la figure de la revue : BMJ 2000 vol. 321; 93-96

**Figure 1: La tolérance centrale est acquise au niveau des organes lymphoïdes primaires et la tolérance périphérique au niveau des organes lymphoïdes secondaires. Une tolérance centrale défailante pave la voie aux maladies auto-immunes (MAI), alors qu'une tolérance périphérique défailante permet le processus de développement des MAI.**

### 1.3 IMMUNITÉ ET MALADIES

Les processus immunologiques sont normalement bénéfiques. Cependant, l'apparition d'une immunité inadéquate peut provoquer des maladies ou du moins des effets cliniques indésirables. Lorsque le système immunitaire est altéré, il provoque des conditions pathologiques appelées immunodéficiences primaires. Ces maladies qui sont de gravité variable peuvent affecter l'immunité innée et acquise et peuvent mettre en jeu les réponses humorales ou cellulaires. D'autres immunodéficiences, appelées secondaires, peuvent être causées par des virus, la malnutrition ou des médicaments. Une réactivité immunologique excessive (hypersensibilité) peut aboutir à des troubles tels que l'anaphylaxie, l'allergie et l'asthme, tandis que les troubles de la tolérance au soi peuvent se traduire par des maladies auto-immunes (MAI) affectant un ou plusieurs tissus ou organes [2, 3, 5, 6, 8].

### 1.4 MALADIES AUTO-IMMUNES : Perte de la tolérance au soi

La conséquence d'une réponse inappropriée du système immunitaire contre un ou plusieurs constituants tissulaires du soi suite à une activation des lymphocytes T et/ou B auto-réactifs mène aux MAI [9, 15]. Dans la plupart des cas, les événements à l'origine d'une réponse immunitaire contre les constituants du soi sont inconnus [16]. À ce jour, la problématique de fond concerne l'identification des différences qui opposent l'autoréactivité dite «physiologique», et présente chez tous les individus sains, à celle responsable des pathologies. De nombreux efforts sont actuellement déployés afin d'aboutir à une meilleure compréhension des mécanismes favorisant le déclenchement des MAI [17].

Longtemps considérée comme une éventualité rare, la survenue de phénomènes auto-immuns est aujourd'hui avancée comme le mécanisme induisant un nombre important de maladies [9]. Ces maladies, à l'exception de l'arthrite rhumatoïde et la thyroïdite auto-immune, sont individuellement rares. Par contre, l'ensemble des MAI affecte 3 à 5 % de la population générale [18], ce qui constitue le troisième processus pathologique en importance après les maladies

cardiovasculaires et le cancer. Leur apparition est plus fréquente chez la femme (près de 80% des personnes atteintes) en raison de l'action immunosuppressive des hormones mâles (androgène) [9]. Pour la plupart, ces maladies sont classées selon les organes ou les tissus endommagés par la réponse auto-immune ou selon la pathologie associée aux dommages immunitaires [15, 19] (Tableau 1).

La liste des maladies auto-immunes ou des maladies suspectées d'avoir une base auto-immune s'accroît d'année en année [6, 15]. Il existe une maladie auto-immune spécifique associée à la plupart des organes du corps impliquant habituellement une réponse dirigée contre un autoantigène exprimé uniquement dans l'organe touché (Tableau 2). Dans d'autres maladies auto-immunes, tel le lupus érythémateux disséminé, aucun type particulier de cellule ne semble être ciblé. Par contre, la réponse semble être dirigée contre des antigènes largement exprimés chez l'hôte [20, 21]. En soi, toutes les molécules de l'organisme, pourvu qu'elles aient une taille suffisante, peuvent se comporter comme des autoantigènes et donner lieu à une réaction auto-immune [9].

**Tableau 1: Exemples de maladies auto-immunes spécifiques d'organe ou systémiques**

Maladies	Organe	Mécanisme de lésion	Prévalence (%)
<u>Maladies auto-immunes spécifiques d'organe</u>			
Thyroïdite auto-immune	Thyroïde	Cellules T/anticorps	1,0-2,0
Gastrite	Estomac	Cellules T/anticorps	1-2 chez les 60 ans et +
Maladie coeliaque	Petit intestin	Cellules T/anticorps	0,2-1,1
Maladie Grave	Thyroïde	Anticorps	0,2-1,1
vitiligo	Mélanocytes	Cellules T/anticorps	0,4
Diabète insulino-dépendant	Cellules $\beta$ du pancréas	Cellules T	0,2-0,4
Sclérose en plaques	Cerveau / moelle épinière	Cellules T	0,01-0,15
Pemphigus	Peau	Anticorps	< 0,01-3,0
Hépatite auto-immune	Foie	Cellules T/anticorps	< 0,01
Myasthénie grave	Muscle	Anticorps	< 0,01
Cirrhose biliaire primitive	Voie biliaire hépatique	Cellules T/anticorps	< 0,01
<u>Maladies auto-immunes systémiques</u>			
Arthrite rhumatoïde	Articulations, cœur, poumons, etc	Cellules T/anticorps	0,8
Lupus érythémateux	Peau, articulations, reins, cerveau, poumons cœur, etc	Anticorps	0,1
Polymyosite/ dermatomyosite	Muscles squelettiques, Poumons, cœur, articulations, etc	Cellules T/anticorps	< 0,01

Basé sur le tableau de la revue: Nature Medecine 2001; Vol.7, No 8:899-905

**Les maladies auto-immunes listées dans ce tableau sont classées par catégories (spécificité d'organe versus systémique) et selon leur prévalence.**

## Tableau 2 : Divers types d'autoantigènes

	<i>Localisation / Fonction</i>	<i>Distribution</i>
<b><i>Protéines structurales</i></b>		
Histones	Chromatine	Ubiquitaire
Lamines	Enveloppe nucléaire	Ubiquitaire
Myosine	Myofibrilles	Muscle strié
Desmogléines	Desmosomes	Peau
Collagène IV	Membrane basale	Rein
<b><i>Protéines Fonctionnelles</i></b>		
Cycline (PCNA)	Activateur de la d-polymérase	Ubiquitaire
Facteur intrinsèque	Transport vitamine B12	Estomac
Récepteurs de la TSH	Fixation de la TSH	Thyroïde
Immunoglobuline	Immunologique	sang
<b><i>Hormones</i></b>		
Insuline	Métabolisme du glucose	Pancréas
Thyréoglobuline	Fonction thyroïdienne	Thyroïde
<b><i>Enzymes</i></b>		
Topo-isomérase	Relaxation de l'ADN	Ubiquitaire
Pyruvate-déshydrogénase	Mitochondries	Ubiquitaire
H <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase	Formation de HCl	Estomac
Myéloperoxidase	Bactéricide	Granulocytes
Thyroperoxidase	Iodination T4	Thyroïde
<b><i>Acides nucléiques</i></b>		
ADN	Support génétique	Ubiquitaire
ARN	Transcription	Ubiquitaire
Complexes ribonocléoprotéiques		
U <sub>1</sub> RNP	Splicéosomes	Ubiquitaire
<b><i>Lipides</i></b>		
Phospholipides	Membrane cellulaire	Ubiquitaire
Cardiolipine	Coagulation	Ubiquitaire
Gangliosides	Cellules nerveuses	Système nerveux

Tableau Basé du livre : Auto-anticorps et maladies auto-immune 2<sup>ième</sup> édition, RL Humbel, Collection Option Bio, Elsevier 1997

### 1.4.1 Auto-immunité et pathogénicité

Selon la théorie de la sélection clonale de Burnet, les lymphocytes auto-réactifs sont éliminés dans les organes lymphoïdes centraux lors de leur différenciation. Étant donné que la sélection négative n'est pas absolue, il n'est pas rare de retrouver des lymphocytes auto-réactifs chez des individus sains. Ces clones auto-réactifs ne sont pas pathogéniques en temps normal [22]. En fait, la persistance des cellules auto-réactives à l'intérieur du répertoire des lymphocytes naturels chez différentes espèces animales suggère que l'auto-immunité joue un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme. En effet, les autoanticorps sont impliqués dans un circuit immunorégulateur via des interactions idiotypiques contribuant à la défense contre les pathogènes et à la clairance des constituants du soi modifiés [9, 14, 23]. Des évidences selon lesquelles les lymphocytes T auto-immuns pourraient également être impliqués dans le maintien de l'homéostasie en permettant le rétablissement des tissus endommagés, spécialement au niveau du système nerveux central, ont récemment été proposées [24].

En soi, l'auto-immunité devient pathogénique lorsque la réponse immunitaire est persistante et résulte en une émergence incontrôlée des effecteurs auto-réactifs activés. Le développement d'une MAI fulminante nécessite une infiltration importante des effecteurs auto-réactifs dans l'organe ou tissus ciblés via les micro-vaisseaux locaux ayant subis des modifications morphologiques lors de l'inflammation [25].

Plusieurs mécanismes pourraient être responsables de l'activation des lymphocytes auto-réactifs dans les MAI. On retrouve entre autre les mécanismes impliquant le mimétisme moléculaire, la libération d'autoantigènes suite à l'inflammation, les superantigènes viraux ou bactériens, les antigènes du soi altérés, une expression ectopique ou inappropriée d'un gène HLA ou de molécules co-stimulatrices. Étant donné la complexité des MAI, il est peu probable qu'un seul mécanisme soit responsable des différents processus menant à l'auto-immunité. De

plus, différents mécanismes peuvent être opérationnels pendant différentes étapes de la pathogenèse [9, 26, 27].

Il est important de retenir que l'activation des lymphocytes auto-réactifs est nécessaire, mais n'est pas suffisante pour induire le développement des MAI. Les événements qui déclenchent l'initiation de l'auto-immunité doivent induire une expansion des clones auto-réactifs suffisamment importante et un microenvironnement de cytokines adéquat pour permettre le développement des MAI [26].

#### **1.4.2 Facteurs de susceptibilité**

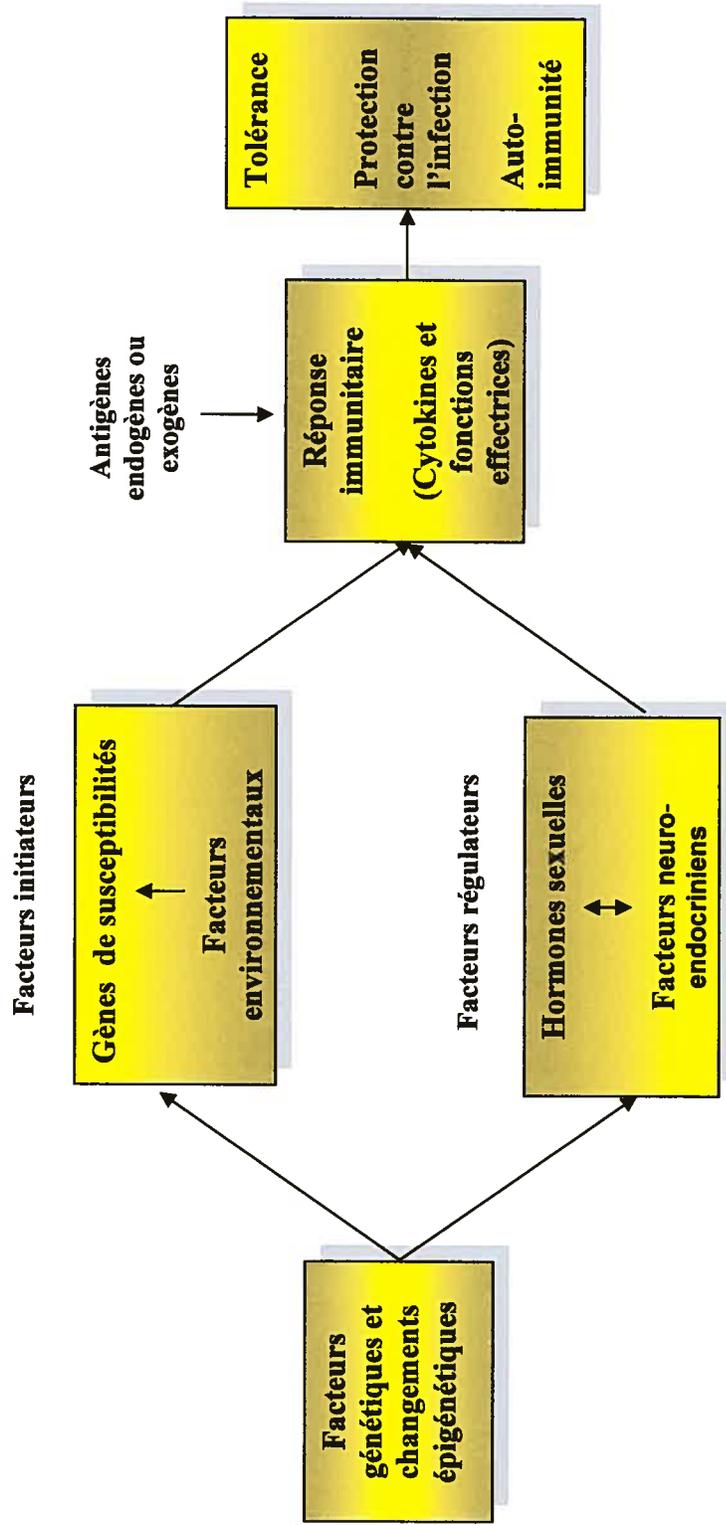
On ne sait toujours pas si les maladies auto-immunes résultent d'une sélection aberrante ou d'une délétion incomplète des cellules auto-réactives. Cependant, il est évident que des facteurs génétiques, environnementaux et sexuels influencent la composition et le contrôle du répertoire des cellules auto-réactives [22] (Figure 2).

##### **1.4.2.1 Facteurs génétiques**

Bien que les MAI ne soient pas des maladies héréditaires au sens strict du terme, il semble que leur apparition soit placée sous le contrôle de gènes dits « de prédisposition » [11, 17, 28]. Des modifications géniques chez des souris ont permis d'identifier au moins 25 gènes contribuant à la prédisposition des MAI lorsqu'ils sont surexprimés ou supprimés [29]. Certains de ces gènes sont similaires chez les rongeurs et chez les humains [30]. La présence de ces gènes, qui ne sont que partiellement identifiés, est nécessaire sans être pour autant suffisante à l'apparition des MAI [17]. Pour la plupart, ces gènes codent pour des cytokines ou des molécules apparentées aux cytokines impliquées dans les cascades signalétiques; des molécules de co-stimulation; des co-récepteurs antigéniques; des molécules impliquées dans la voie menant ou inhibant l'apoptose; etc. Il est désormais connu qu'une certaine base génétique chez l'hôte est nécessaire pour qu'un gène particulier ou une mutation puisse provoquer une MAI. Certains de ces défauts génétiques

peuvent rendre des sujets susceptibles à développer plus d'une MAI, ce qui laisse croire que plusieurs MAI pourraient suivre une voie pathogénique commune [29].

**Figure 2: Facteurs de susceptibilité**



Basée sur la figure de la revue : Nature Immunology 2001 ; Vol. 2 No. 9 : 777-780

Bien que les mécanismes pathogéniques responsables de l'initiation de l'auto-immunité restent peu compris, il est clair que la prédisposition génétique constitue un maillon important dans la susceptibilité aux MAI [31].

Les différents gènes de susceptibilité peuvent agir selon deux voies. La première voie détermine le tissu et la spécificité de la maladie en ciblant la réponse immunitaire sur un autoantigène particulier. Par exemple, les gènes qui codent pour les molécules du CMH peuvent déterminer quels autoantigènes seront présentés au système immunitaire; les gènes qui codent pour la spécificité des récepteurs des lymphocytes T et B déterminent quant à eux les molécules à attaquer; et d'autres gènes influencent la susceptibilité d'un tissu cible particulier à une attaque auto-immune. L'autre voie influence la susceptibilité générale aux MAI via les gènes impliqués dans la tolérance, l'apoptose ou dans la réponse inflammatoire. Ces gènes expliquent la tendance familiale de l'auto-immunité [11]. En effet, il n'est pas rare de retrouver dans une même famille plusieurs cas de maladies auto-immunes [30]. De plus, le taux de concordance pour des MAI est plus élevé chez les jumeaux monozygotes (identiques) que chez les jumeaux hétérozygotes (non-identiques), allant respectivement selon les études de 12% à 70% et de 0 à 20% dépendamment du type de MAI [31-34] (Tableau 3).

Bien que l'évidence d'une tendance familiale existe, le profil génétique des MAI chez les humains et leurs modèles animaux est généralement complexe et multi-génique, c'est-à-dire qu'il implique apparemment plusieurs gènes de prédispositions qui travaillent de concert pour produire un phénotype anormal [30, 31]. Ces interactions peuvent résulter d'un effet synergique, additif ou inhibiteur si l'un des gènes code pour un produit qui annule l'effet des gènes de prédisposition [6].

Certains polymorphismes génétiques peuvent également être présents dans une population générale, mais ces derniers n'ont aucune influence sur les fonctions immunitaires normales. Par contre, la présence d'un ou plusieurs gènes de

susceptibilité peut contribuer à l'auto-immunité [35, 36], ce qui rend la recherche sur les gènes de susceptibilité ardue [6].

**Tableau 3 : Taux de concordance de quelques maladies auto-immunes chez les jumeaux monozygotes et dizygotes**

Maladies	Taux de concordance (%)			Prévalence de la Population (%)
	Jumeaux Monozygotes	Jumeaux Homyozygotes	Fratrie	
<b>IDM</b>	<b>30-50</b>	<b>0-13</b>	<b>6</b>	<b>0,4</b>
<b>SP</b>	<b>25</b>	<b>0-5</b>	<b>3-5</b>	<b>0,1</b>
<b>SLE</b>	<b>24-57</b>	<b>2-5</b>	<b>2-5</b>	<b>0,2</b>
<b>AR</b>	<b>12-15</b>	<b>3-4</b>	<b>2-4</b>	<b>0,24-1,0</b>

IDM : Diabète insulino-dépendant Méllitus  
 SLE : Lupus Érythémateux Systémique

SP : Sclérose en plaques  
 AR : Arthrite Rhumatoïde

Basé du tableau de la revue : Nature Immunology 2001; Vol 2 No 9, 802-809

Étant donnée la nécessité d'une combinaison particulière de gènes pour l'initiation des différentes MAI [26], on ne retrouve qu'une faible fraction de la population ou certains groupes ethniques spécifiques prédisposés à développer une MAI particulière [26, 31].

Certains des gènes de susceptibilité, tels les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), confèrent un niveau de risque beaucoup plus élevé que d'autres pour l'initiation et le développement des MAI [37].

Considérant le rôle fondamental des molécules du CMH dans la présentation des antigènes (étrangers ou du soi) au système immunitaire, il est sans surprise que des allèles (HLA) particuliers des gènes du CMH soient fortement associés avec la susceptibilité de causer une MAI ou dans la protection contre le développement des MAI [22]. La majorité des MAI sont associées à une molécule HLA de classe I ou de classe II particulière [37]. Par contre cette association requiert une combinaison avec un ou plusieurs autres gènes [38, 39].

Certains allèles HLA ont un effet protecteur contre les MAI, et ce, même en présence d'allèles de susceptibilité [35, 36]. C'est le cas de l'allèle HLA-DQB1\*0602 qui même en présence de l'un des deux gènes de prédisposition HLA-DQB1\*0201 ou HLA-DQ\*0302 empêche le développement du diabète de type 1 [40]. L'association d'allèles HLA avec des MAI particulières peut varier selon différentes populations. Par exemple, les HLA de classe II DRB1\*0401 et DRB1\*0404 sont fortement associés à l'arthrite rhumatoïde chez les personnes originaire du nord de l'Europe [41], mais ne le sont pas ni dans la population Noire, ni dans la population provenant d'Amérique centrale ou du sud [42, 43].

Sommairement, la prédisposition à une MAI représente l'effet net des gènes de susceptibilité et de protection [44, 45]. Puisque chaque gène de susceptibilité confère son propre niveau de risque, la prédisposition aux MAI dépend de la présence d'une combinaison particulière de gènes de prédisposition ou de protection.

Ces gènes pourraient également contrôler la vulnérabilité des organes cibles ainsi que l'accessibilité des antigènes dans ces organes [29].

#### **1.4.2.2 Facteurs environnementaux**

En regard des différents résultats obtenus des études effectuées dans la population, dans les familles et chez les jumeaux, il est clair que l'aspect génétique constitue le facteur majeur de la prédisposition aux MAI. Par contre, puisque le taux de concordance pour les diverses MAI est imparfait chez les jumeaux monozygotes, l'aspect environnemental semble être nécessaire pour amorcer le processus d'auto-immunité [31, 46] (Figure 3). Les données provenant d'études épidémiologiques sur des populations génétiquement semblables, mais vivant dans différentes conditions appuient fortement l'implication des facteurs environnementaux dans la susceptibilité aux MAI. Il a été observé que l'incidence du diabète de type 1 ainsi que de la sclérose en plaques est distribuée de manière géographiquement non-aléatoire. En effet, Les individus vivants en haute latitude ou dans certaines localités particulières sont plus susceptibles de développer ces maladies. Ces données suggèrent que la susceptibilité augmente significativement selon l'environnement local [47-50]. La cause étiologique de ces observations est inconnue, bien que les infections microbiennes ou virales pourraient être impliquées dans le déclenchement des MAI [31]. Il reste cependant beaucoup à apprendre dans ce domaine, car peu de facteurs environnementaux ont pu être jusqu'alors directement impliqués dans l'apparition des MAI [17].

#### **1.4.2.3 Facteur hormonal**

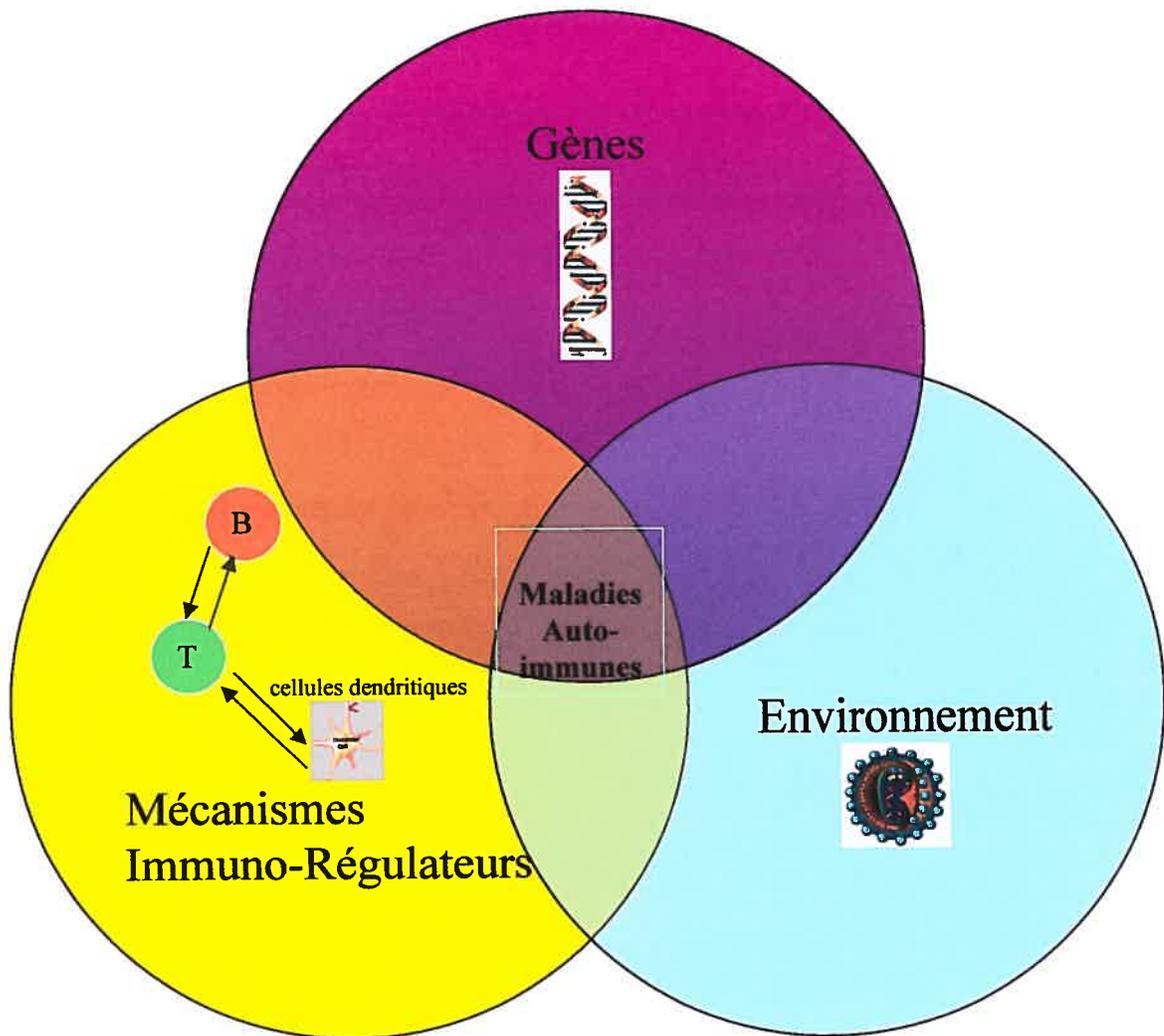
Parmi les différents facteurs qui semblent influencer l'expression des MAI on ne doit pas exclure le facteur hormonal. En effet, les hormones affectent la fonction cellulaire immunitaire et par conséquent l'activité du système immunitaire. Ainsi, on associe de plus en plus certaines hormones à l'auto-immunité, car l'expression et la sévérité des symptômes de plusieurs MAI semblent être reliées à des changements au niveau hormonal [51].

Bien que le mécanisme par lequel les hormones agissent sur l'auto-immunité reste un mystère, plusieurs données supportent l'idée que les hormones sexuelles en association avec des facteurs génétiques (HLA), le sexe et l'âge soient reliées à l'expression de certaines MAI. En effet, on retrouve une plus grande incidence de MAI chez les individus du sexe féminin [17] (Figure 4). À ce jour, aucune étude n'a pu apporter des évidences sur la responsabilité directe des hormones sexuelles au niveau de la différence d'incidence des MAI entre les hommes et les femmes. Par contre, il est proposé que les androgènes (tel la testostérone) et la progestérone aient un effet de suppression (et donc de protection) sur l'immunité, la prolactine un effet stimulateur, alors que les estrogènes, ciblés comme étant un facteur important dans la susceptibilité à l'auto-immunité, semblent avoir un effet stimulateur ou un effet inhibiteur sur le système immunitaire [51].

De plus, les symptômes reliés à certaines MAI varient selon les changements hormonaux naturels des estrogènes et de progestérones tels lors du cycle menstruel, la grossesse et la ménopause. En effet, il a été remarqué que l'apparition de certaines MAI coïncide avec la grossesse et la ménopause. Dans d'autres cas, une amélioration spontanée des MAI peut survenir pendant la même période [51].

Ainsi, il est clair que les hormones influencent le système immunitaire et pourraient même être impliquées dans la fréquence plus élevée des MAI chez la femme [1].

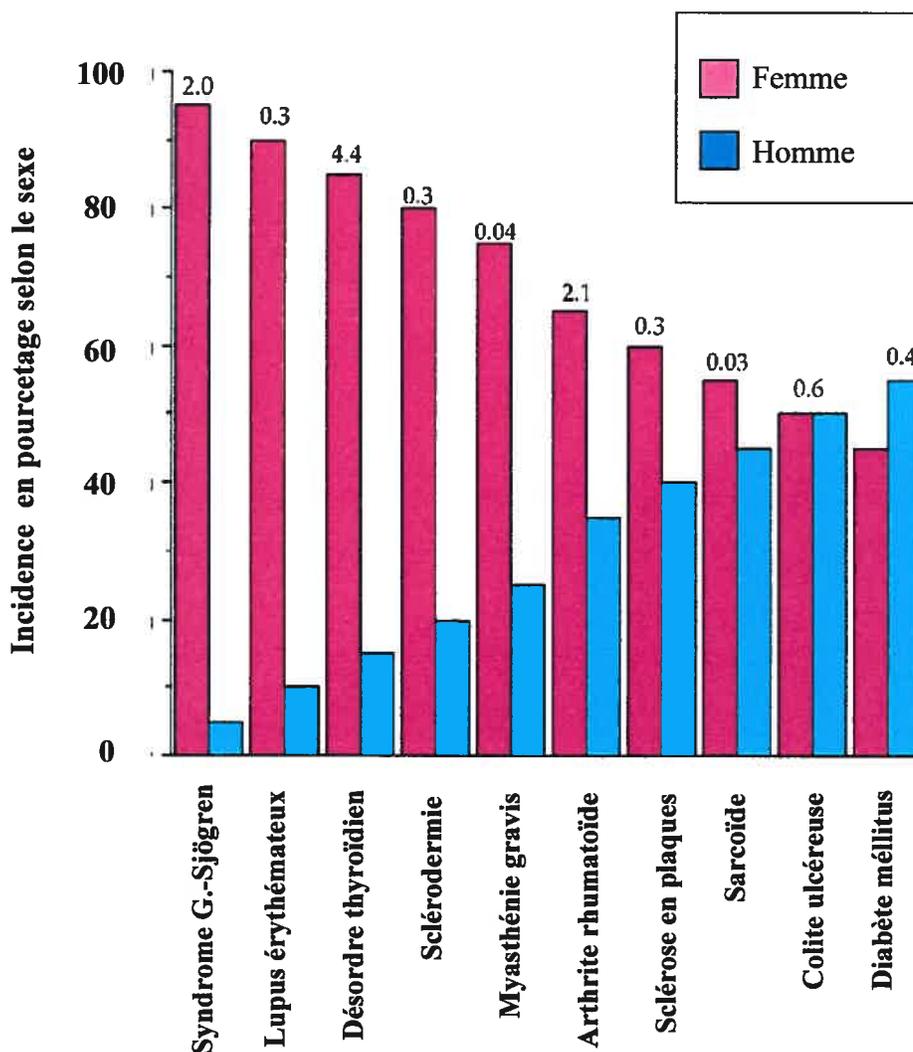
**Figure 3 : Facteurs de prédisposition**



Basée de la figure tirée de la revue : Nature Immunology 2001; vol. 2, No. 9 : 759-761

**Figure 3 : ensemble des facteurs nécessaires pour le développement des maladies auto-immunes.** La réponse immunitaire d'une personne génétiquement prédisposée exposée à un environnement pathogène, en association avec un/des mécanisme(s) immunorégulateur(s) défectueux(s) peut mener à une maladie auto-immune. Les composants représentés dans le diagramme de Venn peuvent varier d'un individu à un autre. Par contre, le développement d'une maladie auto-immune requière la convergence des trois composants suivantes : cellules T/T, Cellules B/B et cellules dendritiques.

**Figure 4 : Différence de la prévalence des principales maladies auto-immunes chez les hommes et les femmes**



Basé sur la figure de la revue: Nature Immunology 2001; Vol. 2, No. 9, 777-780

**Figure 4 : la distribution des principales maladies auto-immunes selon le sexe.** Les nombres au-dessus des colonnes correspondent au total de cas pour chaque maladie auto-immune (x 1,000,000) aux États-Unis.

Parmi les différentes MAI, il existe les hépatopathies auto-immunes qui peuvent toucher le parenchyme hépatique et les voies biliaires. Ces maladies auto-immunes affectant le foie sont l'hépatite auto-immune, la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive. Par contre, seule l'hépatite auto-immune sera discutée dans cet ouvrage.

## 2. HÉPATITE AUTO-IMMUNE

### 2.1 HISTORIQUE

Initialement, l'hépatite chronique était classée selon le degré d'activité de la maladie retrouvé dans les biopsies de foie. On la décrivait comme étant "chronique persistante" ou comme étant "chronique agressive" lorsque la nécro-inflammation était légère/modérée ou sévère respectivement. L'appellation d'hépatite auto-immune chronique active a longtemps été utilisée pour désigner une entité caractérisée par la présence d'autoanticorps non-spécifiques d'organes et par une élévation de gammaglobulines sériques. Une nouvelle classification basée sur des tests sérologiques est aujourd'hui utilisée [52].

L'histoire de l'hépatite chronique active (HCA) s'étale sur 50 ans, soit des années 1940 aux années 1990. Cependant, l'aspect auto-immun de l'HCA n'a été suspecté que vers la fin des années 40. En fait, jusqu'aux années 70, il n'existait aucune perception claire de l'hétérogénéité dans la rubrique générale de l'HCA, et ce, tant par les pathologistes que par les cliniciens. L'utilisation générale du terme "auto-immun" en relation avec l'HCA date des années 80 [53].

C'est en 1947 que le terme d'hépatite chronique active a été pour la première fois utilisé par Kelsall et al. pour décrire une présumé hépatite aiguë infectieuse principalement chez la femme, où on y remarquait une convalescence lente ou absente [54]. Les caractéristiques cliniques de cette pathologie aujourd'hui appelée hépatite auto-immune (HAI), ont quant à elles été décrites par Waldeström en 1950 [55] et incluait une progression de la maladie vers une cirrhose, une association à la jaunisse, un taux élevé de gammaglobuline et une aménorrhée chez les femmes. En 1956, Mackay et al. ont proposé le terme d'hépatite lupoïde en raison de la présence d'un facteur anti-nucléaire positif dans le sérum des patients [56] et également afin d'introduire la notion d'auto-immunité pathogénique dans l'HCA. Ce terme est aujourd'hui abandonné en raison du fait que l'HAI ne fait pas partie des

manifestations systémiques tissulaires du lupus érythémateux [57]. Dans les années 60, une nouvelle technique, l'immunofluorescence, est utilisée dans l'identification sérologique de plusieurs MAI incluant HCA. Cette technique a permis de confirmer la réalité de l'hépatite "lupoïde" [53]. Dans les années 70, il est reconnu que l'HCA comporte plusieurs sous-types histologiquement similaires avec, particulièrement un sous-type auto-immun et un sous-type viral. À cette même époque, des études montrent qu'il existe une association entre «HCA-auto-immune» et les allèles HLA-A1 et B8 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) [58]. Depuis lors, l'identification et la caractérisation des autoanticorps retrouvés dans le sérum ont été des facteurs importants dans l'évaluation systémique, la classification et le diagnostic de l'HAI [59]. En effet, la détection d'autoanticorps contre des protéines du réticulum endoplasmique (microsomes) exprimées dans le foie et le rein (liver-kidney microsomal antibodies, LKM) [60-64] mène à l'identification d'une seconde forme d'«HCA-auto-immune» (type 2) caractérisée par l'absence d'anticorps anti-noyau (ANA) [63]. Depuis les années 80, les recherches sont surtout axées sur la découverte et la caractérisation des autoantigènes [65].

Récemment, un groupe de chercheurs a proposé le terme d'hépatite auto-immune pour cette entité puisque l'auto-immunité implique une chronicité et parce que la maladie peut avoir une période d'inactivité spontanée reliée ou non à une thérapie immunosuppressive [66]. Par conséquent, il est devenu inapproprié d'ajouter les qualificatifs chronique et actif à l'appellation HAI [67].

## 2.2 DÉFINITION

L'HAI se définit comme une atteinte du foie d'étiologie inconnue où il y a destruction progressive du parenchyme hépatique et dans laquelle le mécanisme pathologique principal fait intervenir une réaction auto-immune dirigée contre des constituants des hépatocytes [66, 68]. Cette inflammation chronique causée par une infiltration lymphocytaire de cause(s) autre(s) que médicamenteuse, virale ou

toxique survient principalement chez la femme. Elle est de plus caractérisée par une hypergammaglobulinémie et par la présence d'autoanticorps sériques circulants [69-71]. L'hépatite auto-immune est suspectée lorsque 2 des 3 critères suivants sont présents [66]: **a)** taux d'alanine aminotransférase (ALT) supérieur ou égal à 5 fois la valeur normale; **b)** taux pondéral des immunoglobulines G supérieur ou égal à 2 fois la valeur normale, ou titre d'autoanticorps : anti-actine > 1 :80, anti-nucléaire > 1 :40, ou anti-microsome de foie et de rein de type 1 (anti-liver-kidney microsome type 1 (anti-LKM1)) > 1 :80, par immunofluorescence indirecte; **c)** nécrose parcellaire d'intensité modérée. En 1999, le Groupe international pour l'étude des hépatites auto-immunes a proposé une grille de scores diagnostiques, récemment modifiée, qui permet de considérer le diagnostic comme certain ou probable (Tableau 4). Il n'est pas rare de retrouver chez les patients atteints d'HAI ou chez la parenté rapprochée d'autres MAI [72].

**Tableau 4: Grille de scores pour le diagnostic de l'hépatite auto-immune tel que proposé par le Groupe International d'hépatite auto-immune**

Paramètres	Points
<b>Sexe</b>	
Femme	2/0
<b>Biochimie</b>	
Ratio PAL/ALAT: > 3/<3	-2 / +2
Gammaglobulines ou IgG (n x limite sup. de la normale) > 2 / 1,5-2/1-1,5/<1	+3 / +2 / +1 / 0
<b>Auto-anticorps</b>	
FAN, AML ou LKM1 > 1:80/1:80/1:40/<1:40	+3 / +2 / +1 / 0
Anticorps anti-mitochondries positifs/négatifs	-2/0
<b>Marqueurs viraux</b>	
IgM anti-VHA, HbsAg, ou IgM anti-HBc +	-3
Anti-VHC + par ELISA ou RIBA	-2
ARN VHC + par PCR	-3
Infection active par un autre virus	-3
Marqueurs viraux précédents négatifs	+3
<b>Autres facteurs étiologiques</b>	
Utilisation récente d'un médicament hépatotoxique ou exposition à des produits sanguins: oui/non	-2/+1
<b>Consommation moyenne d'alcool</b>	
Homme < 35 g/j, Femme < 25 g/j	+2
Homme 35-50 g/j, Femme 25-40 g/j	0
Homme 50-80 g/j, Femme 40-60 g/j	-1
Homme > 80 g/j, Femme > 60 g/j	-2
<b>Facteurs génétiques</b>	
Autre maladie auto-immune chez le patient ou chez un parent au premier degré	+1
Haplotype HLA B8-DR3 ou DR4	+1
<b>Histologie</b>	
Hépatite chronique active avec « piecemeal necrosis »	+3
Atteinte lobulaire et nécrose en pont – Nécrose en pont sans atteinte lobulaire	+2
Aspect de cellules en rosette	+1
Présence d'un infiltrat plasmocytaire prédominant ou marqué	+1
Atteinte biliaire	-1
Autre type d'atteinte (granulome, surcharge ferrique ou cuivrique) suggérant une autre cause	-3
Aucune atteinte histologique	
<b>Réponse à la corticothérapie</b>	
Réponse complète	+2
Aucune réponse	+2
Rechute	+3

Grille de scores diagnostiques. Avec un score > 15 avant traitement et > 17 après traitement, le diagnostic est considéré comme certain. Avec un score >10 et < 15 avant traitement et > 12 et < 17 après traitement, le diagnostic est considéré comme probable.

Basé du tableau de la revue J. Hepatol 1999; Vol. 31 No.5: 929-938.

## 2.3 CARACTÉRISTIQUES COMMUNES

### 2.3.1 Signes cliniques, biologiques et évolution

L'HAI est une maladie rare. Elle représente environ 5% des hépatites chroniques. Elle peut survenir à n'importe quel âge chez les deux sexes avec une nette prépondérance chez les adolescentes et les femmes [73-76]. Bien que l'HAI soit une maladie pédiatrique [67] on retrouve deux pics d'incidence entre 10 et 25 ans puis entre 40 et 60 ans [63, 74, 75, 77, 78]. Dans 30% des cas, le mode de présentation est aigu et peut mimer un tableau d'hépatite virale, ce qui peut rendre le diagnostic difficile [79]. Par contre, le plus souvent, l'HAI est une maladie insidieuse qui ne se révèle qu'au stade de la cirrhose. L'HAI peut être accompagnée de légers symptômes non spécifiques tels la fatigue, des malaises, de l'anorexie, des nausées/vomissements, une perte de poids, des maux de tête et occasionnellement de douleurs abdominales [74, 75]. Les signes physiques peuvent inclure: une légère jaunisse, urines foncées, fièvre [75, 80], une splénomégalie (rare) [80] et une hépatomégalie (fréquent). Le foie peut être également plus ferme lors d'un examen physique. De plus, dans la moitié des cas, on peut également retrouver des manifestations immunitaires extra-hépatiques [79] telles des arthralgies, une thyroïdite auto-immune, un diabète insulino-dépendant, de l'arthrite, une maladie inflammatoire de l'intestin, une anémie hémolytique, du lupus erythémateux [68, 80, 81]. Très rarement, et plutôt dans les formes d'HAI de type II chez l'enfant, la maladie peut se déclarer sous une forme subfulminante ou fulminante [82, 83]. Biologiquement, une cytolysé hépatique avec des transaminases entre 5 et 10 fois la normale et une hypergammaglobulinémie polyclonale à prédominance d'IgG sont classiquement observées [74, 75, 79, 82, 83]. L'évolution parfois spontanée, se fait généralement par poussées successives laissant comme séquelle une fibrose qui peut évoluer vers une cirrhose et chez certains patients, elle n'est détectée qu'à ce stade [68, 84, 85].

### 2.3.2 Diagnostic

Il n'existe pas de test spécifique pour le diagnostic de l'HAI. Le diagnostic repose sur l'exclusion de maladies hépatiques chroniques causées par d'autres facteurs connus ainsi que par la présence de caractéristiques précises tels qu'un changement inflammatoire de l'interface entre l'espace porte et le lobule hépatique, une activité sérique élevée des transaminases supérieures à 1,5 fois la limite supérieure, une hypergammaglobulinémie avec un taux élevé d'IgG sérique, une histoire familiale d'auto-immunité et particulièrement des autoanticorps circulants [86]. Un diagnostic définitif de l'hépatite auto-immune requiert également une compatibilité entre les données de laboratoire et histologique [79].

### 2.3.3 Physiopathologie

Comme de nombreuses maladies auto-immunes, l'étiologie de l'HAI est multifactorielle : génétique, sexe, âge, environnement et infections peuvent être à l'origine de l'activation des cellules auto-réactives. Puisqu'il n'existe pas de formes familiales, le terrain génétique est de nature polygénique. De plus, étant donné que l'hépatite auto-immune constitue une maladie rare, la recherche de gènes candidats est difficile. Cette dernière est donc effectuée sur la base de connaissances de gènes candidats responsables des autres maladies auto-immunes, comme le lupus érythémateux et le diabète insulino-dépendant [79].

### 2.3.4 Histologie

L'examen histologique sur les biopsies de foie est important dans la détermination du degré d'inflammation et de fibrose [87]. Sur le plan histologique, les différents sous-types d'HAI (décrits plus loin) ne peuvent être différenciés [79]. De plus, il n'y a pas de caractéristiques morphologiques pathognomoniques des HAI. Par contre, les caractéristiques histologiques montrent une hépatite d'interface (périportale ou péricseptale) avec nécrose parcellaire

d'intensité variable due à une infiltration lymphoplasmocytaire. Il peut également y avoir une nécrose lobulaire avec renforcement autour des veines centrolobulaires [66, 79]. Parfois, la nécrose est plus étendue, réalisant une nécrose en pont d'un espace porte à l'autre ou d'un espace porte à une veine centrolobulaire. La fibrose est souvent importante au moment du diagnostic avec une fibrose porto-centrale ou une cirrhose constituée. Certains paramètres histologiques sont évocateurs de l'origine auto-immune : l'intensité de la nécrose parcellaire, l'abondance de plasmocytes dans l'infiltrat portal, la topographie centrolobulaire, la présence d'une disposition "en rosettes" des hépatocytes. Un aspect particulier représenté par la présence d'hépatocytes en forme de cellules géantes pourrait correspondre à une forme particulière d'hépatite auto-immune qui peut se présenter aussi sous une forme fulminante [83, 88, 89].

### **2.3.5 Prévalence**

Les hépatites auto-immunes sont des maladies rares dont l'incidence annuelle est d'environ 0,7/100 000 habitants [90]. La prévalence, comme pour celle des autres maladies auto-immunes, varie selon un gradient nord-sud. Par exemple, sur le continent européen, il existe une fréquence plus élevée en Europe du Nord qui diminue en latitude vers les régions équatoriales. Cette fréquence peut s'expliquer par l'association avec l'haplotype HLA A1 B8 DR3 dont la fréquence coïncide avec les changements régionaux de la prévalence cet haplotype [91-93]. De plus, il est sans surprise que la fréquence de la maladie soit similaire chez la population nord-américaine dont une large proportion partage la même base ethnique que leurs ancêtres nord-européens [94].

## **2.4 CLASSIFICATION**

L'identification en immunofluorescence indirecte des différents autoanticorps présents dans le sérum des patients a permis la définition des deux

principaux types d'hépatites auto-immunes actuellement reconnus par l'ensemble des hépatologues et des immunologistes (Tableau 5).

#### 2.4.1 Hépatite auto-immune de type 1

L'hépatite auto-immune de type 1, anciennement appelée hépatite chronique active puis hépatite lupoïde, est la forme d'hépatite chronique non virale la plus fréquente [79, 95, 96]. Elle représente 80% des patients atteints d'HAI dont plus de 70% sont des femmes [69, 97-99]. Une association simultanée avec d'autres MAI est observée dans 48% des cas. Ces syndromes incluent la thyroïdite autoimmune, l'arthrite et les colites ulcéreuses. Le diagnostic de la maladie est souvent tardif, car l'évolution de la maladie reste souvent inaperçue et débute rarement sous une forme aiguë [57]. L'HAI de type 1 est caractérisée par la présence, dans plus de 95% des cas, d'autoanticorps anti-muscle lisse (SMA) dont les filaments d'actine sont l'antigène principal. Les anticorps SMA reconnaissent en effet plusieurs variétés de protéines du cytosquelette. Ces anticorps sont caractérisés en immunofluorescence indirecte sur foie, rein et estomac de rat par une fluorescence homogène des fibres musculaires. Dans le cas de l'HAI de type 1, les SMA sont spécifiquement dirigés contre les filaments d'actine et non contre l'actine sous sa forme globulaire ou autres composants du cytosquelette. Les anticorps anti-nucléaires (ANA), principalement d'aspect homogène, peuvent s'y associer [9, 79, 100]. Ce type d'hépatite affecte les personnes de tous les groupes d'âge, mais environ 50% des patients atteints ont moins de 30 ans. De plus, l'HAI de type 1 est associé chez les Caucasiens de l'Europe du nord et chez les Nord Américains aux gènes HLA-DR3 (DRB1\*0301) et DR4 (DRB1\*0401) [69, 95, 98, 99, 101]. Il a été démontré que ces allèles influencent l'expression, le développement et la susceptibilité de la maladie. Les Caucasiens atteints d'HAI de type 1 ayant l'allèle DRB1\*0301 sont plus jeunes, plus susceptibles à une mauvaise réponse aux traitements [102], à une rechute suite à un arrêt de la médication [103] et à une transplantation hépatique comparativement aux patients ayant d'autres allèles de susceptibilité [104]. Les patients ayant l'allèle DRB1\*0401 sont habituellement plus âgés, ont habituellement un titre d'autoanticorps ANA plus élevé, sont affectés par d'autres MAI et répondent mieux

aux traitements à base de corticostéroïdes que les patients DRB1\*0301 [105]. Chez 40% des patients atteints d'HAI de type 1, la forme aiguë de la maladie est observée [69] et peut être diagnostiquée par erreur comme une hépatite virale aiguë. Par contre, la présence d'une hypoalbuminémie, d'une hypergammaglobulinémie, une hypertension portale manifestée par une thrombocytopénie, une ascite ou de varices œsophagiennes mènent à la suspicion de l'hépatite auto-immune chez ces patients. À ce jour, l'autoantigène cible de l'HAI de type 1 est inconnu. De plus, aucun des autoanticorps présents dans ce type d'HAI n'a été associé au processus pathogénique de la maladie [106]. Par contre, l'étroite association de la maladie avec les gènes HLA suggère que la prédisposition génétique semble augmenter l'immunoréactivité face aux antigènes extrinsèques ou intrinsèques et favorise une forme de cytotoxicité humorale anticorps-dépendante. Sous certaines circonstances, on peut spéculer que des facteurs environnementaux ou une infection virale puissent être impliqués dans le processus déclencheur de la maladie chez les patients susceptibles [107-109]. D'autre part, l'existence d'autres gènes non associés aux gènes HLA seraient également impliqués dans la prédisposition des HAI [110].

#### **2.4.2 Hépatite auto-immune de type 2**

L'hépatite auto-immune de type 2 est une forme rare et distincte de la maladie. En effet, elle affecte 20% des patients atteints d'HAI en Europe et 4% aux États-Unis [57]. La prédominance féminine est de 90% [9]. Ce type d'HAI touche majoritairement des patients de moins de 20 ans dont 70% sont des enfants âgés entre 2 et 14 ans [63, 111]. Les patients atteints d'HAI de type 2 diffèrent de ceux atteints du type 1 par une fréquence sérique plus élevée d'autoanticorps spécifiques d'organes, tels les autoanticorps dirigés contre la thyroïde, les cellules pariétales et les îlots de Langerhans; par une plus grande association (50% des cas) à des maladies extra-hépatiques immunologiques; par une apparition plus fréquente de la maladie sous la forme aiguë ayant une évolution sévère et une progression rapide vers une insuffisance hépatique ou une cirrhose, et ce, malgré une thérapie aux corticostéroïdes [63, 72, 112]. Cette seconde forme d'HAI se caractérise par la

présence dans le sérum d'autoanticorps anti-microsomes de foie et de rein (anti-LKM1) dans 85% des cas et par l'absence, chez la plupart des sujets, d'autoanticorps ANA et SMA. Les anticorps anti-LKM1 sont caractérisés, en immunofluorescence indirecte, par une fluorescence homogène du cytoplasme des hépatocytes et une fluorescence plus faible au niveau de certains tubules du cortex rénal [113, 114]. Il faut toutefois faire attention dans le diagnostic de la maladie car les autoanticorps anti-LKM peuvent également être induits par des médicaments et par les virus de l'hépatite C et D [115, 116]. Les autoanticorps anti-LKM1 peuvent être associés dans 71% des cas, à la présence d'anticorps anti-cytosol de foie de type 1 (anti-LC1) alors que dans 30% des cas, ces anticorps (anti-LC1) représentent le seul marqueur immunologique des HAI de type 2 [117]. Contrairement au type 1 les autoantigènes cibles de l'HAI de type 2 ont été identifiés comme étant le cytochrome P450 2D6 et la formiminotransférase-cyclodésaminase reconnus par les autoanticorps anti-LKM1 et anti-LC1 respectivement [118]. La susceptibilité de développer une HAI de type 2 semble quant à elle être associée à l'HLA DRB1\*0701 [119, 120], mais les HLA B14, DR3 et le gène du complément C4A ont également été proposés [121].

La classification de l'HAI en type 1 ou 2 peut parfois être difficile chez les malades qui n'ont pas les autoanticorps marqueurs, mais qui présentent les caractéristiques cliniques, histologiques et de laboratoire d'une HAI. Ce groupe représente 20 à 30 % des malades [86, 122]. Dans ces cas délicats, il peut être intéressant de rechercher d'autres autoanticorps tels que les anticorps dirigés contre le cytoplasme des cellules polynucléaires neutrophiles (ANCA) et les anticorps dirigés contre le récepteur à l'asialoglycoprotéine [123, 124]. De plus, un des critères de diagnostic essentiel est la réponse rapide et prolongée au traitement immunosuppresseur [79].

### 2.4.3 Hépatite auto-immune de type 3

L'individualisation d'un type 3 d'hépatite auto-immune par Manns en 1987 [70], sur la présence d'anticorps anti-soluble liver antigen (anti-SLA) est aujourd'hui abandonnée. En effet ces anticorps sont désormais considérés comme des marqueurs peu spécifiques de l'hépatite auto-immune. Leur prévalence est de 50% dans l'HAI de type 1 et de type 2 chez la population pédiatrique et environ de 20% dans les hépatites cryptogénétiques [125, 126].

**Tableau 5 : Les différents types d'hépatites auto-immunes**

Type	Auto-anticorps spécifiques	Auto-anticorps non spécifiques
<b>I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-muscle lisse de spécificité actine (SMA)</li> <li>- Anti-antigène soluble de foie (anti-SLA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-nucléaire (ANA)</li> <li>- Anti-cytoplasme de neutrophiles (ANCA)</li> <li>- Anti-récepteur à l'asialoglycoprotéine</li> </ul>
<b>II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anti-microsome de foie et de rein de type 1 (anti-LKM1)</li> <li>- Anti-cytosol de foie de type 1 (anti-LC1)</li> </ul>	

Basé du tableau de la revue: Ann. Med Interne 2001; vol. :152, No 6; 371-382

**Les autoanticorps associés aux différents types d'hépatites auto-immunes**

#### 2.4.4 Hépatite médicamenteuse

À côté des hépatites liées à l'hépatotoxicité de certains médicaments, il existe des hépatites médicamenteuses à composantes immunologiques. Elles ne sont pas liées à la dose du médicament administrée et se caractérisent par la formation de certains types d'anticorps très particuliers qui ne se rencontrent généralement pas en pathologie humaine spontanée. L'hépatite induite par la clométacine, l'oxyphénasine, la nitrofurantoïne, la papavérine et la méthyl dopa montre certaines similitudes avec l'hépatite auto-immune de type 1. Elles sont diagnostiquées surtout chez les femmes âgées et sont associées à une hypergammaglobulinémie importante. On peut mettre en évidence des anticorps anti-muscle lisse de type actine dans 60% des cas avec des titres généralement peu élevés et parfois des anticorps anti-nucléaires [9, 127].

Dans l'hépatite induite par l'halothane, on a pu montrer l'existence d'anticorps réagissant en immunofluorescence avec le foie et, plus faiblement, avec le rein comme les anti-LKM1. Toutefois, leur titre est faible et dans le test d'immunodiffusion en gel, ils ne précipitent pas en présence d'extrait soluble de foie. Ces anticorps réagissent avec des protéines microsomaux hépatiques modifiées par leur liaison covalente avec les métabolites de l'halothane, comme la TFA-protéine-disulfate-isomérase et la carboxylestérase microsomale hépatique [9, 127]. L'hépatite induite par l'acide tiénilique se caractérise par l'apparition dans le sérum d'anticorps anti-microsomes hépatiques et rénaux très particuliers, appelés LKM2 qui reconnaissent le cytochrome P450-2C8. Contrairement aux anticorps anti-LKM1, les anti-LKM2 ne réagissent pas avec le foie fœtal et ne provoquent pas de précipitation. Dans l'hépatite induite par la dihydralazine, on peut trouver des anticorps réagissant exclusivement avec les microsomes hépatiques dont la cible est le P450 IA2 (anti-LM) [9, 127].

Un anticorps très particulier caractérise l'hépatite à l'iproniazide. Cet anticorps réagit de façon intense avec le foie et certains tubes rénaux et possède la

propriété exclusive de réagir avec les cellules Apud de l'estomac de rat. Il est appelé anti-mitochondrie M6 et sa réactivité a pu être précisée récemment comme étant dirigée contre la monoamine-oxydase B. Dans tous les cas, les manifestations cliniques et le titre des autoanticorps régressent, voire disparaissent complètement, après l'interruption du médicament responsable [9, 127].

#### **2.4.5 Formes frontières de l'hépatite auto-immune**

Les patients présentant des formes frontières d'HAI ont des caractéristiques d'une MAI sans toutefois satisfaire tous les critères permettant une classification définitive ou probable d'HAI. De plus, ces sujets ne peuvent être placés dans une toute autre catégorie. Ces patients ont des caractéristiques communes associées à une HAI et à une autre maladie chronique du foie ou ont des résultats cliniques incompatibles avec les critères d'inclusions permettant le diagnostic de l'HAI (Figure 5). Dans ces situations, il est nécessaire de rechercher une association avec une maladie cholestatique ou la présence d'un virus hépatotrope [79, 128].

### **2.5 ASSOCIATION DES MALADIES CHOLESTATIQUES ET DES HÉPATITES AUTO-IMMUNES**

La présence de signes de cholestase biologique (phosphatases alcalines supérieures à 4 fois la normale) ou histologiques (cholangite destructrice) doit faire rechercher l'association à une cirrhose biliaire primitive (CBP) ou à une cholangite sclérosante primitive (CSP). Il est démontré que 10 à 20 % des patients présentant une CBP sont atteints d'une hépatite auto-immune définie soit par les critères conventionnels ou bien en utilisant la grille internationale de scores diagnostiques [111, 129]. Un syndrome frontière entre une CSP et une hépatite auto-immune a été rapporté, et le terme de "cholangite sclérosante auto-immune" est désormais proposé chez l'enfant. Des signes de cholangiopathie sont présents et une colite peut également y être associée. Le taux de prévalence de ce type de syndrome varie de 7,6 à 22% d'une étude à une autre [130, 131]. Ces différences observées

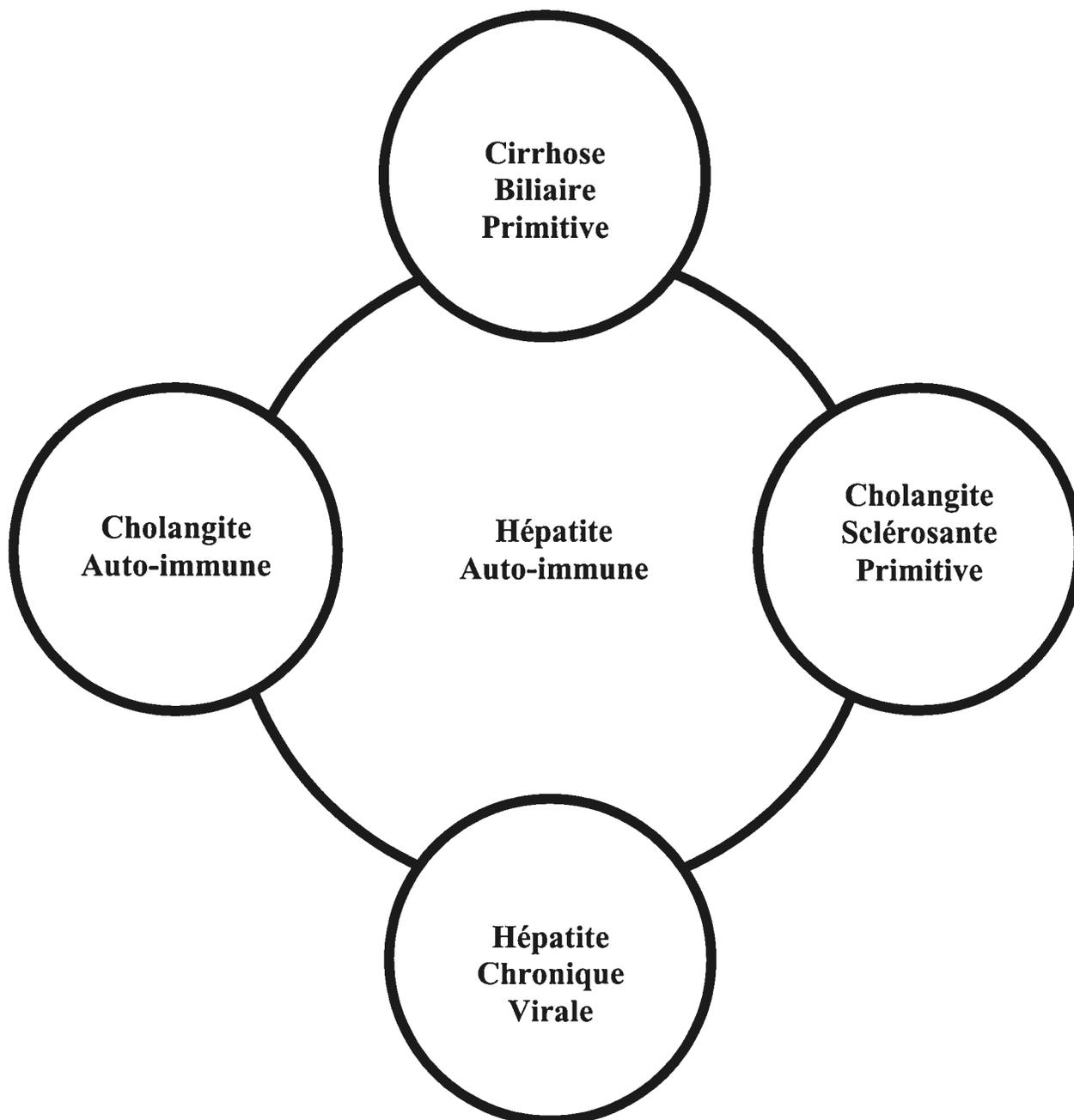
soulèvent la difficulté d'appliquer la grille de scores diagnostiques précédemment décrite à ce type de syndrome [132].

## 2.6 VIRUS HÉPATOTROPES ET HÉPATITES AUTO-IMMUNES

La fréquence des autoanticorps dans les hépatites chroniques virales varie beaucoup; des titres significatifs de facteurs anti-nucléaires et/ou d'anticorps anti-muscle lisse de spécificité non-actine sont présents chez 20 à 40 % des patients ayant une hépatite chronique B ou surtout C. La présence d'anticorps anti-LKM1 est détectée chez 5% des patients ayant une hépatite chronique C [133, 134]. Cette hépatopathie virale représente, en raison de sa fréquence, la première cause d'autoanticorps positifs en pathologie hépatique.

Il est parfois difficile de distinguer une hépatite chronique C avec autoanticorps positifs d'une hépatite auto-immune. Le terrain (sexe féminin), le type d'autoanticorps (anticorps anti-muscle lisse de spécificité anti-actine), le titre des autoanticorps et, enfin, l'hypergammaglobulinémie, représentent des arguments diagnostiques en faveur d'une hépatite auto-immune [135]. Dans certains cas, il est très difficile de trancher, et le taux de transaminases doit être rigoureusement surveillé sous traitement anti-viral puisque l'interféron peut faire apparaître des autoanticorps ou déclencher une hépatite auto-immune préexistante. Il faut donc insister sur la recherche systématique des autoanticorps avant tout traitement anti-viral chez un(e) patient(e) ayant une hépatite chronique C [136].

**Figure 5: Formes frontières de la maladie hépatique**



Basée sur la figure de la revue : Ann. Med. Interne 2001; Vol.152, No. 6 : 371-382

**Figure 5 : Les formes frontières de la maladie hépatique. D'après Czaja (Ann. Med. Interne 1996; 125 : 588-598)**

## 2.7 TRAITEMENTS

L'hépatite auto-immune est l'une des rares maladies chroniques du foie qui peut être, dans la plupart des cas, contrôlée efficacement par une simple thérapie médicamenteuse. Par conséquent, si elle reste non traitée elle est associée à un taux élevé de morbidité et de mortalité [137].

Les traitements de l'HAI permettent d'obtenir une rémission clinique et biochimique dans 80% des cas et une disparition des signes histologiques de nécrose et d'inflammation dans 60% des cas. À long terme, la rémission complète prolongée est accompagnée d'une regression au moins partielle de la fibrose dans la plupart des cas. La mortalité dans les formes très active d'HAI est abaissée par le traitement à un taux d'environ 10% à 5 et 10 ans, alors que le taux naturel de mortalité est de 40 à 50% à 5 ans et 70% à 10 ans [138-140].

Le traitement de l'HAI est basé sur l'administration d'agents immunosupresseurs [141] qui ont pour objectifs de diminuer la mortalité, d'améliorer les lésions histologiques et prévenir l'évolution vers la cirrhose. Il est bien établi que la corticothérapie diminue le taux de mortalité relié aux HAI. En effet, avant l'avènement de la thérapie aux corticostéroïdes, plus de 50% des patients atteints d'HAI mourraient dans les 3 années suivant le diagnostic. Ainsi un diagnostic précoce est donc essentiel [137, 142].

La thérapie aux corticostéroïdes est indiquée dans les formes symptomatiques, avec élévation des transaminases et des gammaglobulines; et des signes histologiques d'hépatites actives. Les traitements de choix habituellement proposés sont soit l'administration de prednisone seule à posologie de 2 mg/kg/jour (n'excedant pas les 60 mg/jour), en essayant d'atteindre la dose minimale de 10 à 20 mg/jour une fois le contrôle de l'inflammation obtenu, ce qui permet de maintenir le niveau de transaminase à la normale ou inférieur à 2 normales; soit un traitement combinant la prednisone à l'azathioprine (1-2 mg/kg/jour) [77, 78, 83].

L'efficacité du traitement est jugée sur les transaminases. Le traitement doit être diminué progressivement, et repris en cas de rechute. Il doit souvent être prolongé plusieurs années (parfois à posologie faible, 5 à 10 mg/jour) voire, dans quelque cas, à vie [66, 84, 143].

Bien que les corticostéroïdes constituent la thérapie standard, on retrouve 20% des patients atteints d'HAI qui ne répondent pas à ce traitement. D'autres alternatives thérapeutiques, tel un traitement à la cyclosporine, doivent être proposées après l'essai d'une augmentation des doses de corticostéroïdes et d'azathioprine [79]. De plus, la corticothérapie est contre indiquée dans plusieurs autres maladies hépatiques.

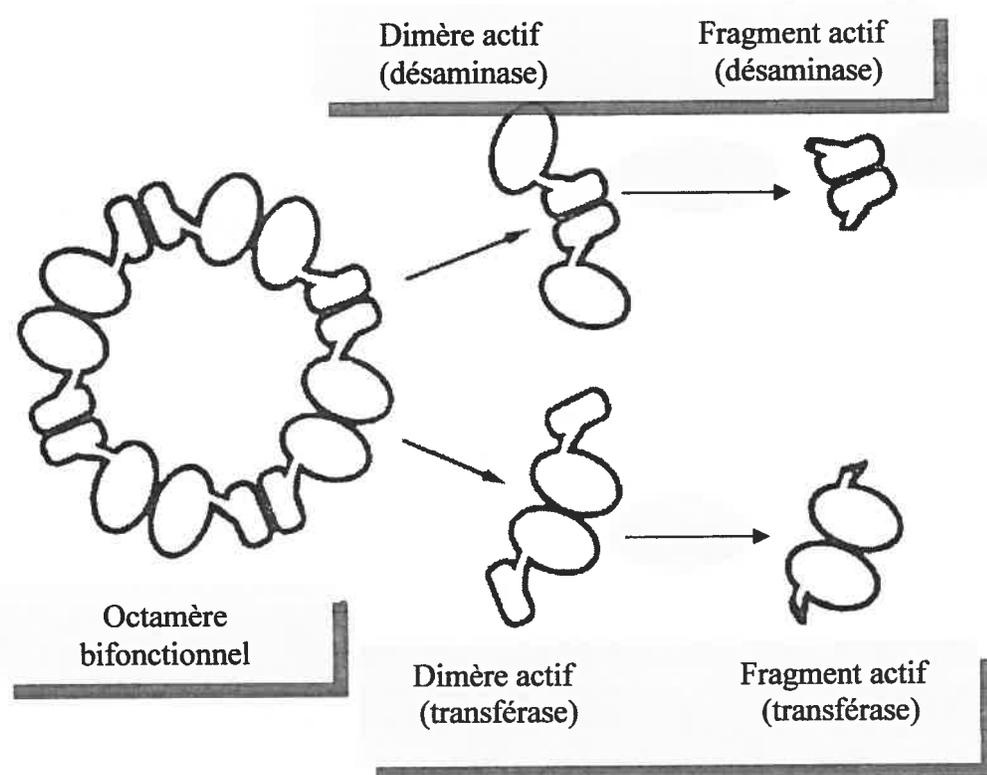
## **2.8 CARACTÉRISTIQUES DES AUTOANTICORPS ANTI-LC1 ET DE LA hFTCD**

Comme énoncé plutôt, les autoanticorps anti-LC1 sont détectés, seuls ou en association avec les autoanticorps LKM1 chez les patients atteints d'hépatite auto-immune de type 2 [113, 144]. Dans certains cas, ils sont également détectés chez des patients atteints d'une hépatite chronique virale C, habituellement en association avec les anticorps LKM1 [145, 146]. Parmi les différents anticorps identifiés comme marqueurs sérologiques des hépatites auto-immunes, les autoanticorps anti-LC1 sont particulièrement intéressants puisqu'ils s'attaquent à une protéine spécifique du foie [113, 144]. La concentration des autoanticorps anti-LC1 dans le sérum des patients atteints d'HAI de type 2 est étroitement liée au degré d'inflammation, ce qui suggère que ces autoanticorps ont possiblement un rôle à jouer dans le mécanisme pathogénique menant à la destruction des hépatocytes [72, 147].

L'autoantigène reconnu par les autoanticorps anti-LC1 a été identifié dans notre laboratoire comme étant la formiminotransférase-cyclodésaminase humaine (hFTCD) [118]. À ce jour, très peu d'informations sont connues sur la FTCD et la

plupart de ces informations proviennent des études effectuées chez le rat et chez le porc. La FTCD est une protéine soluble exclusive du foie, qui chez les mammifères est impliquée dans la dégradation de l'histidine [148]. Cette enzyme bifonctionnelle est composée de deux domaines distincts, le domaine formiminotransférase (FT) et le domaine cyclodésaminase (CD), liés par une courte séquence d'acides aminés (Figure 6). L'activité FT transfère un groupe formimino de l'acide N-formimino-L-glutamate à un tétrahydrofolate pour former de l'acide glutamique et du 5-formiminotétrahydrofolate. L'activité CD convertit ensuite le 5-formiminotétrahydrofolate en 5,10-méthényl tétrahydrofolate et en ammoniac. La FTCD sous sa forme native est une protéine octamérique composée de 8 sous-unités identiques formant une structure circulaire plannaire [148]. La FTCD est une protéine capable de s'associer à la membrane cytosolique de l'appareil de Golgi ainsi qu'à des constituants cytosquelettiques extra-hépatiques [149, 150].

**Figure 6: Structure octamérique de la formiminotransférase-cyclodésaminase**



Basée de la figure de la revue Biochemistry 1995, vol. 34, No. 33

Malgré l'identification des différents autoanticorps et autoantigènes, de nombreux progrès restent à réaliser dans la compréhension de la pathogénie des hépatites auto-immunes. Il est donc essentiel de définir le rôle et l'implication exacte des autoanticorps et des autoantigènes ainsi que les mécanismes qui conduisent à l'activation de l'immunité cellulaire et humorale. Nos travaux ont donc porté sur la caractérisation de la formiminotransférase-cyclodésaminase humaine ainsi que des autoanticorps qui lui sont associés, soit les autoanticorps anti-LC1.

**Characterization of the antigenicity of the formiminotransferase-cyclodeaminase in type 2 autoimmune hepatitis**

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

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

**Running title:** Liver cytosol antibody/antigen characterization

**Correspondance to :** Fernando Alvarez, MD

Service de Gastroentérologie. Hôpital Sainte-Justine  
3175 Côte Sainte-Catherine; Montréal, Québec, Canada. H3T1C5  
Tel.: (514) 345-4626, Fax: (514) 345-4999

**Abbreviations:** AIH, Autoimmune hepatitis; ANA, anti-nuclear antibodies; hFTCD, human formiminotransferase-cyclodeaminase; LC1, liver cytosol type 1; LCHC1, liver cytosol human clone 1; LKM1, liver kidney microsome type 1; MTs, microtubules; K8, cytokeratin 8; K18, cytokeratin 18; SMA, smooth muscle antibodies.

## ABSTRACT

Human formiminotransferase-cyclodeaminase is the autoantigen recognized by anti-liver cytosol type 1 autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis patients. In rats, this octameric protein is localized on the Golgi apparatus and binds brain microtubules and vimentin. Subcellular localization of human formiminotransferase-cyclodeaminase and its implication in the pathogenesis of autoimmune hepatitis are unknown. Localization of the human formiminotransferase-cyclodeaminase in human hepatocytes was done using indirect immunofluorescence and subcellular fractionations followed by *in vitro* binding techniques. The formiminotransferase-cyclodeaminase antigen at two distinct locations in hepatocytes, free in the cytosol and associated with the Golgi membranes are recognized by anti-liver cytosol type 1 autoantibodies. The human formiminotransferase-cyclodeaminase binds reversibly to the Golgi membranes and this complex formation is increased by anti-liver cytosol type 1 autoantibodies. Finally, human formiminotransferase-cyclodeaminase does not interact with liver-specific cytoskeleton proteins. Anti-liver cytosol type 1 autoantibodies are directed against the mature high molecular form of human formiminotransferase-cyclodeaminase. Therefore, the subcellular location of the protein may influence the production of autoantibodies and their role in the pathogenesis of type 2 autoimmune hepatitis. This antigen-driven response does not appear to be facilitated or enhanced by a possible interaction between human formiminotransferase-cyclodeaminase and hepatocyte cytoskeleton proteins.

**Key words:** autoimmune hepatitis, autoantigen, formiminotransferase-cyclodeaminase, Golgi apparatus, liver cytosol type 1 antibodies.

## INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) may be classified in two types according to the nature of the circulating antibodies detected in patients' sera [1]. Type 1 AIH is characterized by the presence of smooth muscle antibodies (SMA) and/or antinuclear antibodies (ANA), whereas type 2 is associated with anti-liver/kidney microsome type 1 (LKM1) and/or anti-liver cytosol type 1 (LC1) antibody [2, 3]. When tested by indirect immunofluorescence, anti-LC1 staining characteristically spares the cellular layer around the central veins of mouse and rat livers [3]. The LC1 antigen was identified by immunoblot as a 62kD protein in the human liver cytosol fraction [4]. Recently, we have identified by molecular cloning the LC1 antigen as human formiminotransferase-cyclodeaminase (hFTCD) [5], a bifunctional enzyme consisting of eight identical subunits arranged in a ring-like structure [6] localized in the cytosolic fraction and associated with the Golgi membrane apparatus in rats and chickens [7]. This unusual octameric quaternary structure consists of two types of subunit-subunit interaction forming a tetramer of dimer arrangement [8]. In mammalian liver, this enzyme catalyzes two sequential reactions involved in the histidine degradation pathway and has a much greater affinity for the naturally occurring polyglutamate derivatives of folates substrates [9]. Besides its enzymatic activity, no other function has been discerned, and its implication in AIH is still unknown. Perhaps, with the capacity of rat FTCD to bind extra-hepatic cytoskeleton components such as the brain's microtubules [7, 10] and vimentin [11], it is tempting to speculate that hFTCD may be an important candidate, as an intermediate protein, in Golgi interactions with hepatocyte cytoskeleton components. Furthermore, since a correlation has been found between anti-LC1 antibodies and AIH activity, speculation concerning a possible contribution of these autoantibodies to the pathogenic process leading to hepatocyte injury has been proposed [12]. The experimental approach includes the study of the subcellular location of the LC1 antigen in human hepatocytes and human liver subcellular fractions, the co-localization of hFTCD and the LC1 antigen, the binding equilibrium between hFTCD and the Golgi apparatus and finally, the role of hFTCD in the interaction between the Golgi apparatus and hepatocyte cytoskeleton (microtubules, cytokeratin 8 (K8) and cytokeratin 18

(K18)). Characterization of hFTCD may lead to further understanding of the role LC1 antibodies play in the pathogenesis of type 2 AIH and how B cells are stimulated to produce antibodies against hFTCD.

## MATERIALS AND METHODS

### Sera

Sera from patients diagnosed with autoimmune hepatitis were used in this study. AIH was diagnosed according to the criteria defined by the International Autoimmune Hepatitis Group [13] with aggregate scores greater than 15.

Indirect immunofluorescence on cryostat rat liver, kidney and stomach sections was used to detect SMA, ANA, LKM and LC1 antibodies. Sera that exhibited a characteristic pattern of LKM or LC1 were reevaluated by Western blotting against microsomal and cytosolic fractions from rat and human livers [14] and by ELISA and Western blotting using a recombinant chimeric protein covering CYP2D6 and FTCD antigenic sites [15].

The primary antibodies used in the immunostaining techniques were: Anti-vimentin (sc-6260); anti-cytokeratin 18 (sc-6259) from Santa-Cruz Biotechnology Inc.; anti-tubulin (MS-719); anti-cytokeratin 8 (MS-1368) from NeoMarkers; monoclonal anti-Golgi 58K clone 58K-9 (G2404) from Sigma-Aldrich; anti-human- $\alpha$ -1,2-mannosidase 1C 2647 (kindly given by Dr Herscovics from McGill University, Canada [16]); rabbit LCHC1 antiserum; AIH patient sera (LC1+/LKM1+; LC1+/LKM1-; LC1/LKM1+ and SMA+); and normal human serum.

The secondary antibodies diluted 1:400 were: Goat anti-mouse IgG rhodamine conjugated (sc-2092); goat anti-rabbit IgG FITC conjugated (sc-2012); and goat anti-rabbit IgG rhodamine conjugated (sc-2091) from Santa-Cruz Biotechnology Inc.; goat anti-human IgG FITC conjugated (F-9512) from Sigma-Aldrich, Oakville, Canada; goat anti-human, rabbit or mouse IgG conjugated to peroxidase from Biosource International, Camarillo, CA.

### **Preparation of human subcellular fractions**

Microsomal and cytosol human liver fractions were obtained from normal brain-dead organ donors by differential centrifugation [14]. The microsomal membranes were further subfractionated according to their densities on a preformed sucrose gradient [17]. The protein concentration in each subfraction was determined by the Lowry method [18].

### **Isolation and treatment of a Golgi-enriched fraction from human liver**

Excised human liver (10-13 g) minced with a razor blade was homogenized in 2 volumes of homogenization medium (0.5 M sucrose, 50 mM Tris-maleate pH 6.4, 1% dextran) for 40 seconds at 10,000 rev./min. using a polytron homogenizer (PT3000 Brinkmann Instruments). The crude homogenate was centrifuged at 5000 g for 15 minutes and the supernatant was removed. The upper one-third (the yellow-brown portion) of the pellet was resuspended in a small volume of the previous supernatant. The mixed suspension was laid over a 1.2 M sucrose solution and then centrifuged at 10,000 g for 30 minutes in a swinging bucket rotor (Beckman SW 41 Ti). Further enrichment was obtained by sucrose gradient centrifugation, as described [19]. The enrichment was assayed using organelle specific antibodies. The Golgi-enriched fraction (5.45 mg/ml) was pelleted and resuspended in PBS containing 0.25 M sucrose or in 100 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11. After 20 minutes of incubation at 4°C, supernatant and pellet fractions were obtained by centrifugation and analyzed by SDS-PAGE. In addition, the Golgi-enriched fraction, treated or not with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11, (54.5 µg) was incubated with human liver cytosol proteins (2 µl, 4 µl and 8 µl at 30 mg/ml) or with *in vitro* translated hFTCD (6.0 x 10<sup>4</sup> to 6.0 x 10<sup>5</sup> cpm) for 90 minutes at 37°C. This experiment was repeated with liver cytosol proteins or recombinant hFTCD that were pre-incubated with 5 µl of different sera: Normal human serum, rabbit LCHC1 antiserum, 58k-9 monoclonal antibody or AIH patient sera (LC1+/LKM1+; LC1+/LKM1-; LC1-/LKM1+ or SMA+) for 2 hours at room temperature. After centrifugation at 10,000 g in an airfuge-100 (Beckman) for 15 minutes, the pellets were

washed twice in 10 volumes of 0.25 M sucrose and then resuspended in 0.25 M sucrose and analyzed by SDS-PAGE followed by either Western blotting or exposure to radiography film.

### **Expression and purification of the LCHC1 fusion protein**

The LCHC1-pMalC construction was used to express the LCHC1 (hFTCD, amino acids 396-541) recombinant protein [5]. Briefly, the fusion protein was expressed as follows: A 100 ml LB/ampicillin culture was grown to  $2 \times 10^8$  cells/ml and then induced with isopropylthio- $\beta$ -galactosidase (IPTG) at 0.3 mM for 90 minutes at 37°C with shaking. The bacteria were then sonicated in 5 ml of buffer, pH 7.4 (20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA). This solution was incubated with 1 ml of maltose resin (New England Biolaboratories, Beverly, MA) overnight at 4°C with gentle shaking. The maltose resin was loaded onto a chromatography column measuring 0.8 x 4 cm (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), the column washed with 12 column volumes of buffer, and the protein eluted with 10 mM maltose. The different fractions, along with the cell lysate, were electrophoresed on SDS-PAGE to detect the fusion protein.

### **Rabbit immunization**

A New Zealand rabbit was injected subcutaneously with 200  $\mu$ g of the purified LCHC1 recombinant protein emulsified in 400  $\mu$ l of Freund's complete adjuvant. Two and four weeks later, the rabbit was boosted subcutaneously with 100  $\mu$ g of LCHC1 fusion protein emulsified in 400  $\mu$ l of Freund's incomplete adjuvant. At the sixth week, the rabbit was bled and the serum was tested by Western blot.

### ***In vitro* transcription and translation of hFTCD**

The hFTCD full length cDNA (genbank accession number AF169017) subcloned in pBluescript SK+ (kindly given by Dr. de la Luna, Hospitalet de Llobregat,

Spain) coding for the complete 541 amino acid protein was used to synthesize *in vitro* mRNA and subsequently  $S^{35}$  labeled hFTCD protein. The hFTCD clone (5  $\mu$ g) was linearized with *Xho*1 endonuclease (GibcoBRL, Gaithersburg, MD), phenol/chloroform extracted and ethanol precipitated. The *in vitro* transcription was performed with the RiboMAX Large Scale RNA Production Systems T3 (Promega, Madison, WI) using 2  $\mu$ g of linearized cDNA following the manufacturer's instructions. Using 1/3 of the resulting mRNA, the *in vitro* translation was performed with the Rabbit Reticulocyte Lysate System following the manufacturer's guidelines. The hFTCD protein was labeled with  $S^{35}$  Methionine (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden), and radioactivity incorporation was counted following trichloroacetic acid precipitation of the translation product. The resulting protein was analyzed by 10% SDS-PAGE and fluorography.

### **Immunoprecipitation**

The *in vitro* synthesized and  $S^{35}$  labeled hFTCD was immunoprecipitated as described [20]. Briefly,  $6.0 \times 10^5$  cpm of labeled hFTCD was incubated with 5  $\mu$ l of sera in NET buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.25% gelatin) for 2 hours at 4°C. The mix was incubated with protein A sepharose (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and washed 3 times in RIPA buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 7.4). The resulting pellet was resuspended in sample buffer and analyzed by 10% SDS-PAGE.

### **Immunofluorescence microscopy**

HepG2 cells were cultured on 18 mm glass circular coverslips (Fisher) to 50-80% confluency in DMEM (GibcoBRL) supplemented with 10% FBS (GibcoBRL). The grown cells were rinsed with PBS-MC (1 mM  $MgCl_2$ ; 0.1 mM  $CaCl_2$ ) and then fixed with cold methanol at -20°C for 20 minutes. All subsequent steps were done at room temperature. Methanol-fixed cells were washed three times with PBS-MC prior to permeabilization with 0.2% Triton X-100 for 10 minutes. Permeabilized cells were washed three times with PBS-MC and then incubated 30 minutes with blocking buffer

PBS/BSA (3% bovine albumin (w/v) dissolved in PBS). Double staining was performed by incubating the coverslips for 2 hours with two of following 1:200-1:400 diluted antibodies: Anti-vimentin, anti-tubulin, anti-cytokeratin 8, anti-cytokeratin 18, anti-human- $\alpha$ -1,2-mannosidase 1C, rabbit LCHC1 antiserum, normal human serum or LC1-positive serum preadsorbed with K8/K18 proteins. Unbound antibodies were removed by washing the coverslips three times with PBS/BSA. The cells were then double stained with two of the following preadsorbed secondary antibodies diluted 1:400: Goat anti-mouse IgG rhodamine conjugated, goat anti-rabbit IgG FITC conjugated, goat anti-rabbit IgG rhodamine conjugated or goat anti-human IgG FITC conjugated. The unbound antibodies were removed by washing the coverslips three times with PBS/BSA and one time with PBS. The coverslips were finally mounted on glass slides using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) and analyzed by laser scanner confocal microscope (LSM 510 ZEISS).

### **Western blot analysis**

The proteins were separated by electrophoresis on 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose filters (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada). The membrane was blocked in TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)/5% milk powder, for 2 hours at room temperature. The nitrocellulose filter was incubated for 2 hours at room temperature with the first antibody, either LCHC1 immunized rabbit serum, patients' sera or monoclonal 58k-9 anti-Golgi antibody at dilutions between 1:1,000 and 1:5,000 in TBST/1% milk powder. The second antibody was an anti-human, rabbit or mouse IgG conjugated to peroxidase, diluted to 1:10,000 in TBST/1% milk powder and incubated with the filter for 1 hour at room temperature. Detection of the bound peroxidase was made using chemiluminescence blotting substrate (Boehringer Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### **Purification of human liver tubulin**

Microtubules (MTs) were purified from frozen human liver by some modifications of the protocol previously described by Gaskin et al [21]. Briefly, human liver MTs were prepared by a modification of the temperature-dependent MTs assembly and disassembly procedure. 10 g of liver were homogenized in ice-cold PEM buffer (100 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM EGTA, and 1mM MgSO<sub>4</sub>) containing protease inhibitors cocktail (Roch Diagnostics, Mannheim, Germany) and 0.1 mM GTP. Homogenates were then centrifuged at 4°C sequentially at 16,000 g for 20 minutes, at 105,000 g for 30 minutes, and at 112,000 g for 30 minutes to obtain a clear supernatant. The clear protein solution was dialyzed against 8 M glycerol in PEM for 90 minutes at 4°C, then supplemented with GTP to 1 mM, nuclease to 30 µg/ml, and protease inhibitors and incubated at 37°C for 30 minutes to polymerize MTs. The polymerized MTs were centrifuged at 105,000 g for 30 minutes at 30°C, and the supernatant (*HS1*) and MT pellets (*HP1*) were obtained. *HP1* was resuspended in PEM containing protease inhibitors and incubated on ice for 90 minutes to disassemble MTs. The cold solubilized tubulin was then centrifuged at 65,000 g for 30 minutes at 4°C. The resulting pellets (*CP2*) were discarded, and supernatants (*CS2*) were mixed with an equal volume of 8 M glycerol in PEM and frozen until use or incubated at 37°C to induce the second MT assembly. The polymers were sedimented by centrifugation at 105,000 g for 30 minutes.

### **Microtubules binding assay**

In experiments to test if hFTCD can bind liver microtubules, microtubule-enriched fraction filaments were first polymerized at 37°C for 30 minutes. 5 µg of the polymerized microtubules were incubated at 37°C for 3 hours with different amounts of human liver cytosol (2 to 10 µl at 30 mg/ml) or recombinant labeled hFTCD (6.0 x 10<sup>4</sup> to 6.0 x 10<sup>5</sup> cpm) diluted in PBS. Same amounts of cytosol or labeled hFTCD incubated without microtubules and microtubules incubated with PBS only were used as control. The mixtures were then centrifuged at 100,000 g in an airfuge-100 (Beckman) at room

temperature for 15 minutes. The supernatants were recovered, and the pellets were washed three times with PBS and resuspended to the initial volume. Equal volumes of supernatants and resuspended pellets were processed for SDS-PAGE and followed either by immunoblotting with one of the following antibodies: Rabbit LCHC1 antiserum, LC1-positive serum or anti-tubulin antibodies, or exposure to radiography film.

### **Expression and purification of recombinant human cytokeratin 8 and 18 from bacteria**

Plasmids pGEX-2TH/K8 and pGEX-2TH/K18 construction (kindly given by Dr.Hiroshi Eto M.D., Hyogo Medical Center for Adult Disease, Japan) were digested respectively with *Bam*H1/*Eco*R1 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) and with *Eco*R1/*Hin*DIII (GibcoBRL, Gaithersburg, MD). The K8 and K18 cDNA were then cloned into pET-21b (+) vector (Novagen) and transfected into *Escherichia coli* strain BL21-Gold cells (Stratagene, La Jolla, CA). Bacteria cultured with IPTG were pelleted, and the protein purifications were carried out according to the protocol described by Domingo et al [22]. The molecular mass of the recombinant proteins were 52 kD and 45 kD, respectively, as established by SDS-PAGE. According to SDS-PAGE gel transfer membrane (Amersham Life Sciences, Oakville, Canada) stained with red ponceau (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada) and Coomassie blue staining of the SDS-PAGE gel, the proteins were > 90% pure.

### **Cytokeratin binding assay**

5  $\mu$ g of recombinant cytokeratin 8 or 18 were incubated at 37°C for 3 hours with different amounts of human liver cytosol (2 to 10  $\mu$ l at 30 mg/ml) or recombinant labeled hFTCD ( $6.0 \times 10^4$  to  $6.0 \times 10^5$  cpm) diluted in PBS. Same amounts of cytosol or labeled hFTCD incubated without cytokeratin and cytokeratin incubated with PBS only were used as control. The mixtures were then centrifuged at 100,000 g in an airfuge-100 (Beckman) at room temperature for 15 minutes. The supernatants were recovered,

and the pellets were washed three times with PBS and resuspended to the initial volume. Equal volumes of supernatants and resuspended pellets were processed for SDS-PAGE and followed either by immunoblotting with one of the following antibodies: Rabbit LCHC1 antiserum, LC1-positive serum preadsorbed with K8/K18, anti-cytokeratin 8 and anti-cytokeratin 18), or exposure to radiography film.

## RESULTS

### Distribution of the in human liver subcellular fractions

Using highly purified human liver microsomal subfractions of decreasing isopycnic density (Figure 1), which is largely related to the amounts of ribosomes attached to the microsomal vesicles, the distribution of the LC1 antigen, the 58 kD Golgi-associated protein and the LKM1 antigen (cytochrome P450 2D6 = CYP2D6) was determined. The fractions of lower density (10 to 12) contain a higher concentration of the LC1 antigen and of the 58 kD Golgi-associated protein. The LKM1 antigen (CYP2D6), which is known to be present in relatively higher amounts in smooth endoplasmic reticulum membranes, is observed in all fractions with an increase of the intensity in fraction 9. These results show that the LC1 antigen (hFTCD) is found in particular liver subcellular membrane fractions of low density, possibly in the Golgi fractions.

### Localization of hFTCD in HepG2 cells by indirect immunofluorescence

To further investigate the co-localization of hFTCD (known as the LC1 antigen) with the Golgi apparatus, permeabilized HepG2 cells were stained with two different primary antibodies and fluorochromes. In agreement with the previous result, the double immunostaining against hFTCD and  $\alpha$ -1,2-mannosidase IC protein (Golgi-specific transmembrane protein) reveals a perfect co-localization of both proteins. The hFTCD was also present in the cytosol (Figure 2a). This finding suggests that the hFTCD might be a peripheral protein attached to the Golgi complex.

### Binding of the hFTCD to the Golgi apparatus

To determine whether the hFTCD is a peripheral protein attached to the Golgi complex or an integral membrane protein that has been partially cleaved, Golgi membranes were extracted with an alkaline buffer (Figure 3a). The analysis of the

pellet and supernatant on Western blot shows that the hFTCD was released into the supernatant conserving similar molecular weight. This experiment confirms our hypothesis that the hFTCD is a Golgi membrane peripheral protein.

As expected for a Golgi-associated or a peripheral protein, the hFTCD is present in both Golgi membranes and liver cytosol subcellular fractions (Figure 3b). When membranes were treated by a buffer at pH 11 and then centrifuged, the hFTCD was found in the supernatant fraction (Figure 3b). To test whether the hFTCD present in the cytosol is able to attach to pH 11 washed Golgi membranes, these stripped membranes were incubated with different amounts of human liver cytosolic proteins (Figure 3b). This experiment shows that the hFTCD present in the cytosol is able to recognize an attachment site on the Golgi membranes and that the antigen is present in both subcellular fractions (Golgi and cytosol) in the same mature structural form. When the cytosol was first preincubated with different antibodies and then incubated with the stripped Golgi, it was found that LC1-positive sera had greatly increased the amount of cytosolic hFTCD bound to the Golgi membranes, compared to normal human serum (Figure 4). In these experiments, SMA serum and a rabbit LCHC1 antiserum (data not shown) had no effect on the binding of hFTCD to the Golgi membranes.

#### **Binding of *in vitro* synthesized FTCD to the Golgi apparatus**

Expression of the hFTCD full-length cDNA subcloned in pBluescript allowed us to obtain a complete hFTCD protein. Using different sera from type 2 AIH patients, it was shown that the recombinant protein is immunoprecipitated, thus specifically recognized by the sera positive for LC1 antibodies (Figure 5a). To test for binding of the *in vitro* translated hFTCD to the Golgi apparatus, increasing concentrations of labeled recombinant protein were incubated either with treated (pH 11) or untreated Golgi membranes (Figure 6a). Labeled hFTCD was pre-incubated with normal human serum or an LC1-positive serum before incubation with Golgi membranes (Figure 6a). Two main results are shown by these experiments: 1) labeled hFTCD bound more avidly to untreated Golgi membranes (Figure 5b); and 2) LC1-positive serum increases

the binding of hFTCD to Golgi membranes (Figure 6a). This effect is specific to LC1-positive serum from patients with type 2 AIH, as shown in Figure 6b.

### **Binding of hFTCD to the hepatocytes' main cytoskeleton proteins**

A binding test using hFTCD and the hepatocytes' main cytoskeleton proteins was carried out. We first tested the ability of hFTCD to bind human liver MTs by doing a similar experiment to that described by Bashour et al [7]. MTs supplemented with different amounts of human liver cytosol fraction or with labeled hFTCD were incubated, and the pellet and the supernatant were then analyzed. The *in vitro* binding test shows that in the presence of MTs, the same amount of hFTCD was found in the pellets and supernatants as compared to the controls (data not shown). In addition, a double-labeled immunofluorescence against hFTCD and tubulin done in parallel did not reveal apparent co-localization between hFTCD and tubulin in HepG2 cells (Figure 2b). *In vitro* binding assay and double-labeled immunofluorescence were performed to determine if, as previous shown with vimentin [11], K8 and/or K18 interact with hFTCD. To test the ability of hFTCD to bind cytokeratin, different amounts of human liver cytosol or recombinant labeled hFTCD were supplemented with K8 or K18 or, as a control, with PBS only. After 30 minutes of incubation at 37°C, the samples were centrifuged, and the pellets were then resuspended to the initial volume. The supernatants and pellets were then analyzed by autoradiography or by Western blot using one of the following antibodies: Rabbit LCHC1 antiserum, K8/K18 preadsorbed LC1-positive serum, anti-K8 or anti-K18. As in the experiment done with the microtubules, we realized that a large amount of the hFTCD sedimented in the absence of K8 or K18, and thus must represent background (data not shown). Presumably, the large amounts of hFTCD that sedimented under these conditions reflect the large size of the native protein, which is a ~ 496,000 kD homooctomer [6]. Furthermore, as compared to the controls, no increase in pelleted hFTCD was observed in the presence of K8 or K18 (data not shown). The double-labeled immunofluorescence against K8 or K18 did not show any superposition between hFTCD and K8 or K18 (Figure 2c). These immunofluorescence staining analyses on HepG2 cells (Figure 2c) as well as the

*in vitro* binding assay did not reveal any co-localization or association between hFTCD and K8 or K18 proteins.

## DISCUSSION

LC1 antibodies were identified in sera from 71% of patients with type 2 AIH, they were frequently associated with the presence of LKM1, but in 19% of sera tested they were the only serological marker [15]. Serum concentrations of LC1 antibodies is related to liver disease activity and it was proposed that these antibodies could play a role in the pathogenesis of AIH [12]. However, the mechanisms that initiate and maintain the production of LC1 autoantibodies in type 2 AIH are not clear. A step forward in understanding the role of LC1 antibodies was the identification of the antigen as hFTCD, a liver-specific enzyme [5]. The analysis of the subcellular location of hFTCD might help us to conceive new hypotheses on the development of an autoimmune response against intracellular proteins. Thus, the different subcellular locations of this enzyme may influence its structure and activity, as well as its degradation by proteasomes and further presentation to the immune system. An added incentive to study the subcellular location of hFTCD and its binding properties was the existence of strong evidence that B-cell autoimmune responses are antigen driven [23]. This means that repeated exposure of the immune system to the presence of the antigen (hFTCD) would lead to the development of LC1 antibodies. Consequently, the mature structure of hFTCD and its subcellular localization may determine its antigenicity once it is liberated from the liver by hepatocytes apoptosis or lysis.

So far, autoantigens in liver cells have been studied mainly using microsomal fractions. It was shown that sera from some patients with type 2 AIH, in addition to anti-CYP2D6 antibodies, have antibodies against a liver microsomal antigen of 58 kD or 62-66 kD in rat or human subfractions, respectively [24, 25]. The monoclonal 58K-9, an anti-Golgi peripheral protein was used as a positive control; this antibody is directed against rat liver FTCD and, as was shown in Figure 1, it cross-reacted with a 62 kD human liver protein located mainly in human liver subcellular fractions 10 to 12. Therefore, it can again be proposed that the 62 kD protein revealed by the anti-Golgi-58 kD antibodies in human liver was hFTCD. As expected, the hFTCD localized using a type 2 AIH positive serum showed a similar fraction distribution. In contrast, the

LKM1-positive serum displaying antibodies against CYP2D6, showed two regions of high-intensity bands, one around fraction 3 and the other around fraction 9. The former corresponds mostly to rough endoplasmic reticulum membranes and the latter to smooth endoplasmic reticulum membranes [17]. This finding confirmed previously published work, in which the LKM1 antigen was found at relatively higher amounts in smooth rather than in rough endoplasmic reticulum membranes [26]. Indirect immunofluorescence studies on rat liver cryostat sections showed that LC1 antibodies stained the cytoplasm of hepatocytes; perhaps this was not the most appropriate technique to identify any staining to a particular organelle. Human liver subcellular fractionation followed by Western blot analysis and indirect immunofluorescence on HepG2 using confocal microscopy was a better approach to display eventual binding of LC1 antibodies on subcellular structures. Furthermore, the confocal immunofluorescence microscopy on HepG2 cells clearly shows the double localization of the hFTCD. This hFTCD distribution study proved that FTCD is located on the Golgi membranes, as it was found in rat and chicken liver as well as at the cytosolic fraction [2]. This “double” location (at two sites), i.e. free in cytosol and associated with the Golgi’s membranes, explains the previous observations showing that type 2 AIH patients’ sera recognize an antigen of similar molecular weight in microsomal and cytosolic fractions [2, 12, 27].

The finding that hFTCD is bound to the Golgi explains why liver microsomal subcellular fractions contain some amount (depending on buffer used and cell disruption methods) of FTCD. The fact that FTCD in rat and human liver has a molecular weight of 58 kD and 62kD, respectively, leads us to speculate that the microsomal autoantigen recognized by sera from some type 2 autoimmune hepatitis patients at 58kD or 62-66kD, could be FTCD bound to the Golgi membranes. In addition, it was shown that a rat microsomal antigen of 58 kD recognized by sera from type 2 AIH patients was not an integral Golgi membrane protein [25, 27], confirming our findings.

Previously, FTCD was from rat and chicken liver was located on the cytosolic surface of the Golgi membranes [10, 28], however, its role at this site is not understood.

The LC1 antigen (hFTCD) showed similar characteristics, because it was detached from the Golgi complex by treatment with a mild detergent or a buffer at pH 11 (Figure 3). These results show that the hFTCD is a Golgi-associated and not an integral membrane protein. The binding site for hFTCD on the subcellular membranes was not affected by the above mentioned treatment, as was shown by the re-association of the cytosolic hFTCD to Golgi washed membranes (Figure 3). The cytosolic hFTCD and Golgi-associated forms were interchangeable, showing that at both locations the protein was in its mature state, or that in these particular experiments all requirements for the reconstitution of the mature structure were present.

*In vitro* translated hFTCD also binds to Golgi stripped membranes, but it shows a higher affinity for the untreated Golgi membranes (Figure 5b). In the hFTCD-to-Golgi binding experiment, the newly *in vitro* synthesized protein is added as a unit. This molecule can be incorporated into already existing tetramer or dimers of FTCD in untreated Golgi membranes or to form new complexes for binding on stripped ones. At different concentrations of *in vitro* translated hFTCD, it was clearly shown that untreated Golgi membranes offered better conditions for the binding of this protein (Figure 6). The spontaneous formation of mature complexes appeared to be possible, but at low efficiency (Figure 6a:A). The chemical complexity, the high molecular weight of the native hFTCD (eight identical subunits of 62 kD each), and stability might influence the production of LC1 autoantibodies in AIH patients.

Pre-incubation of the human liver cytosolic fraction with different antibodies shows that antibodies against hFTCD from LC1-positive sera but not rabbit LCHC1 antiserum (data not shown), increase the amount of hFTCD bound to the Golgi membranes (Figure 4). The same results were obtained using the recombinant hFTCD (Figure 6B). The binding enhancement by the LC1-positive sera could imply either that these antibodies are directed against the Golgi/hFTCD complex, therefore stabilizing this structure, or that the binding of the antibodies to the hFTCD stabilizes an octamer conformation favorable for binding to the Golgi membranes. The results showing that anti-LC1 bound to the native form of hFTCD and also to the quaternary structure of this

molecule allow us to deduct that the anti-LC1 autoantibodies recognize conformational epitopes on the hFTCD protein and are consistent with findings that B cell epitopes, unlike T cell epitopes are usually conformational, i.e. highly dependent on the three-dimensional structure of the protein [29-34]. Because the rabbit LCHC1 antiserum was obtained by immunization with LCHC1, the C-terminal denatured part of hFTCD, probably these antibodies did not bind the octamer form, or did so ineffectively. It can be speculated from these data that patients could have been immunized by hFTCD in its octamer structure or as part of a complex on the Golgi membranes' surfaces. Our speculation correlates with the studies done by Muratori et al.[35], Duclos-Vallée et al. [36] and Ma et al. [37] showing that LC1 and LKM1 autoantibodies in type 2 AIH mainly recognize conformational epitopes on hFTCD and CYP2D6 respectively.

How and why hFTCD or Golgi/hFTCD complex that are intracellular elements have been targeted by the immune system remain unexplained. In addition, the study of the initiating events that are responsible for type 2 AIH involving LC1 antibodies is difficult because the diagnosis is most often preceded by a long asymptomatic phase or with nonspecific symptoms including fatigue, malaise, anorexia, nausea/vomiting, weight loss, fever, headache and occasionally abdominal pain [38-40]. The characteristic fluctuating course of AIH leads to delays in diagnosing this disease. In situations in which autoantibodies are directed against antigens of the plasma membrane on the cell surface, it is conceivable to consider that they could participate in the pathogenesis of the disease [41-43]. However, the hFTCD is intracellularly located in sites normally inaccessible to circulating autoantibodies; thus it is less clear how hFTCD could become involved in AIH pathogenesis. In certain unusual circumstances, intracellular molecules can escape autolytic degradation and can be released into the extracellular milieu; in this case, these molecules are able to react with preexisting circulating antibodies, forming antigen-antibody complexes, and initiating inflammation [41]. Recently, new experimental findings and clinical observations have challenged the concept that autoantibodies could not penetrate viable cells [44, 45]. Indeed, studies have shown the penetration of many antibodies into animal and human cells and have provided evidence that the interactions of autoantibodies with intracellular antigens may

affect intracellular functions which, in turn, might explain physiopathological and clinical features of autoimmune diseases [46]. Further characterization of the B-cell response against hFTCD, such putative linear epitope mapping, could bring more information on why LC1 autoantibodies enhance the Golgi/hFTCD complex or the formation of the octamer structure of hFTCD and will also help to determine the implication of LC1 antibodies in type 2 AIH and the mechanisms that stimulate B-cell to produce autoantibodies against hFTCD.

The next step in our study was to investigate the possibility of the association between hFTCD and hepatocyte cytoskeleton protein. This possible complex between cytoskeletal protein and hFTCD could stimulate, by mechanisms described above, a B-cell response. The three major filaments of cytoskeletal protein networks in eukaryotic cells are actin microfilaments, tubulin microtubules, and the large family of tissue-specific intermediate filament proteins [47] such as vimentin and keratin. These cytoskeletal proteins participate in a wide range of important cellular functions including maintenance of cellular mechanical integrity, stress responses and vesicle transport [48]. Furthermore, increasing evidence indicates that these three cytoskeletal families and/or their associated proteins play an important role in human disease [47]. Moreover, autoantibodies against cytoskeleton proteins are found in several autoimmune pathologies, such as type 1 autoimmune hepatitis (anti-actin), lupus erythematosus (anti-actin), autoimmune thyroiditis (anti-tubulin), and Gougerot-Sjögren syndrome (anti-vimentin) [49]. Binding of hFTCD to cytoskeleton protein would also help to target the immune system and generate a B-cell response.

Golgi interaction with microtubules [50, 51], actin [52] and recently with vimentin [11] has been documented. Recent studies made with rat FTCD have shown that this protein [1, 5] has the ability to bind extra-hepatic cytoskeleton constituents such as microtubules isolated from brain [7, 10] and vimentin [11]. Indeed, FTCD is a liver-specific cytosolic protein, also associated with the Golgi membranes [1, 5, 7, 53]. However, vimentin is an intermediate filament expressed predominantly in mesenchymal cells, several other non-epithelial cells and in cells adapted to culture [54-

56]. Keratins, on the other hand, constitute the most diverse family of intermediate filament proteins, with over 20 proteins subdivided into type 1 (K9-K20) and type 2 (K1-K8) sub-classes [57-59]. Unlike vimentin, cytokeratins are typically expressed in simple- or single-layer epithelial cells including the liver. Hepatocyte intermediate filaments are made solely of keratins 8 and 18 (K8/K18) [60, 61]. Moreover, even though tubulins ( $\alpha$  and  $\beta$ ), the subunits of microtubules, are proteins highly conserved during evolution, inter-organ, intra- and inter-species differences may exist [62, 63]. Previously, it was suggested that rat FTCD has, in addition to its enzymatic activity, another physiological role in mediating interaction between Golgi-derived membranes and cytoskeleton [11]. The finding that FTCD binds vimentin [11] leads us to speculate that hFTCD might be able to bind the K8 and/or K18 and serve as intermediate protein in hepatocytes for the Golgi/cytoskeleton association. Furthermore, current knowledge adds weighty arguments and provides compelling reasons for the possible interaction between Golgi, hFTCD and hepatocyte cytoskeleton and raises the hypothesis that cytoskeleton proteins might promote or facilitate the development of LC1 autoantibodies. First, hFTCD has been identified as the LC1 antigen in type 2 AIH patients [5], furthermore its related autoantibodies have been associated in some cases with SMAs (antibodies against actin filament) in AIH patients [64]; and finally, high levels of anti-keratin 8/18 antibodies have been found in 30% of AIH patients [65]. For these reasons, it was essential to verify if hFTCD was able to bind the major hepatocyte cytoskeleton proteins. The analysis of the binding test between hepatocyte microtubules and hFTCD and the double immunofluorescence staining did not reveal any apparent interaction and were consistent with published results that strongly support the affirmation that FTCD does not cross-link Golgi membranes to liver tubulin [7]. Furthermore, in contrast to the study made with rat FTCD and vimentin [11], our *in vitro* binding assay and our indirect immunofluorescence staining did not reveal any co-localization or association between hFTCD and K8 or K18 proteins, suggesting that FTCD does not participate, as proposed by others [11] in the interaction between Golgi membranes and cytoskeleton in the liver. This possible interaction could have led to an important step in the understanding of the mechanisms by which hFTCD is exposed to the immune system. Taken together, the human liver tubulin and cytokeratin binding

results show that the affinity of hFTCD for hepatocyte cytoskeleton components is null despite the fact that the protein binds to extra-hepatic cytoskeleton proteins.

Altogether, this study contributed additional arguments for the identity between human liver FTCD and the LC1 antigen. This work also showed that the LC1 antigen (FTCD) in human liver was present in two reversible mature forms, either free in the cytosol or bound to Golgi membranes. This high molecular weight, quaternary structure of the intracellular-located protein probably induces the B-cell response. In addition, the Golgi/hFTCD binding could be facilitated by LC1 autoantibodies, showing that LC1 autoantibodies promote and stabilize the quaternary structure of hFTCD. Thus, these autoantibodies recognize conformational epitopes on the mature protein. We can speculate that these autoantibodies, if they are able to penetrate the hepatocytes, are destabilizing the equilibrium between the cytosolic hFTCD and the Golgi membrane associated hFTCD. This imbalance could lead to harmful effects on some intracellular mechanisms and on the integrity of the cell. An other speculation consist to the initiation of the B-cell response due to an abnormal refolding of the hFTCD and /or due to the formation of aggregates caused by the these autoantibodies once the proteins is liberated in the circulation. This study also shows that due to the dual localization of the hFTCD, reactivity against hFTCD in patient sera should be tested when a band in the 58-66kD range is found by Western blotting against liver microsomal fractions. The *in vivo* study of the synthesis, subcellular distribution and degradation of the mature protein as well as the fate of resulting peptides will give new insight into this antigen role in the pathogenesis of AIH.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by a CIHR grant to Fernando Alvarez, M.D.

## REFERENCES

1. Alvarez, F., Berg, P. A., Bianchi, F. B., Bianchi, L., Burroughs, A. K., Cancado, E. L., Chapman, R. W., Cooksley, W. G., Czaja, A. J., Desmet, V. J., Donaldson, P. T., Eddleston, A. L., Fainboim, L., Heathcote, J., Homberg, J. C., Hoofnagle, J. H., Kakumu, S., Krawitt, E. L., Mackay, I. R., MacSween, R. N., Maddrey, W. C., Manns, M. P., McFarlane, I. G., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Zeniya, M., and et al. (1999). International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 31, 929-938.
2. Odievre, M., Maggiore, G., Homberg, J. C., Saadoun, F., Courouce, A. M., Yvart, J., Hadchouel, M., and Alagille, D. (1983). Seroimmunologic classification of chronic hepatitis in 57 children. *Hepatology* 3, 407-409.
3. Martini, E., Abuaf, N., Cavalli, F., Durand, V., Johanet, C., and Homberg, J. C. (1988). Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. *Hepatology* 8, 1662-1666.
4. Abuaf, N., Johanet, C., Chretien, P., Martini, E., Soulier, E., Laperche, S., and Homberg, J. C. (1992). Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis. *Hepatology* 16, 892-898.
5. Lapierre, P., Hajoui, O., Homberg, J. C., and Alvarez, F. (1999). Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 116, 643-649.
6. Beudet, R., and Mackenzie, R. E. (1976). Formiminotransferase cyclodeaminase from porcine liver. An octomeric enzyme containing bifunctional polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 453, 151-161.

7. Bashour, A. M., and Bloom, G. S. (1998). 58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase. *J Biol Chem* 273, 19612-7.
8. Mackenzie, R. E., and Baugh, C. M. (1980). Tetrahydropterolypolyglutamate derivatives as substrates of two multifunctional proteins with folate-dependent enzyme activities. *Biochim Biophys Acta* 611, 187-195.
9. Findlay, W. A., and MacKenzie, R. E. (1988). Renaturation of formiminotransferase-cyclodeaminase from guanidine hydrochloride. Quaternary structure requirements for the activities and polyglutamate specificity. *Biochemistry* 27, 3404-3408.
10. Bloom, G. S., and Brashear, T. A. (1989). A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *J Biol Chem* 264, 16083-16092.
11. Gao, Y., and Sztul, E. (2001). A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton. *J Cell Biol* 152, 877-894.
12. Muratori, L., Cataleta, M., Muratori, P., Lenzi, M., and Bianchi, F. B. (1998). Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis. *Gut* 42, 721-726.
13. Johnson, P. J., and McFarlane, I. G. (1993). Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 18, 998-1005.
14. Amar-Costesec, A., Wibo, M., Thines-Sempoux, D., Beaufay, H., and Berthet, J. (1974). Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. IV. Biochemical, physical, and morphological modifications of microsomal components induced by digitonin, EDTA, and pyrophosphate. *J Cell Biol* 62, 717-745.

15. Vitozzi, S., Lapierre, P., Djilali-Saiah, I., and Alvarez, F. (2002). Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein. *J Immunol Methods* 262, 103-110.
16. Tremblay, L. O., and Herscovics, A. (2000). Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi alpha 1, 2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis. *J Biol Chem* 275, 31655-31660.
17. Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M., and Berthet, J. (1974). Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. 3. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients. *J Cell Biol* 61, 213-231.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
19. Morre, D. J., Cheetham, R. D., and Nyquist, S. E. (1972). A simplified procedure for isolation of golgi apparatus from rat liver. *Prep Biochem* 2, 61-69.
20. Spector, D. L., Goldman, R. D., and Leinwand, L. A. (1998). Cells a laboratory manual. 72, 1-72.4.
21. Gaskin, F., Cantor, C. R., and Shelanski, M. L. (1974). Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Mol Biol* 89, 737-755.
22. Domingo, A., Sarria, A. J., Evans, R. M., and Klymkowsky, M. W. (1991). Studying intermediate filaments in the cytoskeleton: A practical approach. *K. Carraway and C. Carraway editions Oxford University press Washington D.C.*, 223-255.

23. Guldner, H. H., Netter, H. J., Szostecki, C., Lakomek, H. J., and Will, H. (1988). Epitope mapping with a recombinant human 68-kDa (U1) ribonucleoprotein antigen reveals heterogeneous autoantibody profiles in human autoimmune sera. *J Immunol* 141, 469-475.
24. Codoner-Franch, P., Paradis, K., Gueguen, M., Bernard, O., Costesec, A. A., and Alvarez, F. (1989). A new antigen recognized by anti-liver-kidney-microsome antibody (LKMA). *Clin Exp Immunol* 75, 354-358.
25. Ballot, E., Desbos, A., Auger, C., and Monier, J. C. (1996). Detection on immunoblot of new proteins from the microsomal fraction recognized by anti-liver-kidney microsome antibodies type 1. *Clin Immunol Immunopathol* 80, 255-265.
26. Alvarez, F., Bernard, O., Homberg, J. C., and Kreibich, G. (1985). Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 161, 1231-1236.
27. Lenzi, M., Manotti, P., Muratori, L., Cataleta, M., Ballardini, G., Cassani, F., and Bianchi, F. B. (1995). Liver cytosolic 1 antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection. *Gut* 36, 749-754.
28. Hennig, D., Scales, S. J., Moreau, A., Murley, L. L., De Mey, J., and Kreis, T. E. (1998). A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules. *J Biol Chem* 273, 19602-19611.
29. Laver, W. G., Air, G. M., Webster, R. G., and Smith-Gill, S. J. (1990). Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities. *Cell* 61, 553-556.

30. Schwartz, H. L., Chandonia, J. M., Kash, S. F., Kanaani, J., Tunnell, E., Domingo, A., Cohen, F. E., Banga, J. P., Madec, A. M., Richter, W., and Baekkeskov, S. (1999). High-resolution autoreactive epitope mapping and structural modeling of the 65 kDa form of human glutamic acid decarboxylase. *J Mol Biol* 287, 983-999.
31. Welin Henriksson, E., Wahren-Herlenius, M., Lundberg, I., Mellquist, E., and Pettersson, I. (1999). Key residues revealed in a major conformational epitope of the U1-70K protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14487-14492.
32. Hassfeld, W., Steiner, G., Studnicka-Benke, A., Skriner, K., Graninger, W., Fischer, I., and Smolen, J. S. (1995). Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 38, 777-785.
33. Deshmukh, U. S., Lewis, J. E., Gaskin, F., Dhakephalkar, P. K., Kannapell, C. C., Waters, S. T., and Fu, S. M. (2000). Ro60 peptides induce antibodies to similar epitopes shared among lupus-related autoantigens. *J Immunol* 164, 6655-6661.
34. Mackay, I. R., Whittingham, S., Fida, S., Myers, M., Ikuno, N., Gershwin, M. E., and Rowley, M. J. (2000). The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis. *Immunol Rev* 174, 226-237.
35. Muratori, L., Sztul, E., Muratori, P., Gao, Y., Ripalti, A., Ponti, C., Lenzi, M., Landini, M. P., and Bianchi, F. B. (2001). Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 34, 494-501.

36. Duclos-Vallee, J. C., Hajoui, O., Yamamoto, A. M., Jacz-Aigrain, E., and Alvarez, F. (1995). Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies. *Gastroenterology* 108, 470-476.
37. Ma, Y., Thomas, M. G., Okamoto, M., Bogdanos, D. P., Nagl, S., Kerkar, N., Lopes, A. R., Muratori, L., Lenzi, M., Bianchi, F. B., Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (2002). Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule. *J Immunol* 169, 277-285.
38. Bylund, D. J., and McHutchison, J. (1997). Autoimmune liver diseases. *Clin Lab Med* 17, 483-497.
39. Kaplan, M. M. (1983). The spectrum of chronic active liver disease. *Hosp Pract (Off Ed)* 18, 67-76.
40. Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (1998). Immunological liver diseases in children. *Semin Liver Dis* 18, 271-279.
41. Tan, E. M. (1991). Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67, 841-842.
42. Hajoui, O., Debray, D., Martin, S., and Alvarez, F. (2000). Auto-antibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children with auto-immune hepatitis. *Eur J Pediatr* 159, 310-313.
43. McFarlane, I. G., McFarlane, B. M., Major, G. N., Tolley, P., and Williams, R. (1984). Identification of the hepatic asialo-glycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LSP). *Clin Exp Immunol* 55, 347-354.

44. Ruiz-Arguelles, A., Perez-romano, B., Llorente, L., Alarcon-Segovia, D., and Castellanos, J. M. (1998). Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells. *J Autoimmun* 11, 547-556.
45. Ruiz-Arguelles, A., and Alarcon-Segovia, D. (2001). Penetration of autoantibodies into living cells 2000. *Isr Med Assoc J.* 3, 121-126.
46. Ruiz-Arguelles, A., and Alarcon-Segovia, D. Penetration of autoantibodies into living cells. In: Conrad K, Humbel RL, Meurer M, Shoenfeld T, Tan EM. *Eds. Pathogenic and Diagnostic Relevance of autoantibodies Update Clin Immunol.*
47. Omary, M. B., Ku, N. O., and Toivola, D. M. (2002). Keratins: guardians of the liver. *Hepatology* 35, 251-257.
48. Ku, N. O., Zhou, X., Toivola, D. M., and Omary, M. B. (1999). The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol* 277, G1108-G1137.
49. Meyer, O., Rouquette, A.-M., and Youinou, P. (1999). "Autoanticorps : marqueurs des maladies auto-immunes," BDM edition, Paris.
50. Kreis, T. E. (1990). Role of microtubules in the organisation of the Golgi apparatus. *Cell Motil Cytoskeleton* 15, 67-70.
51. Cole, N. B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 7, 631-650.
52. Fucini, R. V., Navarrete, A., Vadakkan, C., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Stamnes, M. (2000). Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes. *J Biol Chem* 275, 18824-18829.

53. Solans, A., Estivill, X., and de la Luna, S. (2000). Cloning and characterization of human FTCD on 21q22.3, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency. *Cytogenet Cell Genet* 88, 43-49.
54. Quinlan, R. A., Cohlberg, J. A., Schiller, D. L., Hatzfeld, M., and Franke, W. W. (1984). Heterotypic tetramer (A2D2) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells. *J Mol Biol* 178, 365-388.
55. Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., and Illmensee, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments. *Differentiation* 23, 43-59.
56. Franke, W. W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M., and Weber, K. (1979). Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* 123, 25-46.
57. McLean, W. H., and Lane, E. B. (1995). Intermediate filaments in disease. *Curr Opin Cell Biol* 7, 118-125.
58. Fuchs, E., and Cleveland, D. W. (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279, 514-519.
59. Chou, Y. H., and Goldman, R. D. (2000). Intermediate filaments on the move. *J Cell Biol* 150, F101-F166.
60. Gilbert, S., Loranger, A., Daigle, N., and Marceau, N. (2001). Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation. *J Cell Biol* 154, 763-773.

61. Eto, H., Yoon, S. S., Bode, B. P., Kamidono, S., Makino, K., Saya, H., Nakamura, H., and Tanabe, K. K. (2000). Mapping and regulation of the tumor-associated epitope recognized by monoclonal antibody RS-11. *J Biol Chem* 275, 27075-27083.
62. Dustin, P. (1984). "Microtubules 2nd Edition," Spinger-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo.
63. Hyams, R. (1979). "Microtubules," Academic Press, London.
64. Han, S., Tredger, M., Gregorio, G. V., Mieli-Vergani, G., and Vergani, D. (1995). Anti-liver cytosolic antigen type 1 (LC1) antibodies in childhood autoimmune liver disease. *Hepatology* 21, 58-62.
65. Murota, M., Nishioka, M., Fujita, J., Dobashi, N., Wu, F., Ohtsuki, Y., Hojo, S., Takahara, J., and Kuriyama, S. (2001). Anti-cytokeratin antibodies in sera of the patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 125, 291-299.

## LEGENDS

**Figure 1. *Western blot analysis of the Golgi 58kD protein and the LC1 antigen.*** The anti-58kD Golgi protein (rat-FTCD) antibody recognized a protein located mainly in subcellular fractions 10 to 12. The LC1 positive serum (anti-hFTCD) recognized a protein with a similar subcellular location. A LKM1 positive serum directed only against the CYP2D6 showed a band present in each subcellular fraction, with a larger representation in fraction 9, where the smooth-endoplasmic reticulum membranes are identified.

**Figure 2. *Indirect immunofluorescence localization of hFTCD.*** a) The double-staining of HepG2 cells with LC1 positive serum and anti- $\alpha$ -1,2-mannosidase 1C show a homogenous staining of the cytoplasm by the LC1-antibodies and a perfect co-localization between hFTCD and  $\alpha$ -1,2-mannosidase 1C (a Golgi specific transmembrane protein) at the Golgi apparatus. b) And c) HepG2 were also co-stained with LC1 positive serum and anti-tubulin, anti-K8 or anti-K18. Absence of superposition between hFTCD and HepG2 cytoskeleton proteins indicate that hFTCD do not participate in Golgi/cytoskeleton interactions.

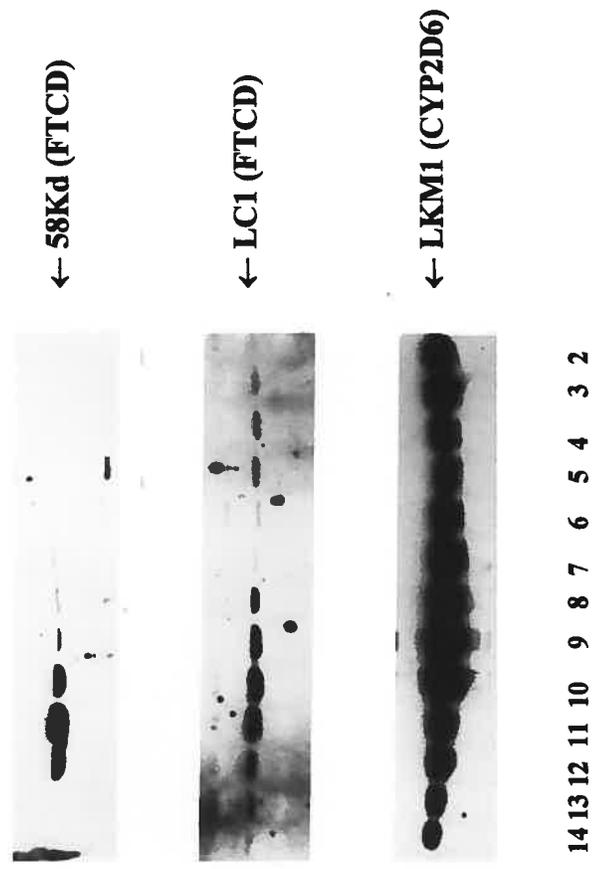
**Figure 3. a) *The LC1 antigen is present on the Golgi membranes and in relatively more important amounts in the cytosol from human liver.*** The LC1 antigen (hFTCD) was detached from Golgi membranes using  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH11) (P= pellet; S=supernatant). b) When stripped Golgi membranes (P) (Golgi washed with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH11)) were incubated with different amount of liver cytosolic protein, it was shown that the LC1 antigen (hFTCD) reattached to the membranes.

**Figure 4. Patients' sera enhance the formation of the hFTCD/Golgi complex.** The Golgi stripped membranes ( Golgi washed with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (pH11)) was mixed at a ratio of 1:1 with the cytosolic fraction that was preincubated with different sera (3 type 2 AIH LC1 positive sera and a normal human serum). A distinct enhancement of the binding of hFTCD to the Golgi by the autoantibodies was observed.

**Figure 5. a) The *in vitro* synthesized hFTCD is specifically immunoprecipitated by LC1 positive serum and rabbit anti-hFTCD antibodies.** The labeled hFTCD ( $4.7 \times 10^5$  CPM) was incubated with different sera (normal human serum, LKM1+/LC1- serum, rabbit anti-FTCD serum and two LC1 positive sera). The *in vitro* hFTCD is specifically immunoprecipitated by LC1 positive and rabbit anti-FTCD sera. **b) The *in vitro* synthesized hFTCD bind more avidly to the untreated Golgi membrane.** The labeled FTCD ( $6.0 \times 10^5$  cpm) was incubated with untreated Golgi and treated Golgi. The *in vitro* hFTCD bind more avidly to the non treated Golgi membrane.

**Figure 6. a) *In vitro* FTCD binds to the Golgi apparatus and its binding is enhanced by LC1 positive serum.** Using increasing concentration of labeled hFTCD it was shown that A) hFTCD binds in a concentration dependant manner to treated (pH 11) and untreated Golgi membranes; B) LC1 positive serum enhances binding to both treated and untreated Golgi membranes. In A and B experiments *in vitro* synthesized FTCD binds more avidly to untreated Golgi membranes. **b) Binding enhancement of hFTCD to the Golgi apparatus is specific to LC1 positive serum.** When pre-incubated with different sera (SMA positive, LC1 positive or 58k-9) an increased of the binding induced by LC1 positive serum, as shown by the elevated amount of labeled hFTCD in the pellet (P) fractions compared to its supernatant (S), was observed.

Figure 1



**Human liver subcellular fractions**

**Figure 2**

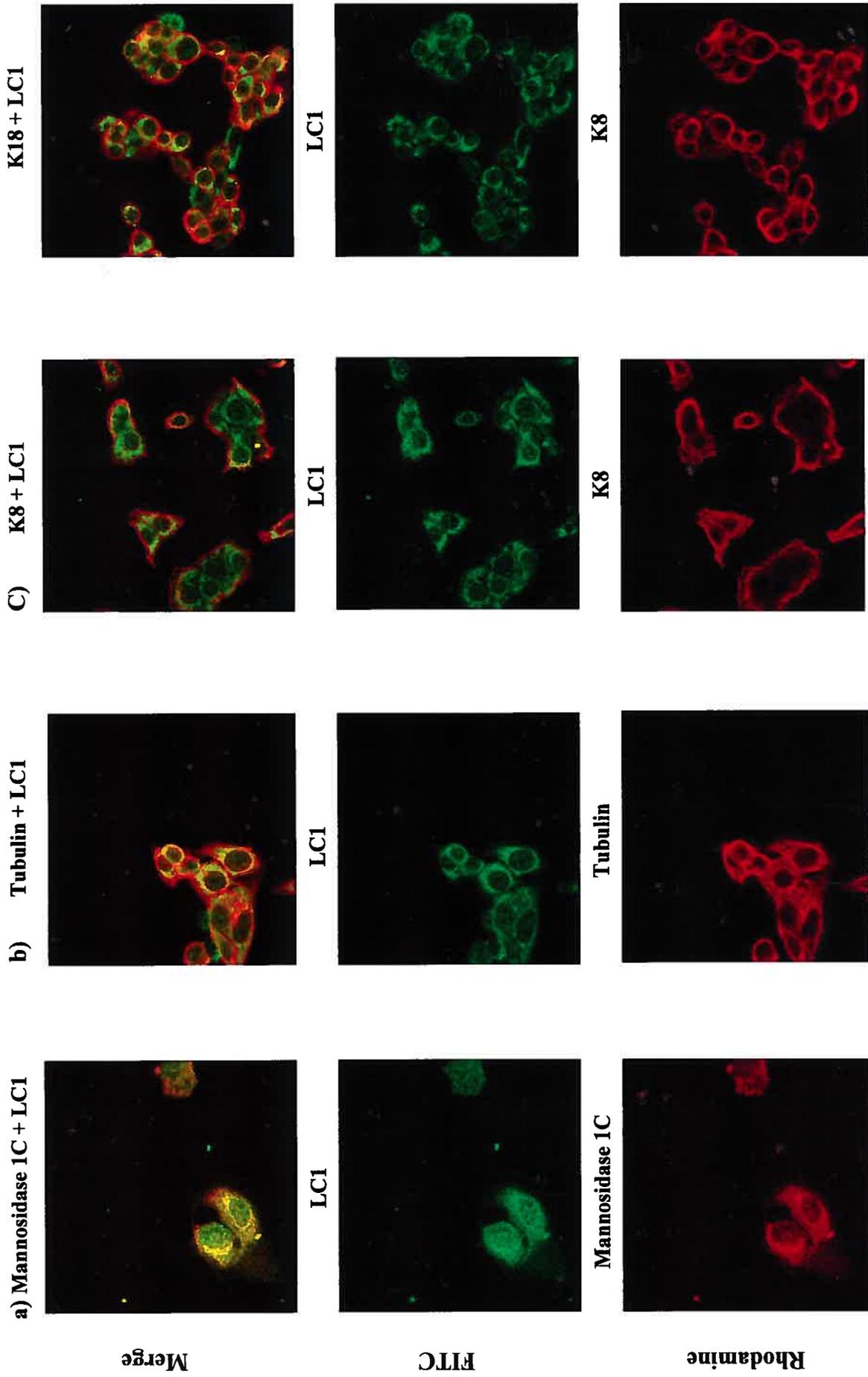


Figure 3

a) b)

Treated subcellular fractions

DOC 0.05 %    Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 11)

P S P S



Cytosol Golgi Golgi (pH 11) Golgi+Cytosol  
P S P S 1:1 1:2 1:3

Figure 4

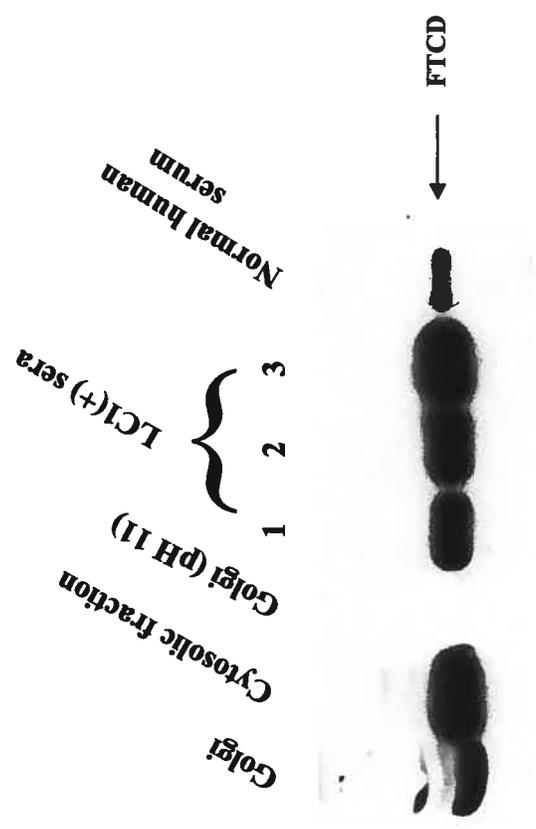


Figure 5

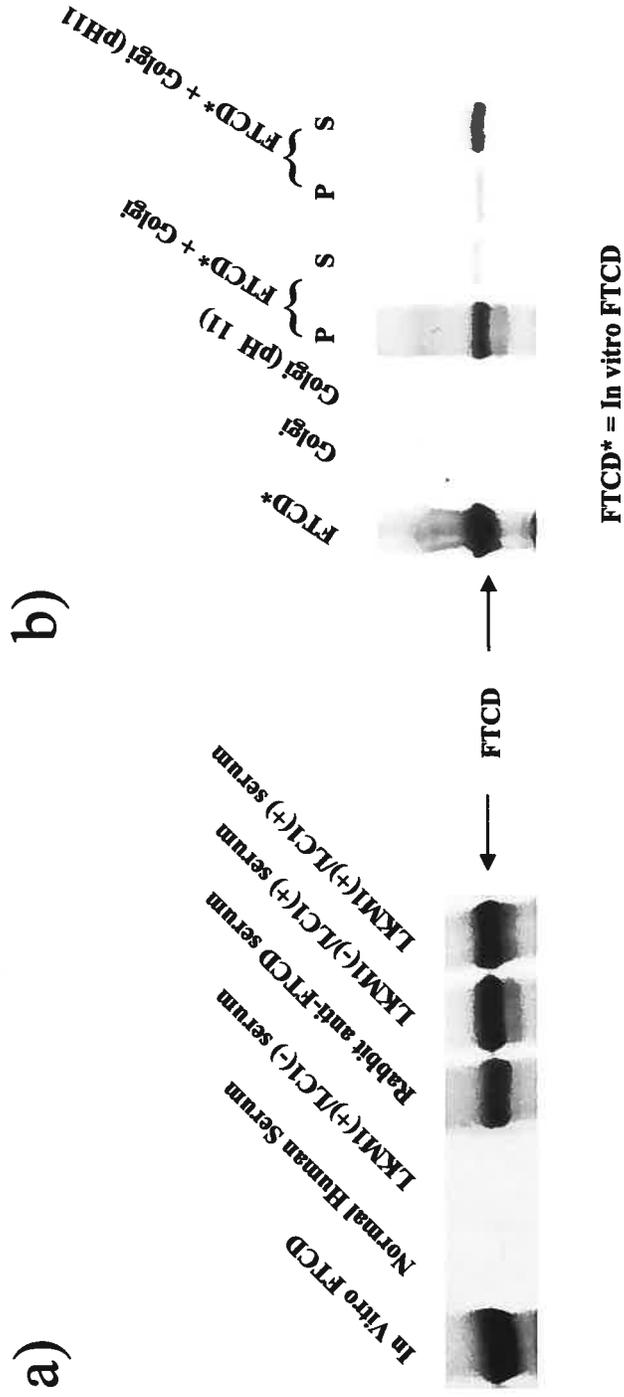
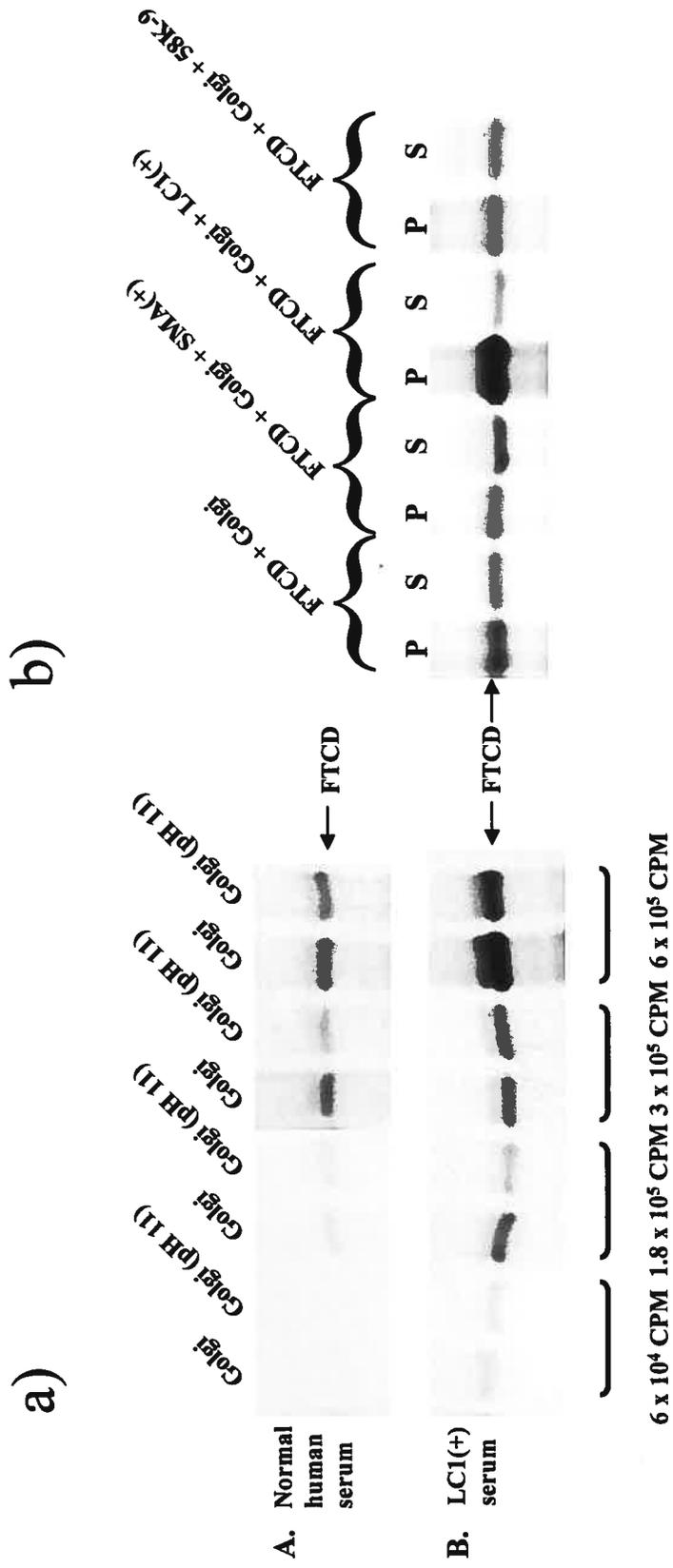


Figure 6



#### 4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les hépatites auto-immunes représentent un exemple de maladies auto-immunes pour laquelle, bien qu'il existe des critères diagnostiques précis et une thérapeutique immunosuppressive efficace, de nombreuses interrogations subsistent. Par exemples, la nature des autoantigènes, la nature des mécanismes effecteurs, la compréhension des formes frontières et la prise en charge des formes cortico-résistantes [79]. En effet, plus de 40 ans après sa première description formelle, l'hépatite auto-immune est, jusqu'à présent, considérée comme un désordre hépatique nécro-inflammatoire cryptogénique, pour lequel la pathogenèse demeure énigmatique [98]. Il est donc évident qu'une meilleure compréhension des facteurs ainsi que des mécanismes immunologiques impliqués dans cette pathologie permettra de développer des traitements mieux ciblés à cette pathologie.

Dans cette optique, notre étude a porté sur la caractérisation des autoanticorps anti-LC1, de l'autoantigène LC1 qui est reconnu par ces derniers ainsi que la capacité de l'antigène LC1 de s'associer à différentes composantes intra-cellulaires des hépatocytes.

Les autoanticorps anti-LC1 représentent l'un des marqueurs immunologiques d'HAI de type 2. En effet, l'HAI de type 2 correspond à un sous groupe d'HAI bien distinct tant pour ses caractéristiques sérologiques que cliniques. Cette entité généralement négative pour les autoanticorps ANA et SMA et positive pour les autoanticorps LKM1 et/ou LC1 [63, 78, 113, 151, 152] suscite beaucoup d'intérêt dans notre laboratoire.

Les autoanticorps anti-LC1 sont retrouvés chez 71% des patients atteints d'HAI de type 2, et sont dans la plupart du temps associés aux anticorps LKM1. Par contre dans 19% des cas, ils représentent les seuls marqueurs immunologiques [117]. Fait important à noter, le titre de ces anticorps est étroitement relié au degré de l'inflammation, ce qui laisse présager que ces derniers pourraient jouer un rôle dans la pathogenèse de l'HAI de type 2 [147], du moins chez les patients ayant ces

autoanticorps. Cependant, le(s) mécanisme(s) qui initie(nt) et qui maintient(nent) la production de ces anticorps est(sont) inconnu(s). L'identification par notre équipe, de la formiminotransférase-cyclodésaminase humaine (hFTCD), une protéine spécifique du foie, comme l'antigène cible reconnu par les autoanticorps anti-LC1 [118] a donc été une étape importante dans la compréhension du rôle des autoanticorps anti-LC1 dans la pathologie. Nous avons débuté cette étude par l'analyse de la distribution sous-cellulaire de la hFTCD dans les hépatocytes dans le but de mieux comprendre et de concevoir de nouvelles hypothèses sur le développement de la réponse immunitaire contre cette protéine intra-cellulaire. Ainsi, nous croyons que les sites de localisation de cette enzyme pourraient influencer sa structure et son activité dans la cellule aussi bien que sa dégradation par les protéasomes et sa présentation au système immunitaire. De plus, les différentes études laissant croire que la réponse auto-immune à médiation humorale est déclenchée et entretenue par l'antigène [153] furent un autre facteur incitatif qui nous a mené à étudier la localisation de la hFTCD dans les hépatocytes ainsi que ses propriétés de liaison. Ceci implique donc qu'une exposition répétée de la hFTCD au système immunitaire serait responsable de la production et de la spécificité des autoanticorps anti-LC1. Conséquemment, la structure conformationnelle de la hFTCD et sa localisation sous-cellulaire peuvent modifier son antigénicité une fois libérée du foie lors de l'apoptose ou de la lyse cellulaire.

Jusqu'à présent, les autoantigènes des cellules hépatiques ont été étudiés principalement à l'aide de fractions microsomales. Il a été démontré que les sérums de certains patients atteints d'HAI de type 2 avaient, en plus des anticorps anti-CYP 2D6 (anti-LKM1), des anticorps capables de reconnaître un antigène de 58 kDa ou 62 kDa présent dans des fractions microsomales de foie de rats et d'humains respectivement [154, 155]. Ainsi, pour déterminer la localisation sous-cellulaire de la hFTCD dans les hépatocytes, nous avons procédé à un fractionnement cellulaire du foie humain suivi d'un Western blot, ainsi qu'à une immunofluorescence indirecte sur des cultures de cellules HepG2. (Les cellules HepG2 sont issues d'hépatocarcinomes humain et comme les hépatocytes elles produisent l'antigène

LC1 ainsi que tous les constituants du cytosquelette retrouvés dans les hépatocytes normaux). À titre de contrôle nous avons utilisé l'anticorps monoclonal 58 K-9, un anticorps commercial spécifique à l'appareil de Golgi qui reconnaît la FTCD de rat. Tel qu'observé sur la figure 1 (de l'article), on peut remarquer que cet anticorps reconnaît une protéine hépatique de 62 kDa principalement localisée dans les échantillons 10 à 12 du fractionnement sous-cellulaire de foie humain. Nous avons donc proposé, suite à ce résultat, que la protéine de 62 kDa reconnue par l'anticorps anti-Golgi 58 kDa correspond à l'homologue humain de la formiminotransférase-cyclodésaminase chez le rat. Tel que prévu, la distribution de l'antigène LC1 révélée avec un sérum de patient HAI de type 2 (anti-LC1 positif/ LKM1 négatif) correspondait également aux fractions 10 à 12, ce qui a confirmé notre hypothèse. À l'opposé, les sérums positifs pour LKM1 et négatifs pour LC1 dirigés contre le CYP 2D6 ont marqué deux régions de fortes intensité, soit une au niveau de la fraction 3 et l'autre au niveau de la fraction 9; fractions qui correspondent respectivement à la membrane du réticulum endoplasmique rugueux et à la membrane du réticulum endoplasmique lisse [156]. Ces résultats ont confirmé des études préalables où il a été démontré que l'antigène LKM1 est retrouvé en plus grande quantité dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse et en plus faible quantité dans la membrane du réticulum endoplasmique rugueux [157]. Afin de déterminer plus précisément la localisation de la hFTCD dans les hépatocytes, nous avons effectué une immunofluorescence indirecte sur des sections de cryostat de foie de rats utilisant des sérums LC1+/LKM1- (résultat non montré). Les résultats obtenus ont montré un marquage diffus au niveau du cytoplasme des hépatocytes. Cette technique n'était pas la plus appropriée pour identifier un marquage particulier au niveau des organelles. L'immunofluorescence indirecte à microscopie confocale sur des cultures de cellules HepG2 était donc une meilleure approche pour déterminer une éventuelle liaison de l'antigène LC1 avec des constituants intra-cellulaires. En effet, cette technique nous a permis d'identifier clairement une double localisation de l'antigène LC1 (figure 2a de l'article). Cette étude sur la localisation de la hFTCD dans les hépatocytes montre que la FTCD est présente sur la membrane de l'appareil de Golgi, tel qu'il a été montré par des études effectuées chez le rat et le

poulet, mais également au niveau des fractions cytosoliques de foie [52]. Cette “double” localisation, c’est-à-dire, libre dans le cytosol et associée à la membrane de l’appareil de Golgi, explique des résultats déjà publiés où il a été observé que des sérums de patients HAI de type 2 reconnaissent un antigène de poids moléculaire identique dans des fractions microsomales et cytosoliques de foie [52, 145, 147]. Ainsi la présence de la FTCD (protéine soluble) dans les fractions microsomales peut s’expliquer par sa capacité de se lier à l’appareil de Golgi. Le fait que la FTCD chez le rat et chez l’humain ait un poids moléculaire de 58 kDa et 62 kDa respectivement, nous a mené à spéculer que l’autoantigène microsomal reconnu par les sérums des patients HAI de type 2 à 58 kDa ou 62-66 kDa pourrait être la FTCD liée à la membrane de l’appareil de Golgi. De plus, il a été démontré que l’antigène microsomal de rat de 58 kDa reconnu par les sérums de patients HAI de type 2 n’est pas une protéine intégrale de l’appareil de Golgi, ce qui confirme nos résultats sur la double localisation de la hFTCD.

Tel que mentionné plutôt, la FTCD de rat et de poulet se retrouve au niveau de la membrane cytosolique de l’appareil de Golgi [149, 158], par contre, le rôle qu’elle joue à cet emplacement est inconnu. L’antigène LC1 (hFTCD) montre également des caractéristiques similaires, puisque qu’il se détache du complexe golgien après traitement avec un détergent doux ou avec un tampon alcalin pH 11 (Figure 3 de l’article). Ce résultat montre que l’antigène LC1 (hFTCD) est une protéine associée et non pas une protéine transmembranaire de l’appareil de Golgi. Le site de liaison de la hFTCD sur la membrane sous-cellulaire n’a pas été affecté par les traitements mentionnés plus haut, tel que montré par la réassociation de la hFTCD cytosolique à la membrane de l’appareil de Golgi préalablement traitée (Figure 3 de l’article). La FTCD cytosolique ainsi que la FTCD sous sa forme associée à la membrane de l’appareil de Golgi sont interchangeable, ce qui signifie que la protéine est dans son état fonctionnel mature, ou du moins, que toutes les composantes nécessaires à la reconstitution de sa structure native étaient présentes dans cette expérience particulière.

Une expérience similaire utilisant la hFTCD synthétisée *in vitro* montre également la capacité de cette dernière à se lier à la membrane de l'appareil de Golgi. Par ailleurs, on remarque que la hFTCD *in vitro* s'associe avec une plus grande avidité à la membrane de l'appareil de Golgi non traitée (Figure 5b de l'article). Dans cette expérience de liaison, la hFTCD synthétisée *in vitro* s'intègre à la membrane de l'appareil de Golgi sous sa forme la plus simple, c'est-à-dire, non pas sous sa forme octamérique, mais en tant qu'unité. Ainsi, les unités d'hFTCD *in vitro* peuvent s'incorporer et compléter les tétramères de dimères incomplets déjà existant au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi non traitée; ou former de nouveaux complexes au niveau de la membrane de l'appareil de Golgi traitée. À des concentrations différentes de hFTCD synthétisée, on observe clairement que la membrane non traitée de l'appareil de Golgi offre de meilleures conditions permettant la formation du complexe hFTCD/Golgi (Figure 6 de l'article). La formation spontanée du complexe mature semble être possible, mais à un degré plus faible (Figure 6a :A de l'article). Ainsi, la complexité chimique, le haut poids moléculaire de la protéine native (huit sous unités identiques de 62 kDa chacune), et la stabilité de la protéine influenceraient la production des autoanticorps anti-LC1 chez les patients atteints d'HAI de type 2.

Nous avons par la suite étudié l'effet des autoanticorps anti-LC1 sur la formation du complexe hFTCD/Golgi. Nous avons pu observer suite à une pré-incubation des fractions cytosoliques avec différents anticorps que seuls les anticorps dirigés contre la hFTCD provenant de patients LC1 positifs favorisaient la formation du complexe hFTCD/Golgi, phénomène inattendu, puisque l'on croyait que ces autoanticorps inhiberaient ou du moins n'auraient, comme tous les autres anticorps, y compris les anticorps anti-LCHC1 de lapin (résultat non montré), aucun effet sur la formation du complexe (Figure 4 de l'article). De plus, des résultats similaires ont été observés lors de l'utilisation la protéine hFTCD recombinante (Figure 6B de l'article). La capacité des autoanticorps anti-LC1 d'augmenter la formation du complexe hFTCD/Golgi suggère soit que ces anticorps sont dirigés contre le complexe, par le fait même stabilisent ce dernier, ou soit que la liaison

autoanticorps anti-LC1/hFTCD favorise la conformation octamérique de la hFTCD et par ce fait son association à la membrane de l'appareil de Golgi. Ainsi, les résultats qui montrent que les autoanticorps anti-LC1 reconnaissent la forme native de la hFTCD et également sa structure quaternaire nous ont mené à déduire que ces autoanticorps reconnaissent des épitopes conformationnels sur la hFTCD. Notre déduction concorde avec les études qui ont montré que les épitopes reconnus par les autoanticorps sont majoritairement conformationnels, c'est-à-dire hautement dépendant de la structure tridimensionnelle de la protéine [159-164]. Étant donné que l'anti-sérum LCHC1 de lapin a été obtenu par immunisation avec LCHC1 qui correspond à la partie C-terminale de la hFTCD, il est probable que ces anticorps ne se lient pas à la forme octamérique de la hFTCD, ou du moins le font de façon inadéquate. Nous pouvons spéculer de ces résultats que les patients ont été immunisés par la hFTCD sous sa forme octamérique ou associée à la membrane de l'appareil de Golgi. Nos spéculations corrélerent avec des études effectuées par Muratori et al. [165], Duclos-Vallée et al. [166], et Ma et al. [167] où il est démontré que les autoanticorps anti-LC1 et LKM1 chez les patients atteints d'HAI de type 2 reconnaissent majoritairement les épitopes conformationnels sur la hFTCD et le CYP2D6 respectivement.

Comment et pourquoi la hFTCD ou le complexe hFTCD/Golgi qui sont des éléments intra-cellulaires à l'abri des anticorps peuvent-ils être ciblés par le système immunitaire sont des questions que l'on se pose présentement et qui restent jusqu'à ce jour sans réponse. Il est de plus, difficile de déterminer et d'étudier les facteurs qui déclenchent l'HAI de type 2 puisque le diagnostic dans la plupart des cas est souvent précédé par une longue phase asymptomatique ou par des symptômes non spécifiques incluant la fatigue, des malaises, l'anorexie, des nausées/vomissements, une perte de poids, la fièvre, des maux de tête et occasionnellement des douleurs abdominales [74, 75, 80]. De plus, Les caractéristiques imprécises de l'évolution de l'HAI mènent à un diagnostic tardif de la maladie. Dans les circonstances où les anticorps sont dirigés contre des antigènes de surface de la membrane plasmique d'une cellule, il est concevable de considérer que ces derniers peuvent avoir un rôle

à jouer dans la pathogenèse de la maladie [124, 168, 169]. Cependant, l'antigène LC1 est une protéine intra-cellulaire localisée à des endroits normalement inaccessibles aux anticorps circulant; alors il est difficile de percevoir comment la hFTCD pourrait être impliquée dans la pathogenèse de l'HAI de type 2. Dans certaines circonstances inhabituelles, des molécules peuvent échapper à la dégradation autolytique et peuvent être libérées dans le milieu extra-cellulaire; dans ce cas, ces molécules sont aptes à réagir avec les anticorps circulants préexistants, formant un complexe antigène/anticorps capable d'initier une réponse inflammatoire [168]. Récemment, des données expérimentales et des observations cliniques ont défié le concept selon lequel les autoanticorps étaient incapables de pénétrer les cellules vivantes [170, 171]. En effet, des études *in vitro* ont montré que plusieurs anticorps étaient capables de pénétrer à l'intérieur des cellules animales et humaines et ont ainsi fourni des évidences selon lesquelles les interactions entre les anticorps et les antigènes intra-cellulaires peuvent affecter le fonctionnement intra-cellulaire, ce qui peut expliquer les caractéristiques physiopathologiques et cliniques des MAI [172]. Une caractérisation plus approfondie de la réponse à médiation humorale dirigée contre la hFTCD, telle qu'une cartographie des épitopes linéaires, pourra apporter plus d'informations sur comment et pourquoi les autoanticorps anti-LC1 augmentent la formation du complexe hFTCD/Golgi ou la formation de la structure octamérique de la hFTCD. De plus, cette caractérisation pourra également apporter plus d'informations sur l'implication des autoanticorps anti-LC1 dans l'HAI de type 2 et sur le mécanisme qui stimule les lymphocytes B à produire des autoanticorps contre la hFTCD.

L'étape suivante de notre étude a été de déterminer si la hFTCD pouvait s'associer à des constituants du cytosquelette des hépatocytes. La formation possible de complexes entre les protéines du cytosquelette et la hFTCD pourrait stimuler, par les mécanismes énoncés plus haut, la réponse humorale. Les trois principaux types de protéines du cytosquelette des cellules eucaryotes sont l'actine qui forment les microfilaments; la tubuline formant les microtubules; et les filaments intermédiaires [173] formés par la vimentine, la desmine ou la kératine. Ces

protéines du cytosquelette sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires importantes incluant le maintien de l'intégrité cellulaire, le transport vésiculaire et la réponse face au stress [174]. De plus en plus d'arguments laissent croire que ces trois types majeurs de protéines du cytosquelette ou les protéines qui leurs sont associées auraient un rôle à jouer dans plusieurs pathologies humaines [173]. De plus, des anticorps contre les protéines du cytosquelette sont retrouvés dans plusieurs MAI, par exemple, des anticorps anti-actine dans l'HAI de type 1 et dans le lupus érythémateux, des anticorps anti-tubuline dans la thyroïdite auto-immune, et des anticorps anti-vimentine dans le syndrome de Gougerot-Sjögren pour ne nommer que ceux-là [175]. Une liaison entre la hFTCD et les protéines du cytosquelette pourrait représenter une cible importante pour le système immunitaire et ainsi générer la production d'autoanticorps par les lymphocytes B. Les interactions entre l'appareil de Golgi et les microtubules [176, 177], l'actine [178] et récemment avec la vimentine [150] sont bien documentées. Des études récentes utilisant la FTCD de rat ont démontré que cette protéine avait la capacité de se lier à des constituants du cytosquelette extra-hépatiques tels les microtubules du cerveau [149, 179] et à la vimentine [150]. En effet la FTCD est une protéine spécifique du foie qui est associée à l'appareil de Golgi [72, 118, 179, 180]. Cependant, la vimentine est un filament intermédiaire exprimé majoritairement dans les cellules mésenchymateuses, certaines cellules non-épithéliales et des cellules adaptées à la culture [181-183]. La kératine, d'un autre côté, constitue la famille la plus diversifiée des filaments intermédiaires comprenant 20 protéines subdivisées en type 1 (K9 à K20) et en type 2 (K1 à K8) [184, 185]. Contrairement à la vimentine, la kératine est exprimée dans les cellules épithéliales mono ou pluristratifiées incluant les cellules du foie. Les hépatocytes comprennent uniquement des cytokératines 8 et 18 (K8 e/ K18) [184, 185]. De plus, même si la tubuline ( $\alpha$  et  $\beta$ ), les sous unités des microtubules, sont des protéines hautement conservées au cours de l'évolutions, il n'en reste pas moins que des différences inter-organes, inter- et intra-espèces peuvent subsister [186, 187]. Il a été suggéré que la FTCD de rat, en plus de son activité enzymatique, a un rôle à jouer dans les interactions entre l'appareil de Golgi et les protéines du cytosquelette [150]. Les résultats montrant que la FTCD se lie à la vimentine [150]

nous ont mené à spéculer que la hFTCD pourrait se lier à la cytokératine 8 et/ou à la cytokératine 18 et servir de protéine intermédiaire dans les interactions entre l'appareil de Golgi et les protéines du cytosquelette. Plusieurs raisons et arguments laissent place à une possible interaction entre l'appareil de Golgi, la hFTCD et les protéines du cytosquelette des hépatocytes et par le fait même soulèvent l'hypothèse que les protéines du cytosquelette pourraient induire ou faciliter le développement des autoanticorps anti-LC1. Tout d'abord, la hFTCD a été identifiée comme étant l'antigène LC1 dans l'HAI de type 2 [118], ensuite, les anticorps qui lui sont assignés ont été associés dans certains cas aux anticorps SMA (anticorps contre les filaments d'actine) chez les patients atteints d'HAI [188]; et finalement, on a retrouvé chez 30% des patients atteints d'HAI un taux élevé d'anticorps anti-kératine 8 et 18 [189]. Pour ces raisons, il était donc essentiel de vérifier si la hFTCD avait la capacité de s'associer aux constituants majeurs du cytosquelette des hépatocytes. Les résultats de nos tests de liaison *in vitro* entre les microtubules des hépatocytes et la hFTCD ainsi que l'immunofluorescence indirecte à double marquage n'ont révélé aucune interaction apparente entre ces deux protéines. Ces résultats concordent avec des études préalables ayant montré que la FTCD ne permettait pas le lien entre la membrane de l'appareil de Golgi et la tubuline hépatique [179]. Contrairement aux études effectuées avec la vimentine et la FTCD de rat [150], nos tests de liaison *in vitro* ainsi que les immunofluorescences indirectes à double marquage n'ont révélée aucune colocalisation ou association entre la hFTCD et la K8 ou K18. Ces résultats suggèrent, contrairement à ce qui était proposé par d'autres [150], que la FTCD ne participe pas aux interactions entre l'appareil de Golgi et les protéines du cytosquelette hépatique. Cette possible interaction aurait pu être une étape importante dans la compréhension du mécanisme par lequel la hFTCD est exposée au système immunitaire. En général, les résultats des tests de liaison impliquant la tubuline et la cytokératine humaine démontrent que l'affinité de la hFTCD pour des constituants du cytosquelette hépatique est invraisemblable malgré le fait qu'elle peut se lier à des constituants du cytosquelette extra-hépatique. La divergence entre nos résultats et ceux de la littérature concernant l'interaction entre la FTCD et les constituants du cytosquelette peuvent

facilement s'expliquer par le fait que toutes nos expériences ont été effectuées à partir de matériels hépatiques, contrairement aux études décrites dans la littérature. Or, les résultats de ces études ont pu être biaisés par la présence de constituants extra-hépatiques.

Cette étude a apporté des arguments additionnels sur l'identité de l'antigène LC1 comme étant la hFTCD. Cet ouvrage démontre également que l'antigène LC1 chez l'humain est présent sous deux formes natives réversibles, soit sous la forme libre dans le cytosol ou liée à la membrane de l'appareil de Golgi. Le haut poids moléculaire de la hFTCD, sa structure quaternaire complexe et sa localisation intracellulaire influencent probablement la réponse immunitaire humorale. De plus, l'association hFTCD/Golgi est facilitée par les autoanticorps anti-LC1, ce qui implique que les autoanticorps anti-LC1 favorisent et stabilisent la structure quaternaire de la hFTCD. Ainsi, ces autoanticorps reconnaissent des épitopes conformationnels sur la protéine native. On peut donc suggérer que ces autoanticorps déstabilisent l'équilibre entre la hFTCD soluble et celle associée à la membrane de l'appareil de Golgi et ainsi pourraient avoir un effet néfaste sur certains mécanismes intra-cellulaires, si naturellement, ces derniers sont aptes à pénétrer les hépatocytes; ou bien, ces autoanticorps favoriseraient un repliement structurel anormal de la hFTCD et/ou la formation d'un agrégat d'hFTCD favorable au développement de la réponse humorale. Cette étude montre aussi que du à la double localisation de la protéine dans les hépatocytes, les sérums de patients devraient être testés lorsqu'une bande de 58-66 kDa est présente lors de Western blot sur des fractions microsomales. L'étude *in vivo* de la synthèse, de la distribution et de la dégradation de la protéine native devrait nous éclairer davantage sur le rôle de cet antigène dans la pathogenèse de l'HAI.

## 5. SOURCES DOCUMENTAIRES

1. Oillier W, S.D., *Autoimmunity*. Bios ed. Medical Perspectives series, ed. T.B. Andrew P.Read. 1992, Manchester: Bios Scientific Publishers limited. 142.
2. Janeway, C.A., J.r. Travers, and P. Travers, *Immunobiologie*. DeBoeck University ed. 1996: Current Biology Ltd, Garland Publishing Inc. 582.
3. Prescott, Harley, and Klein, *Microbiologie*. 1995: DeBoeck University. pages 1014.
4. Anderson, D.E. and D.A. Hafler, *Immune tolerance and the nervous system*. Adv Exp Med Biol, 2001. **490**: p. 79-98.
5. Brostoff, J., et al., *Immunologie clinique*. 1993, Bruxelles Belgique: DeBoeck University. pages 438.
6. Benjamini, E., G. Sunshine, and S. Leskowitz, *Immunology: A Short course third Edition*. 1996: Edition Wiley-Liss. pages 484.
7. Tortora, G.J. and R.S. Grabowski, *Principes d'anatomie et de physiologie*. 1993: edition CEC. pages 1204.
8. Lahita, R.G., N. Chiorazzi, and W.H. Reeves, *textbook of the autoimmune diseases*. 2000, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. xxiii, 883 . [12] de pl.
9. Humbel, R.L., *Auto-anticorps et maladies auto-immunes 2ieme Edition*. 1997: Collection Otion Bio. pages 278.

10. El-Amine, M., M.E. Melo, and D.W. Scott, *Gene therapy for tolerance and autoimmunity: soon to be fulfilled promises?* Clin Immunol, 2001. **99**(1): p. 1-6.
11. Mackay, I.R., *Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity.* BMJ, 2000. **321**(7253): p. 93-6.
12. Stockinger, B., *T lymphocyte tolerance: from thymic deletion to peripheral control mechanisms.* Adv Immunol, 1999. **71**: p. 229-65.
13. Goodnow, C.C., *Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2264-71.
14. Bach, J.F., *Control of autoreactive T cell activation by immunoregulatory T cells (ART).* Adv Exp Med Biol, 2001. **490**: p. 67-77.
15. Lernmark, A., *Autoimmune diseases: are markers ready for prediction?* J Clin Invest, 2001. **108**(8): p. 1091-6.
16. Gebbers, J.O., *[The environment and autoimmunity--from external causes to inner conflicts].* Schweiz Rundsch Med Prax, 2001. **90**(44): p. 1913-22.
17. yahoo and encyclopedia, *l'auto-immunité:* Hachette Multimédia. 2001.  
[http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/so/so\\_419\\_p0.html#so\\_419.3](http://fr.encyclopedia.yahoo.com/articles/so/so_419_p0.html#so_419.3).
18. Jacobson, D.L., et al., *Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States.* Clin Immunol Immunopathol, 1997. **84**(3): p. 223-43.
19. Marrack, P., J. Kappler, and B.L. Kotzin, *Autoimmune disease: why and where it occurs.* Nat Med, 2001. **7**(8): p. 899-905.

20. Mathews, M.B. and R.M. Bernstein, *Myositis autoantibody inhibits histidyl-tRNA synthetase: a model for autoimmunity*. Nature, 1983. **304**(5922): p. 177-9.
21. Matsumoto, I., et al., *Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1732-5.
22. Sherman, L.A., *Autoimmunity Greater complexity, Greater opportunity*. Current opinion in Immunology, 2001. **13**: p. 637-638.
23. Avrameas, S. and T. Ternynck, *Natural autoantibodies: the other side of the immune system*. Res Immunol, 1995. **146**(4-5): p. 235-48.
24. Moalem, G., et al., *Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 49-55.
25. Verhasselt, V. and M. Goldman, *From autoimmune responses to autoimmune disease: what is needed?* J Autoimmun, 2001. **16**(3): p. 327-30.
26. Wucherpfennig, K.W., *Structural basis of molecular mimicry*. J Autoimmun, 2001. **16**(3): p. 293-302.
27. Kissler, S., S.M. Anderton, and D.C. Wraith, *Antigen-presenting cell activation: a link between infection and autoimmunity?* J Autoimmun, 2001. **16**(3): p. 303-8.
28. Meyer zum Buschenfelde, K.H. and H.P. Dienes, *Autoimmune hepatitis. Definition--classification--histopathology--immunopathogenesis*. Virchows Arch, 1996. **429**(1): p. 1-12.

29. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
30. Ermann, J. and C.G. Fathman, *Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 759-61.
31. Wanstrat, A. and E. Wakeland, *The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes*. Nat Immunol, 2001. **2**(9): p. 802-9.
32. Ortonne, J.P., *Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis*. Br J Dermatol, 1999. **140 Suppl 54**: p. 1-7.
33. Gregersen, P.K., *Genetic analysis of rheumatic diseases*. in Kelly WN, Harris ED Jr, Ruddy S, Sledge CB eds *textbook rheumatology 5th edition*. Vol. 1. 1997, Philadelphia: W.B. Saunders. 209-227.
34. Worthington, J. and A.J. Silman, *Genetic control of autoimmunity, lessons from twin studies*. Clin Exp Immunol, 1995. **101**(3): p. 390-2.
35. Encinas, J.A. and V.K. Kuchroo, *Mapping and identification of autoimmunity genes*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(6): p. 691-7.
36. Becker, K.G., *Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways?* Diabetes, 1999. **48**(7): p. 1353-8.
37. Klein, J. and A. Sato, *The HLA system. Second of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(11): p. 782-6.
38. Taneja, V. and C.S. David, *HLA class II transgenic mice as models of human diseases*. Immunol Rev, 1999. **169**: p. 67-79.

39. Khare, S.D., H.S. Luthra, and C.S. David, *Animal models of human leukocyte antigen B27-linked arthritides*. *Rheum Dis Clin North Am*, 1998. **24**(4): p. 883-94, xi-xii.
40. Kukreja, A. and N.K. Maclaren, *Autoimmunity and diabetes*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. **84**(12): p. 4371-8.
41. Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester, *The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(11): p. 1205-13.
42. McDaniel, D.O., et al., *Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope)*. *Ann Intern Med*, 1995. **123**(3): p. 181-7.
43. Teller, K., et al., *HLA-DRB1 and DQB typing of Hispanic American patients with rheumatoid arthritis: the "shared epitope" hypothesis may not apply*. *J Rheumatol*, 1996. **23**(8): p. 1363-8.
44. Wakeland, E.K., et al., *Genetic dissection of lupus nephritis in murine models of SLE*. *J Clin Immunol*, 1997. **17**(4): p. 272-81.
45. Hill, N.J., et al., *NOD Idd5 locus controls insulinitis and diabetes and overlaps the orthologous CTLA4/IDDM12 and NRAMP1 loci in humans*. *Diabetes*, 2000. **49**(10): p. 1744-7.
46. Theofilopoulos, A.N., *The basis of autoimmunity: Part II. Genetic predisposition*. *Immunol Today*, 1995. **16**(3): p. 150-9.

47. Willer, C.J. and G.C. Ebers, *Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment*. *Curr Opin Neurol*, 2000. **13**(3): p. 241-7.
48. Kalman, B. and F.D. Lublin, *The genetics of multiple sclerosis. A review*. *Biomed Pharmacother*, 1999. **53**(8): p. 358-70.
49. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(13): p. 938-52.
50. Dahlquist, G., *The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective*. *Acta Paediatr Suppl*, 1998. **425**: p. 5-10.
51. aarda, American Autoimmune Related Diseases Association, Inc. [http://www.aarda.org/research\\_update.html](http://www.aarda.org/research_update.html)
52. Odievre, M., et al., *Seroimmunologic classification of chronic hepatitis in 57 children*. *Hepatology*, 1983. **3**(3): p. 407-9.
53. Mackay, I.R. and B.D. Tati, *The history of autoimmunity Hepatitis*, in *Autoimmune Hepatitis*. 1994, Elsevier. p. Chapitre 1.
54. Kelsall, A.R., A. Stewart, and L.J. Witts, *Subacute and chronic hepatitis*. *Lancet II*, 1947: p. 195-198.
55. Waldestrom, J.L., *Blut protein und Nahrungseiweiss*. *Dutsch Z Verdau Stoff Wechselkr*, 1950. **15**: p. 113-116.
56. Mackay, I.R., L.I. Taft, and D.C. Cowling, *lupoid hepatitis*. *Lancet II*, 1956: p. 1323-1326.

57. Manns, M.P. and C.P. Strassburg, *Autoimmune hepatitis: clinical challenges*. Gastroenterology, 2001. **120**(6): p. 1502-17.
58. Mackay, I.R. and P.J. Morris, *Association of autoimmune active chronic hepatitis with HL-A1,8*. Lancet, 1972. **2**(7781): p. 793-5.
59. Strassburg, C.P., P. Obermayer-Straub, and M.P. Manns, *Autoimmunity in liver diseases*. Clin Rev Allergy Immunol, 2000. **18**(2): p. 127-39.
60. Gueguen, M., et al., *Anti-liver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1*. Biochem Biophys Res Commun, 1989. **159**(2): p. 542-7.
61. Manns, M., et al., *Detection of liver-kidney microsomal autoantibodies by radioimmunoassay and their relation to anti-mitochondrial antibodies in inflammatory liver diseases*. Clin Exp Immunol, 1984. **57**(3): p. 600-8.
62. Zanger, U.M., et al., *Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(21): p. 8256-60.
63. Homberg, J.C., et al., *Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1333-9.
64. Rizzetto, M., G. Swana, and D. Doniach, *Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders*. Clin Exp Immunol, 1973. **15**(3): p. 331-44.
65. Nishioka, M., G. Toda, and M. Zeniya, *Autoimmune hepatitis*. 1994, Amsterdam ; New York: Elsevier. xvi, 341.

66. Johnson, P.J. and I.G. McFarlane, *Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group*. *Hepatology*, 1993. **18**(4): p. 998-1005.
67. Alvarez, F., *Autoimmune hepatitis in children*. in Falk Symposium. Vol. 114. 2000, Switzerland: Kluwer academic publishers. 93-98.
68. Marcais, O. and D. Larrey, [*Autoimmune hepatitis*]. *Rev Prat*, 1994. **44**(1): p. 75-9.
69. Czaja, A.J., *Natural history, clinical features, and treatment of autoimmune hepatitis*. *Semin Liver Dis*, 1984. **4**(1): p. 1-12.
70. Manns, M., et al., *Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen*. *Lancet*, 1987. **1**(8528): p. 292-4.
71. Johnson, P.J., I.G. McFarlane, and A.L. Eddleston, *The natural course and heterogeneity of autoimmune-type chronic active hepatitis*. *Semin Liver Dis*, 1991. **11**(3): p. 187-96.
72. Alvarez, F., et al., *International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 1999. **31**(5): p. 929-38.
73. Obermayer-Straub, P., C.P. Strassburg, and M.P. Manns, *Autoimmune hepatitis*. *J Hepatol*, 2000. **32**(1 Suppl): p. 181-97.
74. Bylund, D.J. and J. McHutchison, *Autoimmune liver diseases*. *Clin Lab Med*, 1997. **17**(3): p. 483-97.

75. Mieli-Vergani, G. and D. Vergani, *Immunological liver diseases in children*. Semin Liver Dis, 1998. **18**(3): p. 271-9.
76. Krawitt, E.L., *Can you recognize autoimmune hepatitis?* Postgrad Med, 1998. **104**(2): p. 145-9, 152.
77. Maggiore, G., et al., *Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1993. **17**(4): p. 376-81.
78. Gregorio, G.V., et al., *Autoimmune hepatitis in childhood: a 20-year experience*. Hepatology, 1997. **25**(3): p. 541-7.
79. Duclos-Vallee, J.C., et al., *Hépatites auto-immunes*. Ann Med Interne (Paris), 2001. **152**(6): p. 371-82.
80. Kaplan, M.M., *The spectrum of chronic active liver disease*. Hosp Pract (Off Ed), 1983. **18**(10): p. 67-76.
81. Fitzgerald, J.F., *Chronic hepatitis*. Semin Liver Dis, 1982. **2**(4): p. 282-90.
82. Herzog, D., et al., *Subfulminant hepatic failure in autoimmune hepatitis type 1: an unusual form of presentation*. J Hepatol, 1997. **27**(3): p. 578-82.
83. Maggiore, G., et al., *Autoimmune hepatitis with initial presentation as acute hepatic failure in young children*. J Pediatr, 1990. **116**(2): p. 280-2.
84. Krawitt, E.L., *Autoimmune hepatitis*. N Engl J Med, 1996. **334**(14): p. 897-903.

85. Michel, H. and P. Blanc, [*Cirrhosis secondary to chronic autoimmune hepatitis*]. Rev Prat, 1991. **41**(13): p. 1157-60.
86. McFarlane, I.G., *Lessons about antibodies in autoimmune hepatitis*. Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1475-6.
87. Desmet, V.J., et al., *Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging*. Hepatology, 1994. **19**(6): p. 1513-20.
88. Tordjmann, T., et al., [*Adult multi-nuclear cell hepatitis. A study in 17 patients*]. Gastroenterol Clin Biol, 1998. **22**(3): p. 305-10.
89. Ben-Ari, Z., et al., *Syncytial giant-cell hepatitis due to autoimmune hepatitis type II (LKM1+) presenting as subfulminant hepatitis*. Am J Gastroenterol, 2000. **95**(3): p. 799-801.
90. Czaja, A.J., *Classification of autoimmune hepatitis and the significance of autoantibodies in pathogenesis and diagnosis*. AASLD, liver injury update, 1997: p. 95-105.
91. Czaja, A.J. and P.T. Donaldson, *Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 250-9.
92. Ryder, L.P., E. Andersen, and A. Svejgaard, *An HLA map of Europe*. Hum Hered, 1978. **28**(3): p. 171-200.
93. Mackay, I.R., *Genetic aspects of immunologically mediated liver disease*. Semin Liver Dis, 1984. **4**(1): p. 13-25.

94. Czaja, A.J., *Clinical aspects of autoimmune hepatitis in North America*, Chapitre 2 Edition Elsevier.
95. Donaldson, P.T., et al., *Susceptibility to autoimmune chronic active hepatitis: human leukocyte antigens DR4 and A1-B8-DR3 are independent risk factors*. *Hepatology*, 1991. **13**(4): p. 701-6.
96. Czaja, A.J., et al., *Autoimmune features as determinants of prognosis in steroid-treated chronic active hepatitis of uncertain etiology*. *Gastroenterology*, 1983. **85**(3): p. 713-7.
97. McFarlane, I.G., *Autoimmune liver diseases*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2001(235): p. 53-60.
98. Czaja, A.J., *Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies*. *Dig Dis Sci*, 1995. **40**(2): p. 435-56.
99. Czaja, A., *Diagnosis, prognosis, and treatment of classical autoimmune chronic active hepatitis* In Krawitt EL, Wiesner RH (eds): *autoimmune liver disease*. 1991, New York: Raven Press. 143.
100. Hodges, J.R., G.H. Millward-Sadler, and R. Wright, *Chronic active hepatitis: the spectrum of disease*. *Lancet*, 1982. **1**(8271): p. 550-2.
101. Strettell, M.D., et al., *Allelic basis for HLA-encoded susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(6): p. 2028-35.
102. Czaja, A.J., et al., *Associations between alleles of the major histocompatibility complex and type 1 autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 1997. **25**(2): p. 317-23.

103. Czaja, A.J., et al., *Clinical and prognostic implications of HLA B8 in corticosteroid-treated severe autoimmune chronic active hepatitis*. Gastroenterology, 1990. **98**(6): p. 1587-93.
104. Sanchez-Urdazpal, L., et al., *Prognostic features and role of liver transplantation in severe corticosteroid-treated autoimmune chronic active hepatitis*. Hepatology, 1992. **15**(2): p. 215-21.
105. Czaja, A.J., et al., *Significance of HLA DR4 in type 1 autoimmune hepatitis*. Gastroenterology, 1993. **105**(5): p. 1502-7.
106. Czaja, A.J., *Auto-immune chronic active hepatitis: a specific entity? The negative argument*. J Gastroenterol Hepatol, 1990. **5**(3): p. 343-51.
107. Mistilis, S.P., A.P. Skyring, and C.R. Blackburn, *Natural history of active chronic hepatitis. I. Clinical features, course, diagnostic criteria, morbidity, mortality and survival*. Australas Ann Med, 1968. **17**(3): p. 214-23.
108. Mistilis, S.P. and C.R. Blackburn, *Active chronic hepatitis*. Am J Med, 1970. **48**(4): p. 484-95.
109. Krawitt, E.L., et al., *Immunogenetic studies of autoimmune chronic active hepatitis: HLA, immunoglobulin allotypes and autoantibodies*. Hepatology, 1987. **7**(6): p. 1305-10.
110. Djilali-Saiah, I., et al., *CTLA-4/CD 28 region polymorphisms in children from families with autoimmune hepatitis*. Hum Immunol, 2001. **62**(12): p. 1356-62.

111. Czaja, A.J., M.P. Manns, and H.A. Homburger, *Frequency and significance of antibodies to liver/kidney microsome type 1 in adults with chronic active hepatitis*. *Gastroenterology*, 1992. **103**(4): p. 1290-5.
112. Lohse, A.W., M. Kogel, and K.H. Meyer zum Buschenfelde, *Evidence for spontaneous immunosuppression in autoimmune hepatitis*. *Hepatology*, 1995. **22**(2): p. 381-8.
113. Martini, E., et al., *Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2*. *Hepatology*, 1988. **8**(6): p. 1662-6.
114. Obermayer-Straub, P., et al., *Anti-liver cytosol type 1 autoantibodies correlate with a favorable prognosis in autoimmune type 2*. *Hepatology*, 2000. **32**:164 A: p. (Abstract).
115. McFarlane, I.G., *Autoimmunity and hepatotropic viruses*. *Semin Liver Dis*, 1991. **11**(3): p. 223-33.
116. Treichel, U., K. Meyer zum Buschenfelde, and G. Gerken, *Hepatitis C virus infection and autoimmunity : clinical feature, diagnostic tool and therapeutical aspects*. *Med Mal Infect*, 1996. **25** (special): p. 1089-1096.
117. Vitozzi, S., et al., *Autoantibody detection in type 2 autoimmune hepatitis using a chimera recombinant protein*. *J Immunol Methods*, 2002. **262**(1-2): p. 103-10.
118. Lapierre, P., et al., *Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis*. *Gastroenterology*, 1999. **116**(3): p. 643-9.

119. Czaja, A.J., et al., *Genetic distinctions between types 1 and 2 autoimmune hepatitis*. Am J Gastroenterol, 1997. **92**(12): p. 2197-200.
120. Bittencourt, P.L., et al., *Genetic heterogeneity in susceptibility to autoimmune hepatitis types 1 and 2*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(7): p. 1906-13.
121. Manns, M.P. and M. Kruger, *Immunogenetics of chronic liver diseases*. Gastroenterology, 1994. **106**(6): p. 1676-97.
122. Czaja, A.J., *Diagnosis and therapy of autoimmune liver disease*. Med Clin North Am, 1996. **80**(5): p. 973-94.
123. Czaja, A.J. and H.A. Homburger, *Autoantibodies in liver disease*. Gastroenterology, 2001. **120**(1): p. 239-49.
124. Hajoui, O., et al., *Auto-antibodies to the asialoglycoprotein receptor in sera of children with auto-immune hepatitis*. Eur J Pediatr, 2000. **159**(5): p. 310-3.
125. Ballot, E., J.C. Homberg, and C. Johanet, *Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis*. J Hepatol, 2000. **33**(2): p. 208-15.
126. Ma, Y., et al., *Antibodies to conformational epitopes of soluble liver antigen define a severe form of autoimmune liver disease*. Hepatology, 2002. **35**(3): p. 658-64.
127. Krawitt, E.L. and R.H. Wiesner, *Autoimmune liver diseases*. 1991, New York: Raven Press. xiii, 272.

128. Czaja, A.J., *Variant forms of autoimmune hepatitis*. Curr Gastroenterol Rep, 1999. 1(1): p. 63-70.
129. Chazouilleres, O., et al., *Primary biliary cirrhosis-autoimmune hepatitis overlap syndrome: clinical features and response to therapy*. Hepatology, 1998. 28(2): p. 296-301.
130. van Buuren, H.R., et al., *High prevalence of autoimmune hepatitis among patients with primary sclerosing cholangitis*. J Hepatol, 2000. 33(4): p. 543-8.
131. Kaya, M., P. Angulo, and K.D. Lindor, *Overlap of autoimmune hepatitis and primary sclerosing cholangitis: an evaluation of a modified scoring system*. J Hepatol, 2000. 33(4): p. 537-42.
132. Chazouilleres, O., *Diagnosis of primary sclerosing cholangitis--autoimmune hepatitis overlap syndrome: to score or not to score?* J Hepatol, 2000. 33(4): p. 661-3.
133. Nishioka, M., et al., *Frequency and significance of antibodies to P450IID6 protein in Japanese patients with chronic hepatitis C*. J Hepatol, 1997. 26(5): p. 992-1000.
134. Duclos-Vallee, J.C., et al., *Interferon therapy in LKM-1 positive patients with chronic hepatitis C: follow-up by a quantitative radioligand assay for CYP2D6 antibody detection*. J Hepatol, 1998. 28(6): p. 965-70.
135. Marcellin, P. and J.P. Benhamou, *Autoimmune disorders associated with hepatitis C*. Prog Liver Dis, 1995. 13: p. 247-67.

136. Papo, T., et al., *Autoimmune chronic hepatitis exacerbated by alpha-interferon*. *Ann Intern Med*, 1992. **116**(1): p. 51-3.
137. van den Berg, A.P., *Autoimmune hepatitis: pathogenesis, diagnosis and treatment*. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1998. **225**: p. 66-9.
138. Cook, G.C., R. Mulligan, and S. Sherlock, *Controlled prospective trial of corticosteroid therapy in active chronic hepatitis*. *Q J Med*, 1971. **40**(158): p. 159-85.
139. Summerskill, W.H., et al., *Prednisone for chronic active liver disease: dose titration, standard dose, and combination with azathioprine compared*. *Gut*, 1975. **16**(11): p. 876-83.
140. Soloway, R.D., et al., *Clinical, biochemical, and histological remission of severe chronic active liver disease: a controlled study of treatments and early prognosis*. *Gastroenterology*, 1972. **63**(5): p. 820-33.
141. Valla, D.-C., *Traitement de l'hépatite auto-immune*. 2002, [http://www.bmlweb.org/paris7\\_02\\_14.htm](http://www.bmlweb.org/paris7_02_14.htm).
142. Vetter, D., et al., [*Autoimmune hepatitis. New pathophysiological and clinical aspects*]. *Gastroenterol Clin Biol*, 1994. **18**(5): p. 429-36.
143. Hyams, J.S., M. Ballow, and A.M. Leichtner, *Cyclosporine treatment of autoimmune chronic active hepatitis*. *Gastroenterology*, 1987. **93**(4): p. 890-3.
144. Abuaf, N., et al., *Characterization of the liver cytosol antigen type 1 reacting with autoantibodies in chronic active hepatitis*. *Hepatology*, 1992. **16**(4): p. 892-8.

145. Lenzi, M., et al., *Liver cytosolic I antigen-antibody system in type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection*. Gut, 1995. **36**(5): p. 749-54.
146. Muratori, L., et al., *Detection of anti-liver cytosol antibody type 1 (anti-LC1) by immunodiffusion, counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting: comparison of different techniques*. J Immunol Methods, 1995. **187**(2): p. 259-64.
147. Muratori, L., et al., *Liver/kidney microsomal antibody type 1 and liver cytosol antibody type 1 concentrations in type 2 autoimmune hepatitis*. Gut, 1998. **42**(5): p. 721-6.
148. Beaudet, R. and R.E. Mackenzie, *Formiminotransferase cyclodeaminase from porcine liver. An octomeric enzyme containing bifunctional polypeptides*. Biochim Biophys Acta, 1976. **453**(1): p. 151-61.
149. Bloom, G.S. and T.A. Brashear, *A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules*. J Biol Chem, 1989. **264**(27): p. 16083-92.
150. Gao, Y. and E. Sztul, *A novel interaction of the Golgi complex with the vimentin intermediate filament cytoskeleton*. J Cell Biol, 2001. **152**(5): p. 877-94.
151. Maggiore, G., et al., *Liver disease associated with anti-liver-kidney microsome antibody in children*. J Pediatr, 1986. **108**(3): p. 399-404.
152. Czaja, A.J. and M.P. Manns, *The validity and importance of subtypes in autoimmune hepatitis: a point of view*. Am J Gastroenterol, 1995. **90**(8): p. 1206-11.

153. Guldner, H.H., et al., *Epitope mapping with a recombinant human 68-kDa (UI) ribonucleoprotein antigen reveals heterogeneous autoantibody profiles in human autoimmune sera*. J Immunol, 1988. **141**(2): p. 469-75.
154. Codoner-Franch, P., et al., *A new antigen recognized by anti-liver-kidney-microsome antibody (LKMA)*. Clin Exp Immunol, 1989. **75**(3): p. 354-8.
155. Ballot, E., et al., *Detection on immunoblot of new proteins from the microsomal fraction recognized by anti-liver-kidney microsome antibodies type I*. Clin Immunol Immunopathol, 1996. **80**(3 Pt 1): p. 255-65.
156. Beaufay, H., et al., *Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. 3. Subfractionation of the microsomal fraction by isopycnic and differential centrifugation in density gradients*. J Cell Biol, 1974. **61**(1): p. 213-31.
157. Alvarez, F., et al., *Anti-liver-kidney microsome antibody recognizes a 50,000 molecular weight protein of the endoplasmic reticulum*. J Exp Med, 1985. **161**(5): p. 1231-6.
158. Hennig, D., et al., *A formiminotransferase cyclodeaminase isoform is localized to the Golgi complex and can mediate interaction of trans-Golgi network-derived vesicles with microtubules*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19602-11.
159. Laver, W.G., et al., *Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities*. Cell, 1990. **61**(4): p. 553-6.
160. Schwartz, H.L., et al., *High-resolution autoreactive epitope mapping and structural modeling of the 65 kDa form of human glutamic acid decarboxylase*. J Mol Biol, 1999. **287**(5): p. 983-99.

161. Welin Henriksson, E., et al., *Key residues revealed in a major conformational epitope of the UI-70K protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14487-92.
162. Hassfeld, W., et al., *Autoimmune response to the spliceosome. An immunologic link between rheumatoid arthritis, mixed connective tissue disease, and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(6): p. 777-85.
163. Deshmukh, U.S., et al., *Ro60 peptides induce antibodies to similar epitopes shared among lupus-related autoantigens*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6655-61.
164. Mackay, I.R., et al., *The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis*. Immunol Rev, 2000. **174**: p. 226-37.
165. Muratori, L., et al., *Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1*. Hepatology, 2001. **34**(3): p. 494-501.
166. Duclos-Vallee, J.C., et al., *Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies*. Gastroenterology, 1995. **108**(2): p. 470-6.
167. Ma, Y., et al., *Key residues of a major cytochrome P4502D6 epitope are located on the surface of the molecule*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 277-85.
168. Tan, E.M., *Autoantibodies in pathology and cell biology*. Cell, 1991. **67**(5): p. 841-2.

169. McFarlane, I.G., et al., *Identification of the hepatic asialo-glycoprotein receptor (hepatic lectin) as a component of liver specific membrane lipoprotein (LSP)*. Clin Exp Immunol, 1984. **55**(2): p. 347-54.
170. Ruiz-Arguelles, A., et al., *Penetration of anti-DNA antibodies into immature live cells*. J Autoimmun, 1998. **11**(5): p. 547-56.
171. Ruiz-Arguelles, A. and D. Alarcon-Segovia, *Penetration of autoantibodies into living cells 2000*. Isr Med Assoc J., 2001. **3**: p. 121-126.
172. Ruiz-Arguelles, A. and D. Alarcon-Segovia, *Penetration of autoantibodies into living cells*. In: Conrad K, Humbel RL, Meurer M, Shoenfeld T, Tan EM. Eds. Pathogenic and Diagnostic Relevance of autoantibodies. **Update Clin Immunol**.
173. Omary, M.B., N.O. Ku, and D.M. Toivola, *Keratins: guardians of the liver*. Hepatology, 2002. **35**(2): p. 251-7.
174. Ku, N.O., et al., *The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease*. Am J Physiol, 1999. **277**(6 Pt 1): p. G1108-37.
175. Meyer, O., A.-M. Rouquette, and P. Youinou, *Autoanticorps : marqueurs des maladies auto-immunes*. 1999, Paris: BDM edition. 443, 12.
176. Kreis, T.E., *Role of microtubules in the organisation of the Golgi apparatus*. Cell Motil Cytoskeleton, 1990. **15**(2): p. 67-70.
177. Cole, N.B., et al., *Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(4): p. 631-50.

178. Fucini, R.V., et al., *Activated ADP-ribosylation factor assembles distinct pools of actin on golgi membranes*. J Biol Chem, 2000. **275**(25): p. 18824-9.
179. Bashour, A.M. and G.S. Bloom, *58K, a microtubule-binding Golgi protein, is a formiminotransferase cyclodeaminase*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19612-7.
180. Solans, A., X. Estivill, and S. de la Luna, *Cloning and characterization of human FTCD on 21q22.3, a candidate gene for glutamate formiminotransferase deficiency*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **88**(1-2): p. 43-9.
181. Quinlan, R.A., et al., *Heterotypic tetramer (A2D2) complexes of non-epidermal keratins isolated from cytoskeletons of rat hepatocytes and hepatoma cells*. J Mol Biol, 1984. **178**(2): p. 365-88.
182. Franke, W.W., et al., *Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. III. Primary mesenchymal cells and the first appearance of vimentin filaments*. Differentiation, 1982. **23**(1): p. 43-59.
183. Franke, W.W., et al., *Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates*. Exp Cell Res, 1979. **123**(1): p. 25-46.
184. Gilbert, S., et al., *Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas-mediated apoptosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation*. J Cell Biol, 2001. **154**(4): p. 763-73.
185. Eto, H., et al., *Mapping and regulation of the tumor-associated epitope recognized by monoclonal antibody RS-11*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27075-83.

186. Dustin, P., *Microtubules 2nd Edition*. 1984, Berlin Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
187. Hyams, R., *Microtubules*. 1979, London: Academic Press.
188. Han, S., et al., *Anti-liver cytosolic antigen type 1 (LC1) antibodies in childhood autoimmune liver disease*. *Hepatology*, 1995. **21**(1): p. 58-62.
189. Murota, M., et al., *Anti-cytokeratin antibodies in sera of the patients with autoimmune hepatitis*. *Clin Exp Immunol*, 2001. **125**(2): p. 291-9.