

Université de Montréal

**Rôles distinctifs des inflammations de type II et III dans la
progression de la fibrose hépatique**

par
Thomas Fabre

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de doctorat (Ph.D)
en Microbiologie et Immunologie

Octobre 2017

© Thomas Fabre, 2017

Résumé

Les cellules immunitaires inflammatoires peuvent moduler l'activation des cellules stellaires hépatiques (HSC) et la progression de la fibrose hépatique. Les réponses inflammatoires peuvent être divisées en trois types qui sont caractérisés par des profils de cytokines distincts. L'inflammation de type I (caractérisée par la production d'IFN- γ) possède des propriétés anti-fibrotiques, au contraire l'inflammation de type II (caractérisée par la production d'IL-4 et d'IL-13) contribue à la progression de la fibrose. L'inflammation de type III, caractérisée par la production d'IL-17A et d'IL-22, est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques et elle est contrôlée par les cellules T régulatrices. Le rôle de l'inflammation de type III dans la progression de la fibrose est encore peu caractérisé.

Dans ces études, nous avons évalué à l'aide d'échantillons cliniques de biopsies hépatiques, de stimulation *in vitro* d'HSC et de modèles *in vivo* de fibrose hépatique la contribution de la réponse de type III. Nous avons aussi étudié le rôle des autres réponses inflammatoires dans les mêmes spécimens cliniques. Nous avons reporté que l'inflammation de type II est associée à la progression de la fibrose lors des stéatoses hépatiques non alcooliques (NASH). *In vivo*, nous avons démontré que l'inflammation de type II limite le syndrome métabolique associé à NASH mais contribue à la progression de la fibrose hépatique. Nous avons aussi rapporté que l'inflammation de type III est dérégulée lors de la progression de la fibrose hépatique. En effet, nous avons observé une altération du ratio intrahépatique Th17/Treg ainsi qu'une élévation des niveaux d'IL-17A et d'IL-22 dans les biopsies hépatiques. Nous avons ensuite démontré que l'IL-17A sensibilise les HSCs à l'action du TGF- β en stabilisant l'expression du TGF- β -RII à la surface des HSCs par des mécanismes dépendants de la voie JNK. Nous avons aussi rapporté une nouvelle fonction profibrotique pour l'IL-22 qui augmente la réponse au TGF- β par activation de la voie de signalisation p38/MAPK. *In vivo*, les souris déficientes pour l'IL-22RA1 ont une fibrose réduite par rapport aux souris sauvages après traitement chronique avec du tétrachlorure de carbone ou thioacétamide. De plus, l'inhibition de l'IL-22 par administration d'antagoniste contre « aryl hydrocarbon receptor » (AHR) ou ROR γ t limite la progression de la fibrose hépatique.

En conclusion, nous avons démontré que l'inflammation de type III, caractérisée par la production d'IL-17A et d'IL-22, contribue à la progression de la fibrose hépatique lors des insultes tissulaires chroniques.

Mots-clés : Fibrose, inflammation, immunité, Th17, hépatite chronique.

Abstract

Inflammatory immune cells can modulate activation of hepatic stellate cells (HSC) and progression of liver fibrosis. Inflammation is divided in three types characterized by distinct cytokine profiles. Type I inflammation (characterized by IFN- γ production) has anti-fibrogenic properties in contrast to type II inflammation (characterized by IL-4 and IL-13 production). Type III inflammation characterized by production of IL-17 and IL-22 is implicated in many inflammatory conditions of the gut and can be counteracted by regulatory T cells (Tregs), but its contribution to liver fibrosis is still poorly understood.

In these studies, we evaluated the contribution of type III inflammation in liver fibrosis using clinical liver biopsies, *in vitro* stimulation of primary HSCs and *in vivo* mouse models. We report dysregulated type II responses during non-alcoholic steatohepatitis (NASH). This signature was validated *in vivo*, where we demonstrated that type II inflammation limited metabolic syndrome associated with NASH, but contributed to liver fibrosis progression. We also report dysregulated type III responses in fibrotic lesions with increased Th17/Treg ratio as well as elevated IL-17A and IL-22 production in liver biopsies. We demonstrate that IL-17A sensitizes HSCs to the action of TGF- β through up-regulation of the TGF- β -RII in a JNK-dependent manner. In addition, we also demonstrate a new pro-fibrotic function of IL-22 through enhancement of TGF- β signaling in HSCs in a p38 MAPK dependent manner. *In vivo*, IL-22RA1 knockout mice exhibited reduced fibrosis in response to thioacetamide and carbon tetrachloride. Blocking IL-22 production using aryl hydrocarbon receptor (AHR) or ROR γ t antagonist led to reduced fibrosis.

Altogether, we identified a novel role for type III inflammation mediated by IL-17A and IL-22 in driving liver fibrosis during chronic liver injury.

Keywords : Fibrosis, inflammation, immunity, Th17, chronic liver injury.

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract.....	6
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	11
Liste des figures.....	12
Liste des abréviations.....	13
Remerciements.....	18
I. Introduction.....	20
1. Le foie : anatomie, fonction métabolique et immunologique.....	22
1.a. La macro-anatomie hépatique.....	22
1.b. La microanatomie hépatique.....	25
1.c. Principale fonction métabolique hépatique.....	27
1.d. Les fonctions immunologiques du foie.....	29
2. La fibrose hépatique : réponse aux insultes tissulaires chroniques.....	36
2.a. Réponse de régénération tissulaire aux insultes aiguës.....	36
2.b. La fibrose hépatique : activation persistante des cellules stellaires hépatiques.....	38
2.b.1 Origine des myofibroblastes hépatiques.....	39
2.b.2. Voie de signalisation pro-fibrotique.....	41
2.b.3. Régulation métabolique des cellules stellaires hépatiques.....	43
2.c. Architecture du foie fibrotique.....	47
2.d. Résolution de la fibrose hépatique.....	47
3. Principales causes d'hépatites chroniques fibrogéniques.....	49
3.a. Les hépatites virales.....	49
3.b. Les infections parasitaires.....	50
3.c. Les hépatites auto-immunes.....	51
3.d. Les hépatites liées à l'environnement.....	52
4. Évaluation clinique de la fibrose hépatique.....	53
4.a. Technique invasive : la biopsie hépatique.....	53

4.b.	Techniques non-invasives : biomarqueurs et échographie	55
5.	Complication liées à la fibrose hépatique et traitements	58
5.a.	Complications hépatiques liées à la fibrose	58
5.b.	Thérapies anti-fibrotiques	59
6.	Modèles expérimentaux de la fibrose hépatique.....	61
6.a	Modèles <i>ex vivo</i>	61
6.b.	Les modèles <i>in vitro</i>	62
6.c.	Les modèles <i>in vivo</i>	63
7.	Modulation immunitaire de la fibrose hépatique	67
7.a.	Les trois types d'immunité et d'inflammation.....	68
7.b.	L'immunité de type I dans la progression de la fibrose.....	73
7.c.	L'immunité de type II dans la progression de la fibrose	76
7.d.	L'immunité de type III dans la progression de la fibrose	79
7.e.	Régulation de l'inflammation par les T régulateurs et fonction dans la progression de la fibrose hépatique	83
II.	Hypothèse et objectif	88
	Hypothèse	88
	Objectifs.....	88
III.	Chapitre 3 : Manuscrit 1	90
	TYPE III INFLAMMATION DRIVES LIVER FIBROSIS BY ENHANCING TGF-BETA SIGNALING THROUGH ACTIVATION OF MAPKs	90
	Title: TYPE III INFLAMMATION DRIVES LIVER FIBROSIS BY ENHANCING TGF-BETA SIGNALING THROUGH ACTIVATION OF MAPKs	92
IV.	Chapitre 4 : Manuscript 2	149
	L-17A ENHANCES THE EXPRESSION OF PROFIBROTIC GENES THROUGH UPREGULATION OF THE TGF-B RECEPTOR ON HEPATIC STELLATE CELLS IN A JNK-DEPENDENT MANNER.....	149
	Chapitre 5 : Manuscrit 3	187
	TYPE 2 IMMUNITY IS PROTECTIVE IN METABOLIC DISEASE BUT EXACERBATES NAFLD COLLABORATIVELY WITH TGF-BETA.....	187

V. Discussion et conclusion.....	245
1. Conclusions générales.....	245
2. Établissement d'une banque de biopsies hépatiques	246
3. Signature inflammatoire des lymphocytes intrahépatiques associée à la progression de la fibrose hépatique.....	248
3.a. L'inflammation de type I n'est pas associée à la progression de la fibrose hépatique	249
3.b. L'inflammation de type II est associée à la progression de la fibrose hépatique lors de la stéatose hépatique	249
3.c. L'inflammation de type III est associée à la progression de la fibrose hépatique indépendamment de l'étiologie sous-jacente.....	250
4. Rôle opposé de l'inflammation de type I et de type II dans la progression de la fibrose lors de stéatose hépatique.....	251
5. L'inflammation de type III est une signature commune de la progression de la fibrose chez l'homme et se caractérise par une dérégulation du ratio intrahépatique Th17/Treg.....	255
6. Rôle des lymphocytes T régulateurs et de la plasticité Th17/Treg dans la progression de la fibrose hépatique.....	257
7. Rôle de l'IL-17A dans la progression de la fibrose hépatique.....	260
7.a. L'interleukine 17 n'induit pas l'activation directe des cellules stellaires hépatiques	260
7.b. L'interleukine 17 contrôle la production des cytokines profibrotiques dans le foie	261
7.c. L'interleukine 17 sensibilise les cellules stellaires à l'action du TGF- β via l'expression du TGF- β -RII dépendamment de la voie JNK.....	261
8. Rôle de l'IL-22 dans la progression de la fibrose hépatique	264
8.a. L'IL-22 sensibilise les cellules stellaires hépatiques à l'action du TGF- β via la voie p38/MAPK.....	264
8.b. L'IL-22 contribue à la progression de la fibrose in vivo	265
8.c. Rôle opposé de l'IL-22 dans les insultes tissulaires aiguës et chroniques.....	267
8.d. Régulation de la signalisation de l'IL-22 par l'IL-22BP	268
9. Modulation de l'inflammation de type III comme traitement de la fibrose hépatique ...	270
10. Rôle de l'inflammation de type III dans le carcinome hépatocellulaire	273

11.	Conclusions, limitations et perspectives	274
11.a.	Conclusions générales.....	274
11.b.	Limitations et perspectives	275
11.c	Importance de l'étude	278
	Bibliographie.....	i
	Annexe I : Contributions du candidat (publications annexes).....	i
	Annexe II : Publications supplémentaires.....	ii
	Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C	ii
	Immunology of the Liver	xxv
	Annexe III : Curriculum Vitae.....	x

Liste des tableaux

Tableau 1.	Liste des essais cliniques et traitements de la fibrose hépatique	60
------------	---	----

Liste des figures

Figure 1. La fibrose est une majeure de morbidité et de mortalité dans le monde	21
Figure 2. Macro-anatomie hépatique	23
Figure 3. Microanatomie hépatique	24
Figure 4. La microanatomie hépatique sinusoidale	26
Figure 5. Composition immunitaire hépatique	30
Figure 6. Régulation de la réponse T par les cellules hépatiques	34
Figure 7. Les trois phases de la régénération tissulaire	37
Figure 8. Origines des myofibroblastes hépatiques	40
Figure 9. Mécanismes d'activation des cellules stellaires hépatiques	46
Figure 10. Architecture du foie fibrotique	48
Figure 11. Dépôt de collagène caractéristique de la fibrose dans différentes étiologies	54
Figure 12. Techniques invasives et non-invasives pour l'évaluation clinique de la fibrose.....	57
Figure 13. Les trois types d'immunité et d'inflammation	71
Figure 14. Rôle de l'immunité et de l'inflammation de type I, II et III dans la progression de la fibrose hépatique.....	72
Figure 15. L'immunité de type I : une réponse anti-fibrotique et nécrotique.....	75
Figure 16. L'immunité de type II : une réponse de régénération tissulaire	78
Figure 17. L'immunité de type III : une réponse inflammatoire et profibrotique	80
Figure 18. Modulation de l'inflammation par les T-CD4 régulateurs	85
Figure 18. Rôle opposé de l'inflammation de type I et type II dans les tissus adipeux et le foie.....	254
Figure 19. Modèle d'interactions entre les cellules stellaires hépatiques, les Tregs et les Th17 dans la progression de la fibrose hépatique.....	259
Figure 20. Les cytokines de type III, IL-17A et IL-22, augmentent la réponse au TGF- β par des mécanismes dépendant des MAPKs	263
Figure 21. Modèle d'action de l'IL-22 dans les insultes tissulaires aiguës et chroniques.....	269
Figure 22. Les réponses inflammatoires fortement polarisées contribuent à la fibrose hépatique	272

Liste des abréviations

Les abréviations anglaises ont été utilisées dans cette thèse pour faciliter la compréhension des articles à l'exception des abréviations présentes uniquement dans l'introduction.

ADH : Alcohol dehydrogenases

AHR : Aryl Hydrocarbon Receptor

AKT : Protein kinase B

AKT : Protein kinase B

ALT : alanine amino-transférase

AST : aspartate amino-transférase

BAMBI : BMP and activin membrane bound inhibitor

BCL-XL : B-cell lymphoma-extra large

BM-MF : bone-marrow derived myofibroblast

CDD : choline deficient diet

CTGF: connective tissue growth factor

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4

DC : dendritic cell, cellule dendritique

ECM : extracellular matrix, matrice extracellulaire

EMT : epithelial to mesenchymal transformation, transformation épithéliale mésenchymateuse

ERK : Extracellular signal-regulated kinases

FATP : fatty acid transport protein

FNA : fine-needle aspirate

FXR : farnesoid X receptor

GARP : glutamic acid/alanine-rich protein

GATA : GATA binding factor

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GFP : green fluorescent protein

GSK3 : glycogène synthase kinase 3

HAI : auto-immune hepatitis, hépatite auto-immune

HCC : hepatocellular carcinoma, carcinome hépatocellulaire
HFD : high fat diet, diète riche en graisse
HSC : hepatic stellate cell, cellule stellaire hépatique
ICAM : intracellular adhesion molecule
IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN: interferon
IL- : interleukine
ILC : innate lymphoid cell
iMATES : intrahepatic myeloïd cell aggregate for T-cell population expansion
IRM : image à résonance magnétique
JNK : c-Jun N-terminal kinases
KC : Kupffer cell, cellules de Kupffer
LAG3 : Lymphocyte-activation gene 3
LAP : latency associated peptide
LAP : Latent associated protein
LPS : liposaccharide
LRAT : Lecithin retinol acyltransferase
LSEC : Liver sinusoidal endothelial cell, cellule sinusoidale endothéliale du foie
MAIT : Mucosal associated invariant T cell
MAIT : Mucosal associated invariant T cell
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MCDD : methionine-choline deficient diet
MEF2 : myocyte enhancer factor-2
MF : myofibroblast
MHC : major histocompatibility complex, complexe majeur d'histocompatibilité
MMP : metalloproteinases, métalloprotéases matricielles
NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease
NASH : non-alcoholic steatohepatitis, stéatose hépatique non-alcoolique
NEFA: acides gras non estérifiés
NF- κ B : nuclear factor-kappa B
NK : Natural-killer

NKT : Natural killer T
NOX : NAPDH oxydase
NPC : non-parenchymal cell, cellules non-parenchymateuse
PD : program-cell death
PDGF : platelet derived growth factor
PDGFR : platelet derived growth factor receptor
PECK-C : phosphénolpyruvate carboxylase
PGC : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
PTC: Patched homolog
ROS : reactive oxygen species
ROS : reactive oxygen species, réactifs oxygénés libres
SERBP : Sterol regulatory element-binding proteins
SMA : smooth muscle actin
SMAD : Mothers against decapentaplegic homolog 3
SMO : smoothened homolog
SMURF : SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase
STAT : signal transducer and activator of transcription
T-CD4 : Lymphocytes de type CD4
T-CD8 : Lymphocytes de type CD8
TAA : thioacetamide
TAG : triacylglycérides
TCR : T-cell receptor, récepteur des cellules T
TGF : Transforming growth factor
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinases, inhibiteur produit par le tissu des métalloprotéases matricielles
TLR : toll like receptor
TLR : toll-like receptor
TLSP : Thymic stromal lymphopoietin
TNF : Tumor necrosis factor
TNF : Tumor necrosis factor

VCAM : vascular adhesion molecule

VEGF : vascular endothelial growth factor

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VLDL : Very Low Density Lipoprotein, lipoprotéine de très basse densité

YAP : yes-associated

À la mémoire de Marie-Jeanne, René, Fabien, Lili et Dédé.

Remerciements

Ces lignes marquent la fin de la plus belle expérience de ma vie qui m'a donné l'opportunité d'apprendre, de chercher, de penser et d'évoluer. Ce voyage a été possible par le soutien incroyable de ma famille, mes amis, mes collègues, mes mentors et ma directrice de recherche. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour votre aide et votre soutien au cours de toutes ces années de ma vie. Vous m'avez aidé à grandir et pour cela je vous remercie.

Je voudrais commencer par remercier Dre. Naglaa Shoukry pour sa patience, son dévouement, sa gentillesse, sa générosité, sa confiance et la qualité de son enseignement. Je suis fier du chemin que nous avons parcouru sur ce projet, du premier recrutement de patients à la dernière expérience. J'espère sincèrement que nous continuerons à travailler ensemble, car ce fut un honneur d'apprendre à tes côtés. Naglaa m'a aussi permis d'interagir avec des scientifiques et mentors incroyables au cours de ces dernières années. J'aimerais particulièrement remercier Dr. Friedman et Dr. Wynn pour leur soutien, leur gentillesse et leur enthousiasme. Je souhaite remercier tous les membres de mon laboratoire qui font que la « team Shoukry » est incroyable. Je souhaite particulièrement remercier pour leur gentillesse, leur bonne humeur et leur patience : Nathalie, Sarah, Julie, JF, Sandy, Mohamed, Hassen, Maude, Marion et Manuel. C'est un plaisir de travailler avec chacun d'entre vous. Je voudrais remercier mes autres mentors Dr. Bilodeau, Dr. Soucy, Dr. Willems et Dr. Pomier-Layrargues sans qui cette thèse n'aurait été possible. Je tiens aussi à remercier les membres du CANHEPC, les IRSCs et les organismes qui m'ont soutenu au cours de ces années. Enfin, les participants à notre étude sans qui rien n'aurait été possible

Cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien incondtionnel de ma famille. Un grand merci à ma mère et mon père, vous êtes les meilleurs, je sais que vous êtes fiers de moi et cette thèse est un moyen de vous rendre tout ce que vous m'avez donné. Je vous aime. Un énorme merci à Serge, Martine, Marie-laure, Manu, Florent, mémé Yvonne, papi, mimo, Lucie, Mathilde, Anne, Corinne et toute ma famille pour votre soutien. Merci à Amélie, mon petit chat, pour le bonheur et le soutien que tu m'apportes au quotidien. Un grand merci à mes amis pour leur soutien : Adrien, Julien, Yoann, Lili, Amélie, Aurélien, Léo, Kessen, Marie-Claude, Loïc, Patricio et Charlotte. Un grand merci à Anne Rauch pour avoir eu la gentillesse de participer à la relecture de cette thèse.

Une affectueuse pensée à celle et ceux qui nous ont quittés trop tôt. Mon grand-père René, mon incroyable et délicieuse arrière-grand-mère Marie-Jeanne dont la sagesse guidera à tout jamais ma vie. Je sais que vous êtes fier de moi. Mais aussi tata Dédée, tonton Lili et Fabien. Cette thèse est pour vous.

Je vous aime,

Thomas

I. Introduction

La fibrose est une cause majeure de mortalité et morbidité dans le monde ^{1,2} (Figure 1). Dans le foie, elle se produit à la suite de dommages hépatiques chroniques qui peuvent être causés par des virus, des parasites, des toxines, des conditions auto-immunes et par une dérégulation métabolique ¹. La fibrose du foie se caractérise par l'activation et la prolifération des cellules stellaires hépatiques (HSC) menant à l'accumulation pathogénique de collagène de type I, et la perte progressive de la fonction hépatique. Depuis plus de quinze ans, de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires contribuant à l'activation des HSCs ont été explorés et caractérisés. L'accumulation pathogénique de collagène caractéristique de la fibrose favorise le développement du carcinome hépatocellulaire, le deuxième cancer le plus meurtrier dans le monde ³. Malgré cela, les options thérapeutiques sont extrêmement limitées. La progression de la fibrose dépend d'une interaction complexe entre les hépatocytes, les HSCs et le système immunitaire. La contribution du système immunitaire dans ce processus biologique est encore relativement peu étudiée. Cependant, l'inflammation induite par notre système immunitaire en réponse à une insulte tissulaire chronique contribue fortement à la pathogenèse ⁴. Le système immunitaire peut produire trois types de réponses inflammatoires qui sont caractérisées par l'activation de cellules et production de cytokines spécifiques. L'immunité de type I contribue fortement à l'inflammation tissulaire, mais limite la progression de la fibrose ⁵. À l'inverse, l'immunité de type II qui contribue à la réparation tissulaire lors des blessures aiguës favorise la progression de la fibrose lors des blessures chroniques ⁶. La réponse de type III est importante pour l'homéostasie des muqueuses, sa dérégulation est associée à la progression de nombreuses maladies inflammatoires humaines ^{7,8,9,10}. Finalement, la fonction de l'immunité de type III dans la progression de la fibrose hépatique reste encore peu explorée. Lors de cette introduction, nous nous intéresserons d'abord à l'anatomie du foie, ses fonctions métaboliques et immunologiques, aux causes d'hépatites chroniques menant à la fibrose, au diagnostic clinique, aux modèles d'études de cette pathogenèse et enfin à la régulation immunitaire de la fibrose.

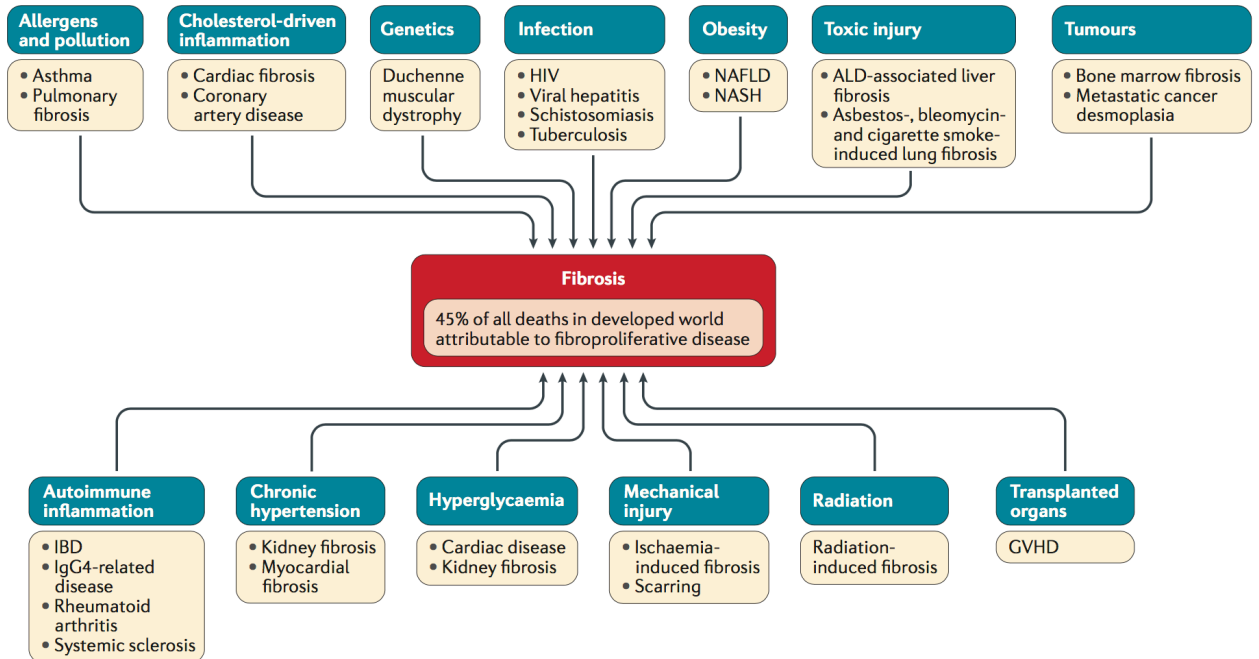


Figure 1. La fibrose est une majeure de morbidité et de mortalité dans le monde

La vaste majorité des maladies inflammatoires chroniques entraîne l'apparition d'une réponse fibrogénisante qui est attribuée à 45% des causes de décès dans les pays développés. Les cadres bleus indiquent les causes et mécanismes tandis que les cadres jaunes indiquent les maladies qui y sont associées. Figure provenant de Gieseck *et al.* ².

1. Le foie : anatomie, fonction métabolique et immunologique

Le foie est l'organe vital le plus large du corps humain et contribue à plus de 500 fonctions métaboliques comme la glycémie, le métabolisme des lipides et la détoxification du sang. Il est situé à l'interface avec l'intestin l'exposant ainsi aux toxines et aux antigènes provenant de l'alimentation qui induisent des réponses inflammatoires qui doivent être contrôlées ou tolérées pour maintenir un état d'homéostasie. Cependant, la fonction immunologique primaire du foie est de limiter la propagation des pathogènes au niveau systémique par l'induction rapide d'une réponse immunitaire innée et adaptative. La balance entre l'activation et la tolérance constitue l'essence même de la fonction immunitaire hépatique.

1.a. La macro-anatomie hépatique

Le foie occupe la vaste majorité du cadran droit de la cavité abdominale et il représente environ 2% de la masse totale d'un individu. Il est partiellement protégé par la cage thoracique et il est séparé du sac pleural et des poumons par le diaphragme. Le tendon central du diaphragme sépare le foie du péricarde et du cœur. La partie inférieure du foie est protégée par du tissu connectif nommé la capsule de Glisson. Le foie est irrigué par un système vasculaire comprenant la veine porte, la veine centrale et l'artère hépatique. Chaque minute, environ 25% du volume sanguin est distribué dans le foie par la veine porte (2/3) et l'artère hépatique (1/3). La structure anatomique hépatique est simple, en forme de triangle, et peut être séparée en 8 lobes (caudal gauche médio-supérieur, médio-inférieur, latéro-supérieur, latéro-inférieur, droit médio-inférieur, médio-supérieur, latéro-inférieur et latéro-supérieur). Chaque lobe est irrigué par son propre pédicule vasculaire (artériole, veine porte et vaisseau lymphatique) et il est indépendant des autres lobes (Figure 2). Cette indépendance vasculaire des lobes peut être visualisée par imagerie par résonance magnétique (IRM) mais aussi par le fait qu'une hépatectomie partielle n'abolit pas le retour à une hémostasie et ce malgré l'absence de tissu connectif entre les différents segments hépatiques.

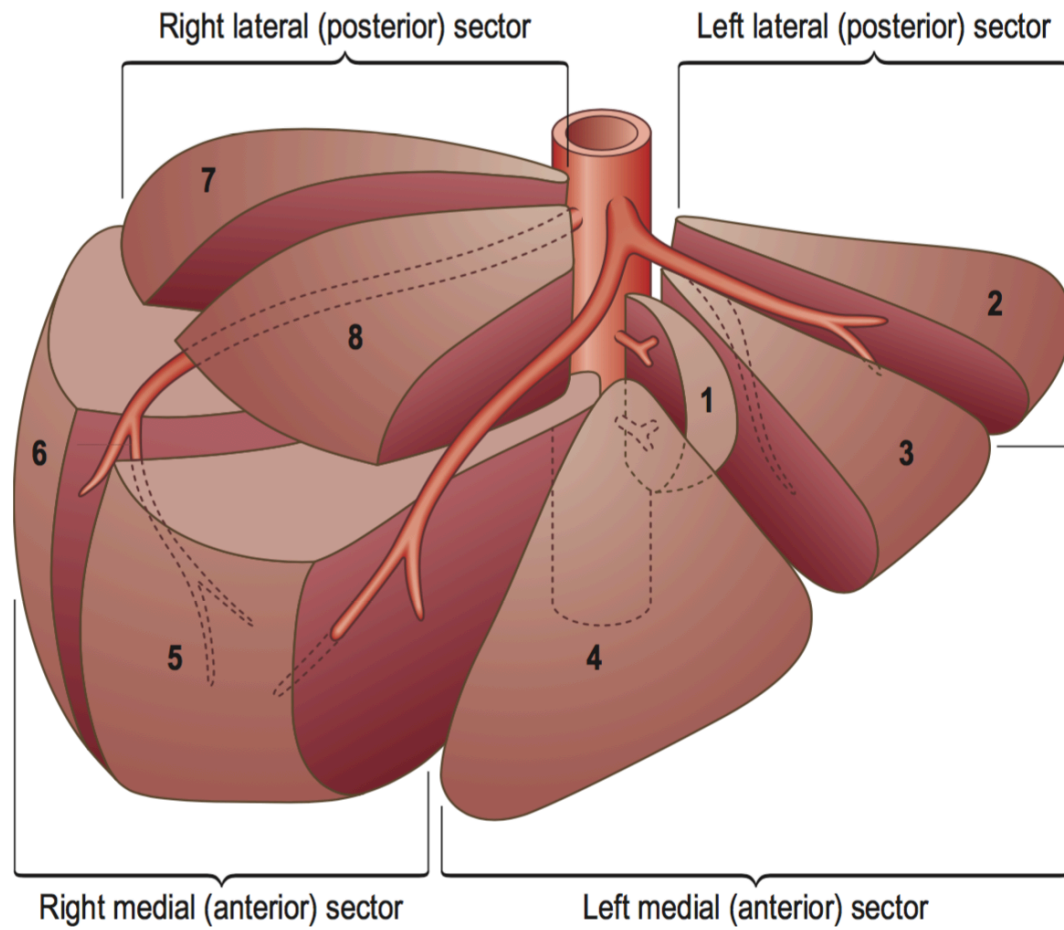


Figure 2. Macro-anatomie hépatique

Le foie est divisé en quatre segments, le latéral droit et gauche, le médial droit et gauche. Il est composé de 8 lobes indépendants (caudal gauche médio-supérieur, médio-inférieur, latéro-supérieur, latéro-inférieur, droit médio-inférieur, médio-supérieur, latéro-inférieur et latéro-supérieur) selon le système de Couinaud. (Mac Sween liver pathology)

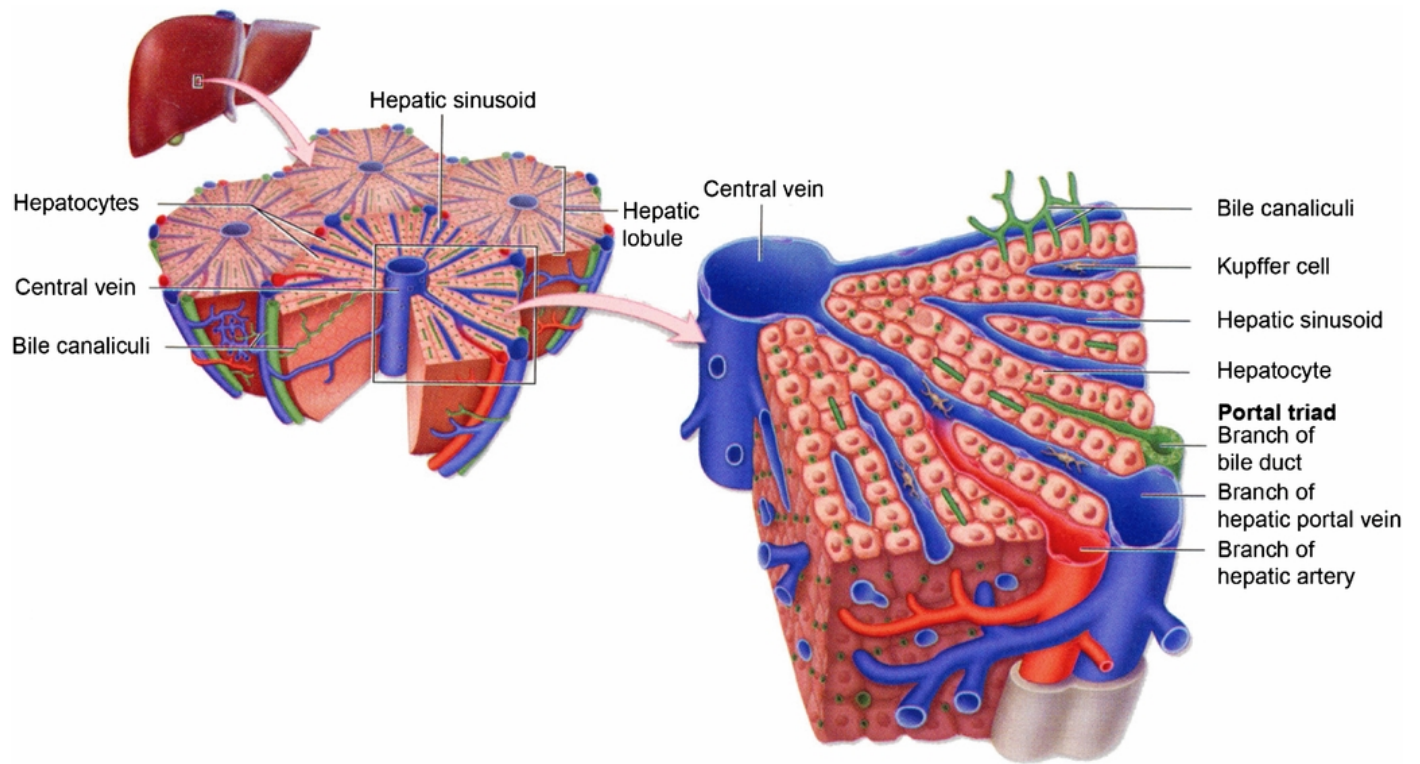


Figure 3. Microanatomie hépatique

Le foie possède une microanatomie hexagonale composée d'une veine centrale au centre entourée de six triades portales formant ainsi un lobule. Les triades sont composées d'un canal biliaire, d'une artère hépatique et d'une veine portale. Le sang s'écoule des triades vers la veine centrale en passant par l'espace sinusoïde hépatique. Figure issue de Stenvall et al. ¹¹.

1.b. La microanatomie hépatique

La microanatomie hépatique est unique et elle permet par son organisation complexe de contribuer aux différentes fonctions métaboliques du foie. On considère que le foie a une microanatomie en forme hexagonale : au centre une veine centrale entourée de six triades hépatiques comprenant une artère hépatique, une veine porte et un canal biliaire (Figure 3)¹¹. Le sang diffuse ainsi de la veine porte vers la veine centrale par le réseau sinusoidal formé par les cellules sinusoidales du foie (LSECs). Les LSECs forment une barrière physique séparant les hépatocytes du sang. Elles contribuent à la reconnaissance, à l'absorption et la présentation des antigènes^{12, 13, 14, 15}. L'espace sinusoidal hépatique est « fenêtré », les LSECs possèdent des « fenestrations » d'environ 100 nm permettant le passage des nutriments et des petites molécules vers les hépatocytes dans l'espace de Disse^{14, 15} (Figure 4). Cet espace réduit la vitesse d'écoulement du plasma, qui entraîne une meilleure capture des nutriments et des toxines par les hépatocytes (les cellules parenchymateuses du foie) à l'aide de microvillosités situées à leur surface. Les microvillosités des hépatocytes contribuent à augmenter la surface d'absorption dans le foie d'environ 6 fois, ce qui reste faible en comparaison à l'épithélium intestinal. Les hépatocytes, qui constituent 80% de la masse cellulaire hépatique (Figure 4), sont des cellules polarisées avec un flux allant de l'espace sinusoidal vers l'espace caniculaire qui interagit avec les canaux biliaires. Cette polarisation cellulaire est essentielle pour assurer les fonctions métaboliques ainsi que la sécrétion de la bile. Les HSCs, qui constituent 1% de la masse cellulaire hépatique, reposent dans l'espace de Disse (Figure 4). Dans des conditions normales, elles sont quiescentes et elles contribuent principalement au métabolisme de la vitamine A en stockant le rétinol métabolisé par les hépatocytes^{16, 17, 18, 19}. Les HSCs contribuent aussi activement à la modulation des réponses immunitaires innées et adaptatives^{20, 21}. Finalement, l'espace sinusoidal contient des sentinelles du système immunitaire comme les macrophages résidents hépatiques ou cellules de Kupffer (KC), qui constituent 30% de la masse cellulaire hépatique, et les neutrophiles. Les KCs sont immobiles, contribuent à l'élimination des endotoxines et à la capture des pathogènes^{22, 23, 24}. Les neutrophiles sont quant à eux en constante circulation à la recherche de pathogènes ou de débris cellulaires à éliminer^{25, 26}.

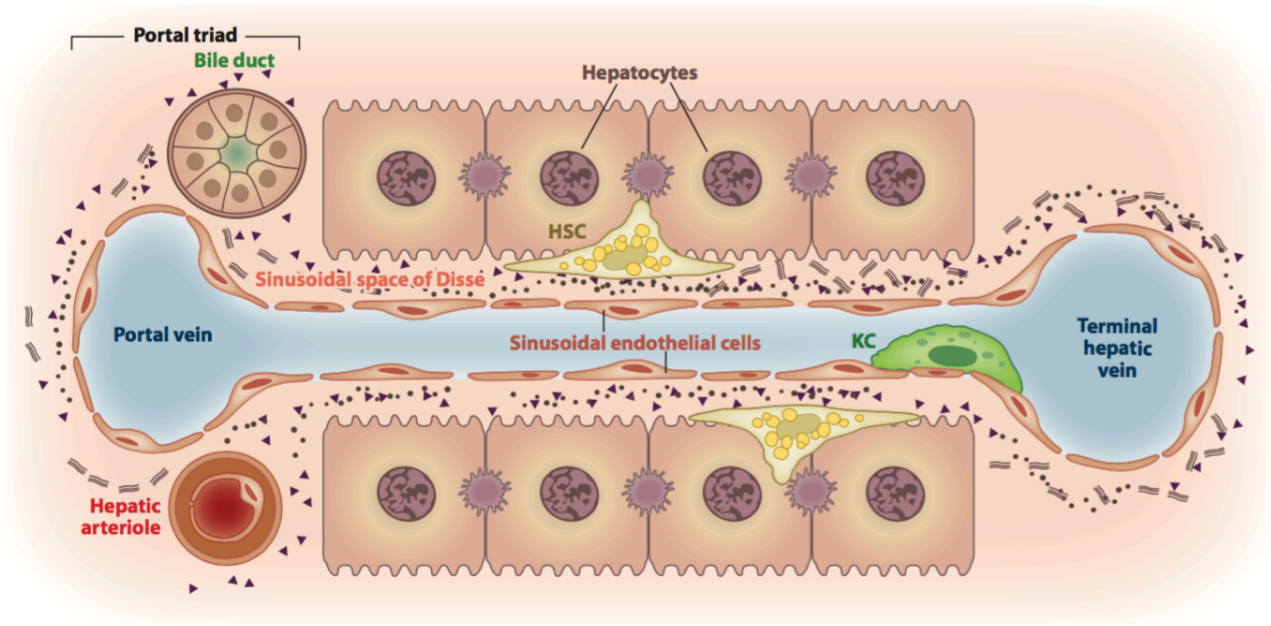


Figure 4. La microanatomie hépatique sinusoidale

Dans le foie normal, les hépatocytes sont organisés en une unique couche cellulaire polarisée avec des microvillosités à leur surface. Les cellules endothéliales sont fenêtrées permettant le passage des nutriments et petites molécules dans l'espace péri-cellulaire situé entre les cellules endothéliales et les hépatocytes : l'espace de Disse. Les cellules stellaires hépatiques reposent dans l'espace de Disse et sont quiescentes. Les macrophages ou cellules de Kupffer sont immobiles et interagissent avec les cellules endothéliales. Figure issue de Friedman et al. ¹.

1.c. Principale fonction métabolique hépatique

Le foie est un organe central dans le métabolisme agissant comme un nœud qui connecte les voies métaboliques entre différents organes comme les muscles et le tissu adipeux. Il contribue ainsi à plus de 500 fonctions métaboliques. Les nutriments digérés et absorbés au niveau de l'intestin entrent dans la circulation sanguine pour être délivrés dans le foie par la veine porte. Ces nutriments, le glucose, les acides gras et acides aminés doivent être métabolisés, stockés et/ou transportés dans d'autres tissus. Le foie joue aussi un rôle dans la digestion et dans la production de la bile qui contribuent au métabolisme des sucres et des lipides.

1.c.1 Le métabolisme des glucides

Après un repas, les hépatocytes absorbent le glucose libre à l'aide du transporteur GLUT2²⁷. Le glucose est ensuite métabolisé et stocké sous forme de glycogène par la glycogène synthase²⁸. L'insuline sécrétée par les cellules β pancréatiques active la voie « Protéine kinase B » (AKT) permettant d'augmenter l'activité de la glycogène synthase via l'inhibition de la glycogène synthase kinase 3 (GSK3)²⁹.

Lors du jeûne, le foie doit libérer du glucose pour l'organisme en dégradant le glycogène lors de la glycogénolyse. Lors des longues périodes de jeûne, le foie produit du glucose à partir du lactate, du pyruvate, du glycérol ou des acides aminés si les stocks de glycogène sont épuisés. Ces substrats sont produits par des processus métaboliques complexes dans le foie puis délivrés dans la circulation²⁷. L'enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PECK-C) est essentielle dans ce procédé³⁰. Les altérations de la glycogénèse et de la glycogénolyse entraînent des troubles métaboliques menant à la dérégulation du métabolisme glucidique et lipidique menant à la stéatose hépatique³¹. Par exemple, la déplétion hépatocytaire de PECK-C entraîne une glycogénèse réduite menant à une accumulation lipidique anormale entraînant de la lipotoxicité.

1.c.2 Le métabolisme lipidique

Le métabolisme lipidique du foie est lié au métabolisme des sucres. Lorsque le glucose est abondant, le foie utilise les acides gras libres comme source d'énergie. Les acides gras peuvent être absorbés après la digestion par le tractus intestinal, par les hépatocytes ou bien être dérivés du glucose²⁷. Les acides gras sont ensuite estérifiés avec du glycérol-3-phosphate pour générer des triglycérides (TAG) ou du cholestérol. Ces produits sont stockés sous forme de gouttelettes

lipidiques dans les hépatocytes ou exportés dans la circulation sous forme de lipoprotéine à faible densité (VLDL)²⁷. Les acides gras sont aussi des composants essentiels des phospholipides, des particules biliaires et des substrats énergétiques lors du jeûne.

Après un repas, les acides gras sont absorbés et métabolisés en acides gras non estérifiés (NEFA) par les entérocytes du petit intestin. Les NEFAs sont absorbés par les hépatocytes principalement par le récepteur CD36, et des transporteurs des acides gras libres comme FATP-2, 4 et 5³². Une déficience dans ces transporteurs réduit l'accumulation de lipides dans le foie dans des modèles de diètes riches en graisse, démontrant ainsi leur fonction essentielle dans le transport des acides gras dans les hépatocytes³³.

La lipogenèse hépatique est liée au métabolisme du glucose, l'insuline contrôle la lipogenèse par l'activation de la voie mORC1 via la voie AKT qui module les facteurs de transcriptions essentiels à la lipogenèse comme SERBP-1³⁴.

Lors du jeûne, la bêta oxydation de ces acides gras permet la génération d'acétyl-CoA qui peut servir de source d'énergie²⁷. La bêta oxydation est principalement contrôlée par « Peroxisome proliferator-activated receptor alpha » (PPAR- α) qui l'induit dans les mitochondries et les peroxysomes³⁵. Le principal ligand de PPAR- α est « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha » (PGC-1 α) qui est nécessaire pour son activité. *In vivo*, la déplétion de PGC-1 α dans les hépatocytes entraîne la stéatose hépatique³⁶.

En conclusion, le métabolisme des lipides dans le foie est essentiel pour maintenir l'homéostasie dans le corps humain puisque le foie est central dans ce processus et les déficiences ou altérations de cette voie métabolique peuvent entraîner des problèmes au niveau des tissus adipeux, intestinaux et cérébraux.

1.c.3. Le métabolisme de la bile

Le foie produit environ 0.2 à 0.6 grammes par jour de bile qui est stockée dans la vésicule biliaire en attendant d'être sécrétée dans l'intestin. La bile est essentielle pour la digestion et régule le métabolisme des sucres et des lipides³⁷. La bile est produite par la conversion du cholestérol par des étapes d'hydroxylation, de saturation et de clivage oxydatif. La production de la bile nécessite 17 enzymes réparties dans le cytosol, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le peroxysome³⁸. La synthèse de nouveau cholestérol suite à un repas, induit l'activation de CYP7a1, une enzyme essentielle à la conversion du cholestérol en acide biliaire qui entraîne une diminution

des niveaux de cholestérol entraînant l'activation du métabolisme lipidique dans les hépatocytes³⁹. De plus, les acides biliaires activent la voie AKT de manière similaire à l'insuline mimant ainsi son effet à savoir l'induction de la glycogénèse^{40,41}.

En plus de ces propriétés métaboliques, la bile possède des propriétés pro- et anti-inflammatoires. En effet, les acides biliaires hydrophobiques ont des propriétés pro-inflammatoires qui entraînent la production de « tumor necrosis factor α » (TNF α) et d'interleukine (IL-) 1 β . Les acides biliaires hydrophiles activent la voie « Farnesoid X receptor » (FXR) qui réduit l'activation de la voie pro-inflammatoire « nuclear factor kappa B » (NF- κ B)^{40, 42} importante dans la progression de la fibrose.

En conclusion, la bile contribue à de nombreuses fonctions métaboliques et immunologiques dans le corps humain. L'altération du métabolisme de la bile par des mutations génétiques affectant les transporteurs de la bile, les enzymes responsables de la production ou des pathologies induisant une perte de l'architecture hépatique peuvent causer des pathologies sévères comme les cholestases et même le cholangiocarcinome³⁷.

1.d. Les fonctions immunologiques du foie

Le foie est considéré comme un organe lymphoïde secondaire, car il contient de nombreuses populations de cellules présentatrices d'antigènes (APCs) capables de procéder et de présenter des antigènes pour induire des réponses immunitaires robustes^{43, 44}. Il est constamment exposé à des antigènes étrangers mais l'architecture hépatique, grâce à ces propriétés anti-inflammatoires et immunomodulatrices, induit la tolérance. Cependant, lors des infections cet état tolérogène doit être brisé pour permettre l'induction d'une réponse immunitaire. Le foie contribue aussi à l'élimination des cellules immunitaires après la résolution d'une infection^{45, 46}.

1.d.1 Composition immunitaire du foie

Le foie a une composition immunitaire unique comprenant de nombreuses APCs et lymphocytes T non conventionnels. La majorité de l'organe hépatique est composé à 80% de cellules parenchymateuses. Les 20% restants sont composés de cellules non parenchymateuses (NPC) endothéliales, biliaires, stellaires et immunitaires (Figure 5)^{44, 47}.

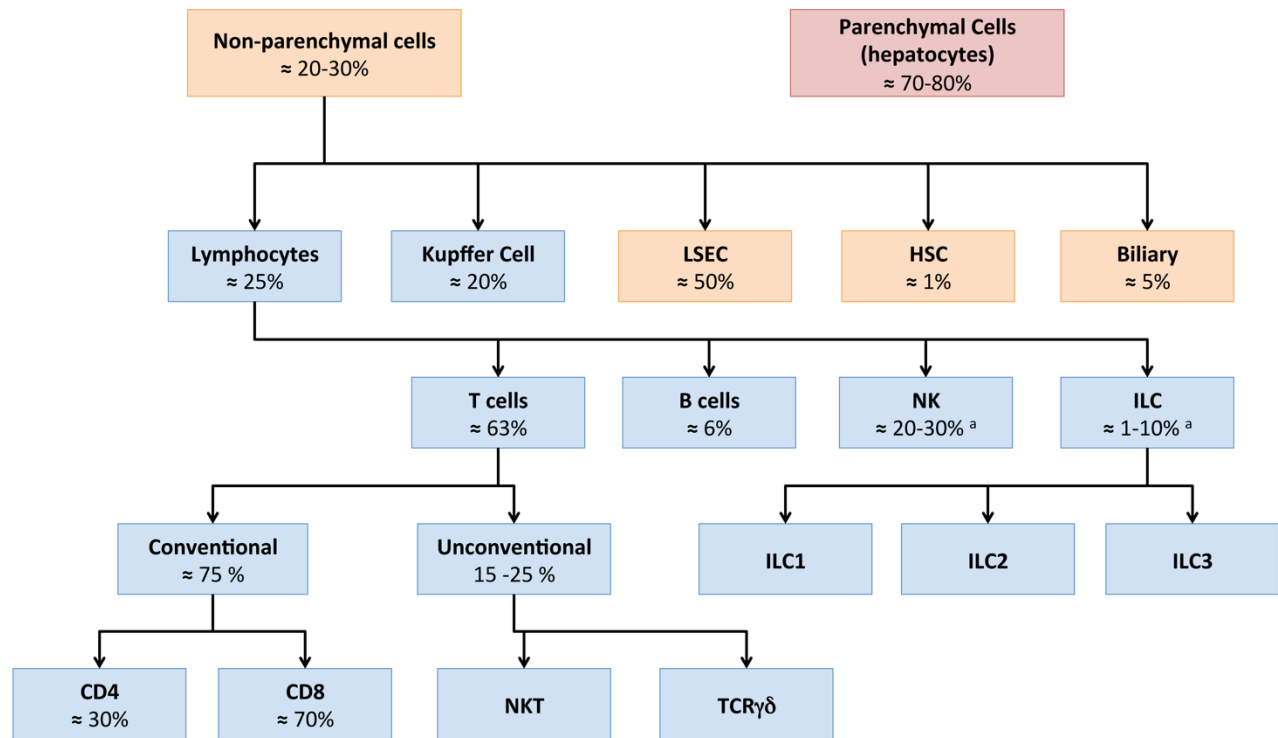


Figure 5. Composition immunitaire hépatique

Les cellules parenchymateuses hépatiques représentent 70-80% de la masse cellulaire hépatique (rose). Les cellules non parenchymateuses (orange) représentent 20-30% de la masse cellulaire hépatique dont 50% sont des cellules endothéliales (LSEC), 1% des cellules stellaires (HSC) et 5% les cellules biliaires. Finalement, les cellules immunitaires (bleu) représentent environ 45% des cellules non parenchymateuses. Les cellules immunitaires hépatiques sont composées des cellules de Kupffer, des lymphocytes T conventionnels (CD4 et CD8), non-conventionnels (NKT et TCR $\gamma\delta$), de lymphocytes B, de cellules « natural killer » (NK) et enfin des « innate lymphoid cell » (ILC) principalement de type 1. Figure issue de Fabre et al. dans l'Encyclopedia of Immunology 2016.

Les cellules de Kupffers (KCs), qui représentent 20% des NPCs, sont les macrophages résidents du foie^{23,24}. Elles se situent dans l'espace sinusoidal autour des zones portales et leur fonction est d'éliminer les endotoxines du sang^{22, 48, 49}. Les KCs, chez l'adulte, sont d'origine monocytaire et elles se différencient en macrophages dans le foie⁵⁰. Ces cellules expriment fortement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) I et II, ainsi que les molécules de costimulation CD86 et CD80 leur permettant ainsi de présenter des antigènes et d'activer des lymphocytes immatures. Les KCs produisent de l'IL-10 et du TGF- β qui contribuent ainsi à l'environnement tolérogène du foie^{44, 48, 51}. Ces cellules ont un phénotype plastique qui implique un profil pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2). La balance entre les M1 et les M2 contrôle la réponse aux insultes tissulaires et la progression de la fibrose⁵².

Les cellules NK, pour « Natural killer », sont présentes en abondance dans le foie (15-30%) comparativement au sang périphérique (5-15%)^{44, 53}. De par leur activité cytotoxique, les cellules NK contribuent à l'immunosurveillance hépatique en tuant les cellules infectées ou pré-malignes. Elles contribuent aussi à limiter la progression de réponse pathogénique comme la fibrose hépatique en éliminant les HSCs actives ou sénescents^{3, 54}.

Les cellules NKT, des cellules T non conventionnelles, sont enrichies dans le foie⁵⁵. Elles sont composées de deux populations : l'une classique (nommée alternativement type I) et l'autre non classique (type II). Les NKT de type I sont caractérisées par une origine thymique, un récepteur T (TCR) unique V α 24 et V β 11 chez l'homme, qui reconnaît des antigènes lipidiques présentés par le CD1d, une molécule de type MHC-I. Les NKT de type II peuvent avoir un TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ ⁵⁶. Ces cellules en réponse à leur environnement peuvent produire des cytokines de type I, II ou III permettant de contrôler les infections, l'inflammation et la régénération tissulaire⁵⁷.

Les cellules « muco-sassales associées invariantes T » (MAIT) constituent une autre population de cellules T non conventionnelles. Les MAITs ont un TCR invariant composé d'une chaîne α invariable, V α 7.2-J α 33 chez l'homme^{58, 59}. Ces cellules sont enrichies dans le foie (20% des cellules T) contrairement à l'intestin ou le sang périphérique (10%), et expriment fortement CD161. Les MAITs reconnaissent les dérivés métaboliques de la vitamine B produits par les bactéries et qui sont présentés par la molécule MR1, une molécule de type MHC-I. Elles peuvent aussi s'activer indépendamment de leur TCR en répondant à des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et l'IL-18^{58, 60, 61}. En plus de leur fonction antimicrobienne, les MAITs peuvent

contrôler l'inflammation hépatique en sécrétant l'IL-17A et la chimiokine CCL20 permettant le recrutement des lymphocytes T-CD4 de type Th17⁵⁹.

Les cellules dendritiques (DC) hépatiques sont principalement d'origine myéloïde avec un phénotype immature caractérisé par une expression faible des molécules de stimulation (CD40, CD80 et CD86) favorisant la tolérance en condition normale⁶². Ce phénotype est maintenu par l'interaction entre les DCs et les LSECs⁶³. Les DCs peuvent sentir, absorber et présenter les antigènes grâce aux « pattern recognition receptor » (PRRs) et aux MHC-I/II respectivement. Une fois activées, elles font acquérir un phénotype mature et migrer vers les ganglions pour induire la réponse T⁴³. Le foie contient aussi des DCs d'origine plasmacytoïde (pDCs) qui sont la source principale d'interféron (IFN) de type I et de type III lors des infections par des virus hépatotropiques^{64,65}.

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs) sont des cellules immunitaires d'origine lymphoïde n'ayant pas de spécificité antigénique. Les ILCs sont l'équivalent des lymphocytes T-CD4 du système immunitaire inné et elles sont divisées en trois types (ILC1, ILC2 et ILC3) selon les cytokines qu'elles produisent de manière équivalente aux cytokines des lymphocytes T auxiliaire ou « helper » (th) de type Th1, Th2 et Th17⁶⁶. Le foie est principalement enrichi en ILC1s caractérisés par l'expression de T-bet et de l'IFN- γ ⁶⁷. Les ILC1s sont différentes des cellules NK car elles ne possèdent pas d'activité cytotoxique en plus de leur signature génique unique^{67,68}. La fonction des ILCs dans l'homéostasie, l'inflammation et les infections hépatiques est encore inconnue à cause de leur identification récente.

Finalement, le foie possède une composition unique en cellules adaptives avec un ratio CD4 :CD8 inversé comparativement au sang périphérique^{53,69}. Le foie comprend majoritairement des cellules T possédant un TCR $\alpha\beta$ mais il est aussi enrichi en cellules T avec un TCR $\gamma\delta$ ^{53,70,71}. Comme l'intestin, le foie est enrichi en lymphocytes Th17 jouant un rôle important dans l'homéostasie mucoale via la production de cytokines pro-inflammatoires avec des propriétés antimicrobiennes comme l'IL-17 et l'IL-22 (les cytokines principales de l'immunité de type III)^{72,73}. L'IL-22 possède aussi des propriétés hépatoprotectives facilitant la survie et la prolifération des hépatocytes lors des atteintes aigües⁷⁴. Enfin, le foie est un organe pauvre en lymphocytes B (6%) en comparaison avec le sang périphérique. La fonction des cellules B dans le foie est peu connue, mais elle semble principalement dépendante des cytokines qu'elles produisent lors des conditions normales et pathogéniques comme la fibrose⁴⁴.

1.d.2 La tolérance hépatique

Le foie est un organe tolérogène, ce principe a été découvert par le fait qu'un greffon hépatique allogénique peut être transplanté avec succès, alors que les greffons d'autres organes sont rejetés par l'hôte ⁷⁵. De plus, la transplantation d'un greffon hépatique avec celui d'un autre organe diminue de manière importante les chances de rejet. Ces observations illustrent le potentiel du foie à moduler les réponses immunitaires (Figure 6). En effet, le foie comporte un nombre important d'APCs qui peuvent présenter des antigènes du soi ou étrangers induisant la tolérance ou l'activation, respectivement ⁴³. Tout d'abord, les KCs, les LSECs, les HSCs et les hépatocytes peuvent présenter des antigènes via le MHC-I et le MHC-II aux lymphocytes naïfs circulant dans le foie (signal 1) ^{13, 21, 51, 63, 76}. En condition normale, ces cellules expriment faiblement les molécules de costimulation (signal 2) et les cytokines (signal 3) nécessaires pour l'activation des lymphocytes ⁴³. Les DCs résidentes du foie ont un phénotype immature qui ne permet pas d'induire une réponse immunitaire forte en comparaison à des DCs matures qui résident dans les ganglions ^{77, 78}. Les APCs hépatiques expriment aussi fortement des ligands inhibiteurs de la réponse immunitaire tels que la galectin 9 (Gal-9), « programmed cell death-ligand » 1 et 2 (PD-L1 et PD-L2) qui inhibent les lymphocytes en se liant à « T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3 » (Tim-3) et à « programmed cell death 1 » (PD-1) ^{21, 63, 79, 80, 81}. L'inflammation induit l'expression de ces ligands inhibiteurs par les APCs du foie, menant à l'inhibition des lymphocytes activés qui expriment fortement Tim-3 et PD-1. La tolérance est aussi induite par la sécrétion de petites molécules inhibitrices comme des cytokines et des dérivés métaboliques. Les KCs, les LSECs et certains types de DCs peuvent sécréter de l'IL-10 et du TGF- β des cytokines anti-inflammatoires limitant l'activation des lymphocytes T ^{48, 51}. En effet, les DCs produisant l'IL-10, nommée DC-10, sont une sous-population de DCs qui induisent les lymphocytes T immunorégulateurs produisant l'IL-10 nommé Tr1. Les Tr1 sont important pour limiter les réponses inflammatoires et la suractivation du système immunitaire. Les DCs hépatiques et les KCs produisent aussi une enzyme, indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase (IDO), qui lors du catabolisme du tryptophane, produit une molécule immuno-modulatrice la kynurénine IDO ^{82, 83, 84}. De nombreuses cellules hépatiques comme les hépatocytes et les HSCs expriment des ectonucleotidases, CD39 et CD73, menant à la production d'adénosine à partir de l'ATP libre ⁸⁵.

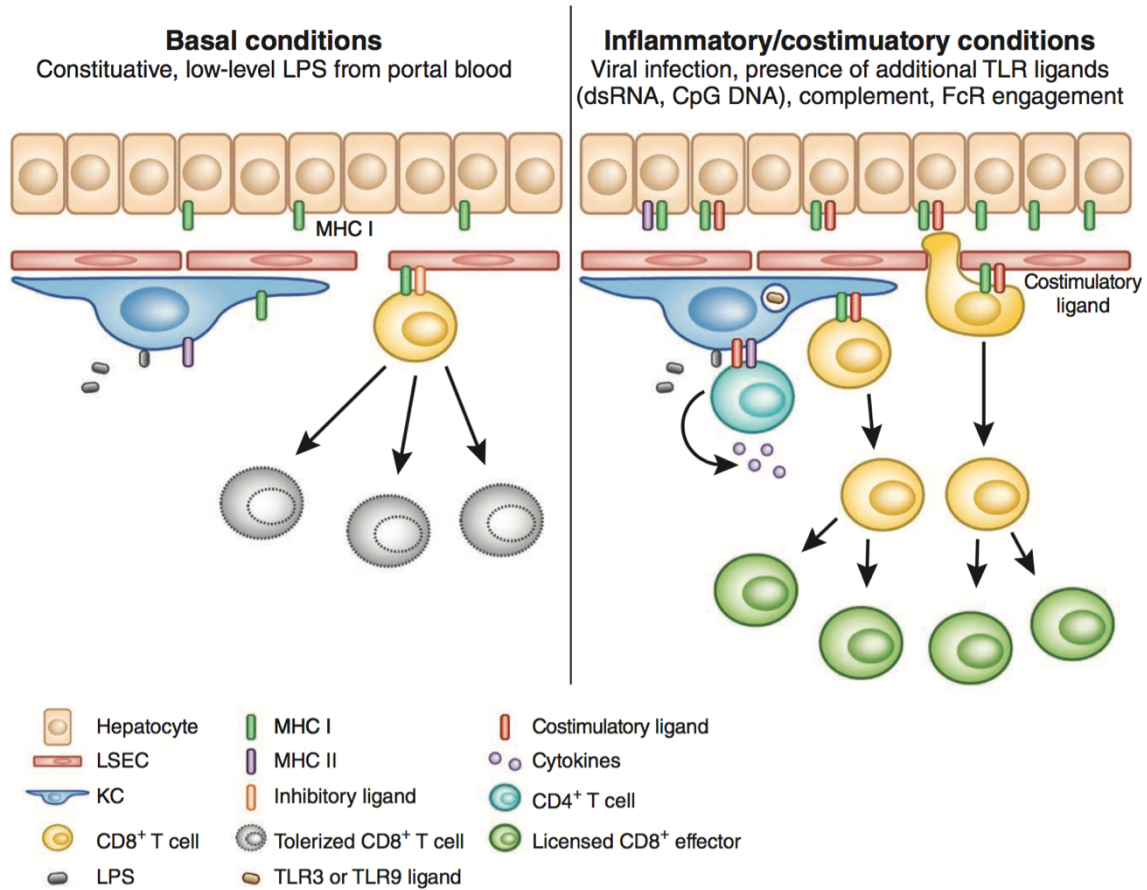


Figure 6. Régulation de la réponse T par les cellules hépatiques

À gauche les mécanismes induisant la tolérance, les APCs et les LSECs expriment les MHC-I et les ligands inhibiteurs. L'absence d'autres signaux ne permet pas l'activation de ces cellules qui gardent leur fonction tolérogène. À droite lors d'une infection, les signaux de stress entraînent l'activation des DCs et LSECs qui maintenant peuvent induire une réponse immunitaire par sécrétion de cytokines et expression des molécules de co-stimulation. Figure issue de Kubes et al.

L'adénosine en se liant à son récepteur à la surface d'une cellule effectrice permet la transition de la réponse pro-inflammatoire vers une réponse anti-inflammatoire^{86, 87, 88}. L'inflammation induit l'expression de CD39 et de CD73 permettant ainsi de contrôler et de limiter la réponse immunitaire.

La tolérance hépatique est vitale pour limiter l'inflammation locale en réponse aux nombreux stimuli inflammatoires que le foie reçoit, et elle contribue aussi à maintenir l'homéostasie. Cependant, lors des infections la tolérance doit être brisée pour permettre l'activation. L'établissement d'une infection libère des signaux de danger (DAMPs et PAMPs) et des molécules inflammatoires (ROS, IL-1 β et IL-6) qui mènent à la maturation et à l'activation des DCs hépatiques^{43, 89}. Une fois actives, elles induisent une réponse immunitaire précoce locale ou elles migrent dans les ganglions pour induire une réponse immunitaire antigène spécifique. Les lymphocytes activés dans les ganglions migrent ensuite dans le foie pour exercer leur fonction antimicrobienne. En 2013, il a été démontré que des structures lymphoïdes tertiaires, nommées « intrahepatic myeloïd cell aggregate for T-cell population expansion » (iMATES), sont induites après activation du TLR-9 sur les monocytes. Les iMATES nécessitent la production de TNF- α et elles permettent une expansion des cellules antigènes spécifiques dans le foie permettant de mieux combattre les infections⁹⁰. L'existence de cette structure lors des infections hépatiques chez l'homme reste à démontrer.

1.d.3. Élimination des cellules effectrices

Suite à l'élimination d'un pathogène, les cellules effectrices restantes doivent être éliminées. Ce procédé prend place en partie dans le foie de par sa microanatomie et sa nature immunomodulatrice unique. L'expression constitutive des molécules d'adhérence par les LSECs, « intracellular adhesion molecule 1 » (ICAM-1) et « vascular adhesion molecule » (VCAM-1), permet de capturer uniquement les lymphocytes activés circulant dans le foie^{45, 46}. Ceci fut démontré chez la souris par transfert adoptif de cellules naïves et activées dans un même hôte⁴⁶. Une fois capturés, les lymphocytes T-CD8 peuvent proliférer légèrement avant d'être éliminés par apoptose. En effet, les cellules effectrices expriment fortement PD-1 et Tim-3 qui après liaison avec leurs ligands, qui sont exprimés par de nombreuses cellules hépatiques, induisent des signaux apoptotiques. De plus, le manque de signaux de co-stimulation favorise aussi la déplétion des cellules effectrices^{45, 46, 80, 91, 92}.

2. La fibrose hépatique : réponse aux insultes tissulaires chroniques

La fibrose hépatique se caractérise par l'accumulation pathogénique de collagène de type I, de type III et de fibronectine induite par les myofibroblastes menant à une perte progressive de la fonction hépatique, due à la dédifférenciation des hépatocytes et à la désorganisation de l'architecture tissulaire ¹. Elle apparaît lors des atteintes hépatites chroniques et représente une forme dérégulée de la réponse régénérative aux insultes tissulaires. Dans cette section, nous allons d'abord discuter de la réponse tissulaire aux insultes dans un contexte aigu, puis chronique afin de décrire les mécanismes moléculaires entraînant l'activation des HSCs et la persistance de la fibrose hépatique. Enfin, nous allons décrire l'architecture d'un foie fibrotique et les complications qui y sont liées.

2.a. Réponse de régénération tissulaire aux insultes aiguës

La régénération tissulaire est essentielle à la survie de tous les organismes ⁴. Suite à une insulte tissulaire, la nécrose, les corps cellulaires, et les pathogènes qui envahissent la blessure induisent une réaction inflammatoire qui a pour but de limiter la propagation de l'insulte tissulaire et des pathogènes. La régénération tissulaire doit être induite suite à une insulte. Les chimiokines et les signaux de dangers relâchés suite à une insulte tissulaire entraînent rapidement le recrutement de nombreuses cellules immunitaires innées comme les macrophages, les neutrophiles et les monocytes ^{25, 26, 93}. La durée et l'intensité de cette réponse inflammatoire déterminent si la régénération tissulaire sera optimale ou fibrotique. Une réponse normale est constituée de trois phases, une première inflammatoire menant au recrutement des cellules effectrices produisant des facteurs solubles (cytokines et chimiokines) qui contrôlent l'élimination des débris et l'invasion des pathogènes. Puis une phase où la réponse inflammatoire est modulée pour induire un phénotype de régénération tissulaire. Enfin, la troisième phase consiste à la résolution par l'élimination des cellules inflammatoires entraînant un retour à l'homéostasie (Figure 7) ^{4, 52, 94}. Ce processus de régénération tissulaire est extrêmement complexe, l'utilisation d'animaux transgéniques et de microscopie intravivante a permis lors des dernières années de mieux le comprendre.

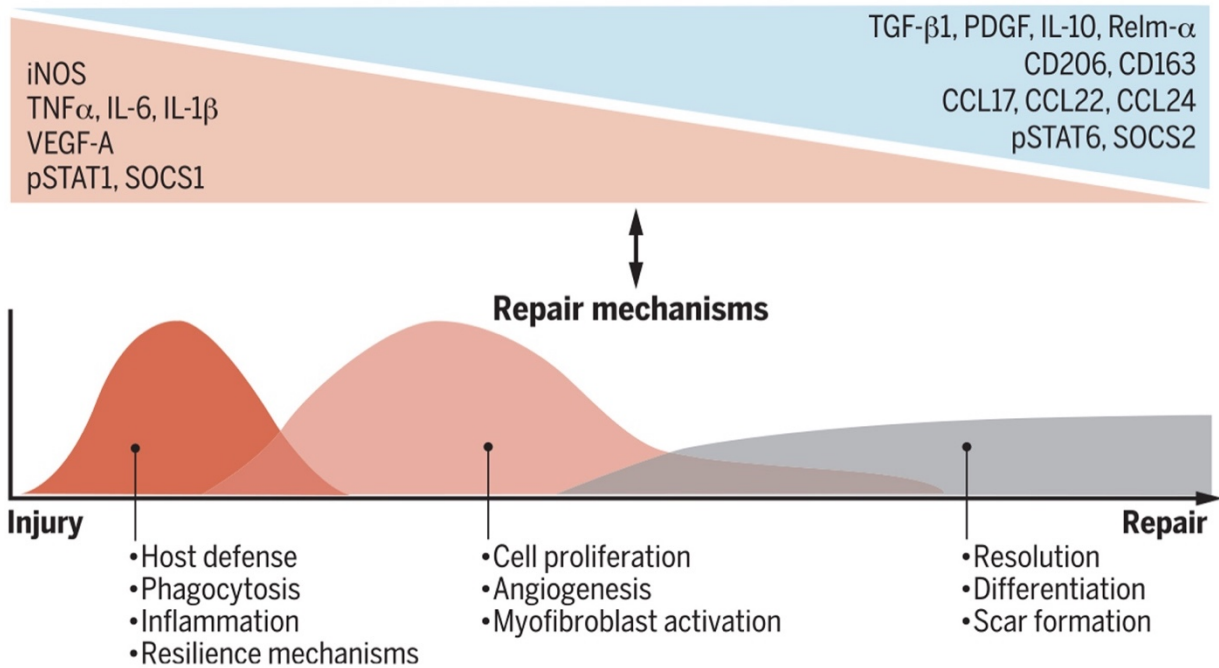


Figure 7. Les trois phases de la régénération tissulaire

Suite à une blessure, une réponse inflammatoire (IL-1 β , IL-6, TNF- α) est induite pour contrôler l'insulte tissulaire. Puis l'inflammation entraîne l'activation des myofibroblastes et la régénération de l'épithélium. L'inflammation est ensuite contrôlée et réduite pour permettre la résolution de l'insulte et la formation du tissu cicatriciel via l'IL-10, le TGF- β et le PDGF. Figure issue de Wynn et al. ⁴.

La mort cellulaire induite par la nécrose, la pyroptose et la nécroptose entraînent la libération de « danger-associated molecular pattern » (DAMPs) qui sont reconnues par le système immunitaire comme les nucléotides (ATP, UTP), les motifs lipidiques (shingosine-1-phosphate) et les chimiokines⁹⁵. Dans les premières heures suivant la blessure, les cellules recrutées sont les neutrophiles, les plaquettes et les macrophages intrapéritonéaux exprimant « GATA binding factor 6 » (GATA-6), puis les autres phagocytes comme les monocytes et enfin les autres cellules immunitaires (NKT, lymphocytes) lors de la phase de régénération^{26, 93, 96, 97}. Suite à la blessure, les plaquettes produisent de nombreux signaux pro-inflammatoires menant au recrutement des neutrophiles et des GATA-6⁺ macrophages⁹⁵. Les plaquettes dans le foie s'accumulent autour de la blessure et elles forment des structures semblables à des vaisseaux sanguins pour guider et faciliter le recrutement cellulaire⁹⁸. La déplétion des plaquettes limite fortement la résolution de l'insulte tissulaire. Les neutrophiles et les GATA-6⁺ macrophages éliminent les débris cellulaires et l'ADN présent au site de la blessure menant à leur activation et à la sécrétion de chimiokines qui recrutent les monocytes^{26, 97}. Les monocytes commencent à s'accumuler au site de la blessure à partir de 8 h et ils atteignent un maximum à 24 h. Ils ont d'abord un phénotype pro-inflammatoire (M1) caractérisé par la sécrétion de cytokines et des métalloprotéases matricielles (MMPs) permettant de digérer la matrice extracellulaire (ECM) endommagée⁹³. De plus, ils contribuent aussi à l'élimination des débris cellulaires. Ces monocytes acquièrent ensuite un phénotype anti-inflammatoire (M2) qui est induit par l'IL-4 et l'IL-10 probablement produit par les cellules NKT⁹³. Ces cellules M2 sécrètent des molécules importantes pour la régénération tissulaire comme le TGF- β menant à la production d'ECM par les myofibroblastes, le « vascular endothelium growth factor » (VEGF) entraînant la revascularisation et l'IL-10 pour limiter la réponse inflammatoire et donc induire le retour à un état homéostatique⁵². Une fois que la guérison tissulaire est engagée, les myofibroblastes actifs sont éliminés par les cellules NK et l'IL-10 pour limiter un dépôt excessif d'ECM⁵⁴. Cette dernière étape est essentielle pour éviter l'induction d'une réponse fibrogénique.

2.b. La fibrose hépatique : activation persistante des cellules stellaires hépatiques

La fibrose est une accumulation pathogénique de composants de la matrice extracellulaire produite par des myofibroblastes activés de manière persistante¹. Pour comprendre les

mécanismes moléculaires et cellulaires de la progression de la fibrose hépatique, il faut déterminer l'origine des myofibroblastes hépatiques, les voies de signalisations et les voies métaboliques menant à l'activation persistante des HSCs.

2.b.1 Origine des myofibroblastes hépatiques

L'origine des myofibroblastes responsables du dépôt de collagène lors de la fibrose hépatique a longtemps fait débat. Les hypothèses sur l'origine des myofibroblastes regroupent les HSCs, les fibroblastes portaux, les fibroblastes dérivés de la moelle osseuse (BM-MF) et la transformation épithéliale mésenchymateuse (EMT) (Figure 8) ¹. Chacune de ces hypothèses ayant des arguments validés par des expériences *in vitro* ou bien par leur importance dans d'autres tissus. Cependant, récemment l'utilisation de souris rapporteuses pour l'expression du collagène de type I (Colla1-GFP) couplé à un rapporteur de destinée pour les HSCs (Lrat-red tomato) ont permis de démontrer que les HSCs représente plus de 90% des myofibroblastes lors de nombreuses insultes hépatiques ⁹⁹. Bien que l'EMT hépatocytaire ait été démontré *in vitro*, elle n'a jamais pu être observée *in vivo* ¹⁰⁰. Les fibroblastes portaux semblent contribuer lors des insultes associées au choléduque, cependant même s'ils sont une source importante de collagène au début de l'insulte, ils semblent avec le temps être remplacés par les HSCs ^{99,101}. Finalement, les BM-MFs sont importants pour la progression de la fibrose hépatique, car la déplétion ou le transfert adoptif de ces cellules *in vivo* entraînent une importante réduction ou augmentation de la fibrose dans le foie ^{102,103}. Cependant, l'utilisation de souris avec un rapporteur de destinée montre qu'une minorité des BM-MFs se transforment en myofibroblastes et donc qu'ils ne contribuent pas directement au dépôt de collagène ¹⁰⁴. La fonction des BM-MFs est principalement par la sécrétion de cytokines permettant l'activation des HSCs ^{102,103}.

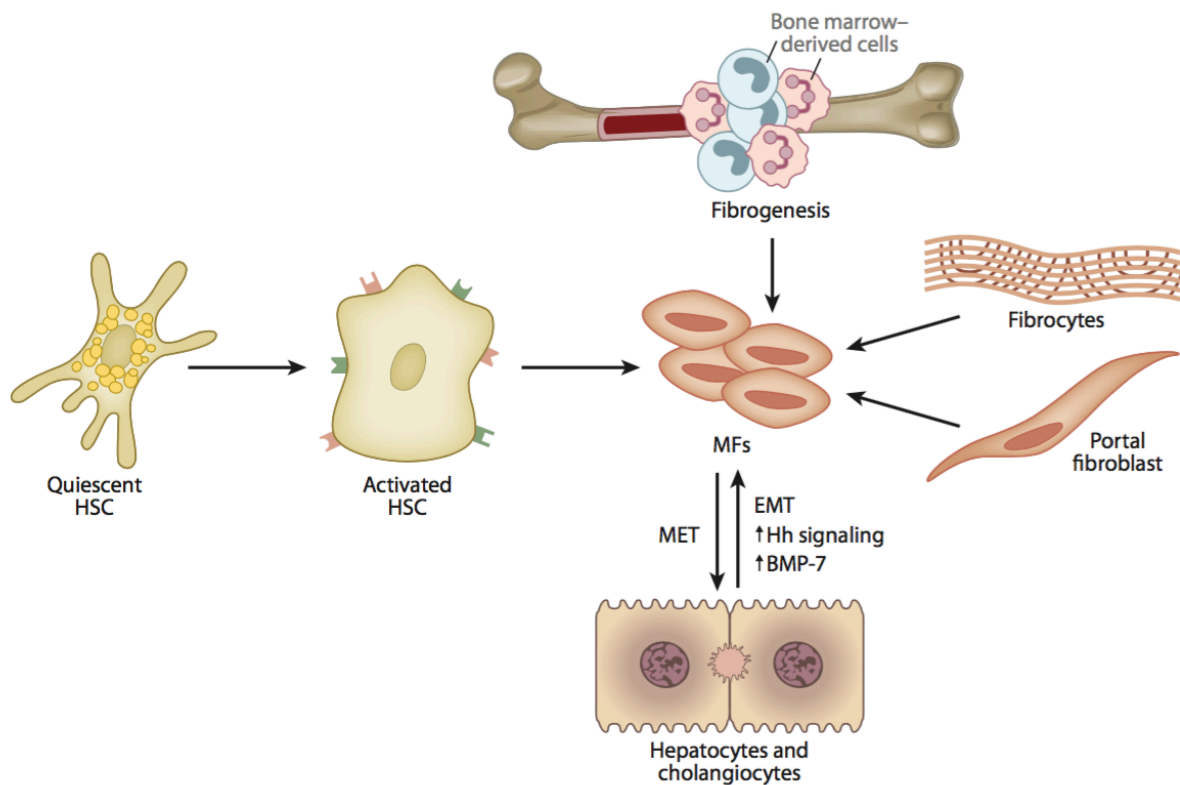


Figure 8. Origines des myofibroblastes hépatiques

La fibrose est caractérisée par le dépôt de collagène par des myofibroblastes. L'origine des myofibroblastes hépatiques a longtemps été débattue, comprenant les cellules dérivées de la moelle osseuse, les fibroblastes portaux, la transformation épithéliale mésenchymateuse hépatocytaire et les cellules stellaires hépatiques (HSCs). Une étude a démontré que les HSCs sont la source principale de myofibroblaste hépatique lors de la fibrose⁹⁹. Figure issue de Friedman et al.¹.

2.b.2. Voie de signalisation pro-fibrotique

Les voies de signalisation contrôlant la fibrose peuvent être divisées en deux catégories selon Friedman *et al.*, les voies communes à tous les organes appartiennent au cœur et les voies spécifiques à un organe sont dites régulatrices¹⁰⁵. Dans cette section, nous allons décrire les principales voies du cœur dans le contexte de la fibrose hépatique. Ces voies comprennent les cytokines, les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire, et la voie « Hedgehog » (Hh) (Figure 9). Les voies régulatrices seront évoquées pour apporter des précisions sur la fibrose hépatique.

Les principales cytokines profibrogeniques comprennent le TGF- β , le « platelet derived growth factor » (PDGF), le VEGF et le « connective tissue growth factor » (CTGF)¹⁹. Le TGF- β est sécrété sous une forme inactive (lié au « latency associated peptide » ou LAP) par de nombreuses cellules immunitaires ou cellules résidentes dans le foie. La liaison du TGF- β à son récepteur hétérodimérique induit la phosphorylation du facteur de transcription « Mothers against decapentaplegic homolog 3 » (SMAD3), qui induit l'activation des HSCs et la transcription du collagène de type I et de type III¹⁰⁶. Le TGF- β induit l'internalisation de son récepteur, ainsi que la production de SMAD7, un inhibiteur de la phosphorylation de SMAD3¹⁰⁷. De plus, il induit aussi l'expression de « SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 » SMURF2 qui permet la dégradation du TGF- β récepteur par ubiquitination^{108,109}. Cette boucle de régulation négative est importante pour limiter les réponses excessives au TGF- β qui sont néfastes pour l'hôte. Le TGF- β peut aussi induire de manière non canonique un nombre important de MAPKs qui régulent positivement l'activation des HSCs comme JNK, p38 et ERK¹¹⁰. Le TGF- β possède un récepteur inhibiteur « BMP and activin membrane bound inhibitor » (BAMBI), les lipopolysaccharides en se liant au TLR-4 entraînent l'activation de la voie NF- κ B qui diminue l'expression cellulaire de BAMBI et donc augmente la réponse des HSCs au TGF- β ^{111,112}.

Le PDGF est un mitogène important dans le foie permettant la prolifération de nombreux types cellulaires incluant les HSCs^{94,113}. Il contrôle aussi la migration des HSCs au site de l'insulte hépatique, cet effet chimioattractant est important pour l'initiation de la fibrose hépatique¹⁹. En effet, l'expression du PDGF ainsi que son récepteur le PDGFR β survient très tôt après l'insulte hépatique^{19,94}. L'expression à la surface du PDGFR β est limitée aux HSCs actives¹¹⁴. *In vivo*, la déplétion de ce récepteur réduit fortement la progression de la fibrose hépatique.

Le VEGF est important pour la résolution des insultes hépatiques aiguës de par son effet angiogénique permettant la revascularisation du tissu ⁹⁴. Les principales sources de VEGF dans le foie sont les LSECs, les HSCs et les neutrophiles ^{25, 26}. Lors des insultes chroniques, le VEGF contribue aussi à la progression de la fibrose hépatique en induisant la prolifération des HSCs ¹¹⁵. Il est cependant difficilement envisageable d'inhiber cette molécule pour limiter la progression de la fibrose, car ceci entraînerait probablement une mauvaise revascularisation tissulaire qui induirait la nécrose.

Finalement, le CTGF est une molécule constitutivement produite dans le foie mais dont l'expression est fortement induite lors des insultes tissulaires ¹⁹. Le CTGF induit la prolifération, la migration, l'activation et la sécrétion d'ECM par les HSCs ¹¹⁶. L'autophagie qui est un processus biologique important pour l'activation des HSCs induit aussi la sécrétion de CTGF ¹¹⁷. Le CTGF est souvent la première cytokine profibrotique sécrétée et elle induit ensuite la sécrétion de TGF- β . L'expression du CTGF est fortement régulée négativement par le miR-24 qui nécessite l'activation de la voie TWIST-1 pour être exprimé. TWIST-1 est donc un facteur cellulaire important pour contrôler la progression de la fibrose ¹¹⁸. La dérégulation de l'expression de TWIST-1 ou du miR-24 est observée dans les foies stéatotiques ou fibrotiques.

Les interactions entre les HSCs et la matrice extracellulaire contrôlent le processus de quiescence et d'activation *via* l'induction de facteurs intracellulaires qui régulent l'adhésion, la prolifération et la différenciation en myofibroblastes ³. La matrice extracellulaire de l'espace de Disse est normalement composée de collagène de type II et IV ainsi que de nombreux protéoglycanes qui induisent des signaux de quiescence ¹. Ce type de matrice est aussi considéré comme moins rigide, car les fibres y sont dispersées de manière éparsée. La rigidité de l'environnement extracellulaire dicte la capacité des HSCs à se différencier en myofibroblastes. Ce concept de rigidité de l'environnement est important pour de nombreux types cellulaires et il s'applique même aux cellules souches. En effet, il est possible d'induire la différenciation de cellules souches en ostéoblastes uniquement par culture sur un milieu rigide (plastique) ^{119, 120}. De ce fait, les HSCs quiescentes s'activent spontanément et se différencient en myofibroblastes lorsque mises en culture sur un milieu rigide ¹²¹. De plus les intégrines, composées d'une sous unité α et β , sont des récepteurs transmembranaires qui permettent aux cellules d'interagir avec les motifs arginine-glycine-aspartate (RGD) de la matrice extracellulaire. Les intégrines sont importantes dans le processus de fibrose dans de nombreux organes. *In vivo*, la déplétion spécifique des

intégrines sur les myofibroblastes, par l'utilisation de souris PDGFR β -Cre et d'intégrines *floxées*, réduit significativement la fibrose dans le rein, le poumon et le foie ¹¹⁴. En effet, les intégrines peuvent se lier à la protéine LAP qui couplées à la contraction des myofibroblastes induit une libération du TGF- β actif ¹²². Dans le foie, seule l'intégrine $\beta 1$ ($\alpha v\beta 1$) est exprimée par les HSCs contrairement au poumon et au rein où les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 6$ sont exprimées. L' $\alpha v\beta 1$ permet aussi d'activer la voie « yes-associated protein 1 » (YAP-1) qui est importante pour l'activation des HSCs ^{123, 124, 125}.

La voie « Hedgehog » est extrêmement complexe et elle est régulée à de nombreux niveaux par des ligands, des récepteurs et des facteurs de transcriptions ¹⁹. Elle contrôle la régénération tissulaire, l'inflammation et la fibrose. Dans des conditions normales, les ligands de Hh ne sont pas exprimés et ils permettent à la protéine « Patched homolog » (PTC) de réprimer un activateur de la voie « smoothed homolog » (SMO) ¹²⁶. Lors des insultes hépatiques, les ligands de Hh sont sécrétés et ils mènent à l'inhibition de PTC. Ceci permet de lever l'inhibition de SMO qui entraîne l'accumulation du facteur de transcription GLI2. GLI2 quant à lui induit GLI1 qui permet la transcription d'ostéopontine une molécule importante dans la migration, l'adhésion et la différenciation des HSCs ^{19 127}. *In vivo*, l'inhibition de la voie Hh par la déplétion de SMO dans les fibroblastes ou la surexpression de PTC réduit significativement la fibrose hépatique. La voie Hh est particulièrement active lors de la stéatose hépatique. Les hépatocytes qui entrent en apoptose, suite à la lipotoxicité, relâchent de grandes quantités de ligands Hh ¹²⁷.

En conclusion, ces voies communes de la fibrose représentent plusieurs niveaux de régulation et des possibilités d'intervention thérapeutique pour limiter la progression de la fibrose hépatique. Ces voies peuvent aussi être modulées positivement ou négativement de manière directe ou indirecte par le système immunitaire.

2.b.3. Régulation métabolique des cellules stellaires hépatiques

Le métabolisme est un facteur important dans la progression de la fibrose. En effet, la différenciation des HSCs quiescentes en myofibroblastes nécessite de l'énergie acquise par l'activation de voies métaboliques. Les principales voies métaboliques contribuant à l'activation des HSCs sont l'autophagie, le stress oxydatif, la perte du rétinol et le métabolisme lipidique.

L'autophagie permet de générer de l'énergie sous forme d'acides gras libres *via* le clivage des acides rétinoïques contenus dans les goulottes cytoplasmiques des HSCs ¹²⁸. L'inhibition de

l'autophagie spécifiquement dans les HSCs, par l'utilisation de souris GFAP-cre avec les molécules importantes dans la formation de l'autophagosome ATG-5 ou ATG-7 *floxées*, entraîne une réduction importante de la fibrose hépatique ¹²⁸. *In vitro*, les HSCs déficientes pour le processus d'autophagie peuvent s'activer si des acides gras libres sont ajoutés au milieu de culture ¹²⁸. Cette expérience démontre que l'autophagie dans les HSCs est un processus métabolique permettant de fournir l'énergie nécessaire à l'activation de ces cellules.

Le stress oxydatif en réponse aux réactifs oxygénés libres (ROS) est une importante voie impliquée dans l'activation des HSCs ³. Lors des hépatites, les hépatocytes apoptotiques relâchent des ROS dans le microenvironnement hépatique, qui induisent l'activation des HSCs par l'activation des voies de signalisations profibrogéniques (MAPKs et NF- κ B). De plus, les ROS agissent de manière indirecte en activant de nombreuses cellules immunitaires, comme les monocytes, entraînant un phénotype pro-inflammatoire. *In vivo*, la déplétion des enzymes « NADPH oxydase » (NOX) 1 et 4 dans les hépatocytes entraîne une réduction des ROS libres suite à une insulte hépatique limitant fortement l'activation des HSCs ¹²⁹.

Le métabolisme des acides rétinoïques est une des fonctions principales des HSCs dans des conditions normales ^{18, 130}. Le rétinol stocké dans les HSCs sert de source d'énergie lors du processus d'activation et de différenciation en myofibroblaste ¹²⁸. Mise à part cette fonction énergétique, le rôle des acides rétinoïques dans la fibrose hépatique n'est toujours pas complètement caractérisé. LRAT est une enzyme importante pour la conversion rétinol en ester de rétinyle. Les souris déficientes pour cette enzyme possèdent des HSCs ne contenant pas de gouttelettes d'acide rétinoïque, cependant elles développent une fibrose similaire à des souris sauvages, mais démontrent une carcinogenèse accrue ¹³¹. Ces observations laissent donc suggérer que le métabolisme du rétinol est plus important dans la capacité des HSCs à induire le carcinome que dans le processus d'activation *in vivo*. Cependant, l'oxydation du rétinol dans les HSCs par l'enzyme « Alcohol dehydrogenases » (ADH) 3 contribue indirectement à la progression de la fibrose hépatique. L'oxydation du rétinol par ADH-3 limite l'activité anti-fibrotique des cellules NK qui indirectement entraîne une baisse de l'apoptose dans les HSCs et entraîne une production de TGF- β ¹³².

Le métabolisme des lipides contribue aussi à l'activation des HSCs. En effet, le cholestérol libre permet d'augmenter la réponse au TGF- β dans les HSCs via l'induction du TLR-4 et la diminution d'expression de BAMBI ^{19, 133}. Le cholestérol libre est augmenté de manière

significative chez les patients souffrant de stéatose hépatique et cela contribue fortement à la progression de la fibrose dans les modèles expérimentaux de diètes riche en graisse (HFD). De ce fait, les enzymes du métabolisme lipidiques importantes dans la conversion du cholestérol libre en ester de cholestérol (lipogenèse) sont vitales pour limiter la progression de la fibrose hépatique^{133, 134}. Le syndrome métabolique observé chez les patients souffrant de stéatose non alcoolique entraîne une baisse de la conversion du cholestérol en ester de cholestérol menant à une activation accrue des HSCs. Enfin, les adipocytokines contribuent aussi à moduler l'activation des HSCs, l'adiponectine réduit l'activation des HSCs en diminuant la réponse au PDGF, tandis que la leptine induit directement l'activation des HSCs en augmentant l'expression d' α -SMA et du collagène de type I¹³⁵.

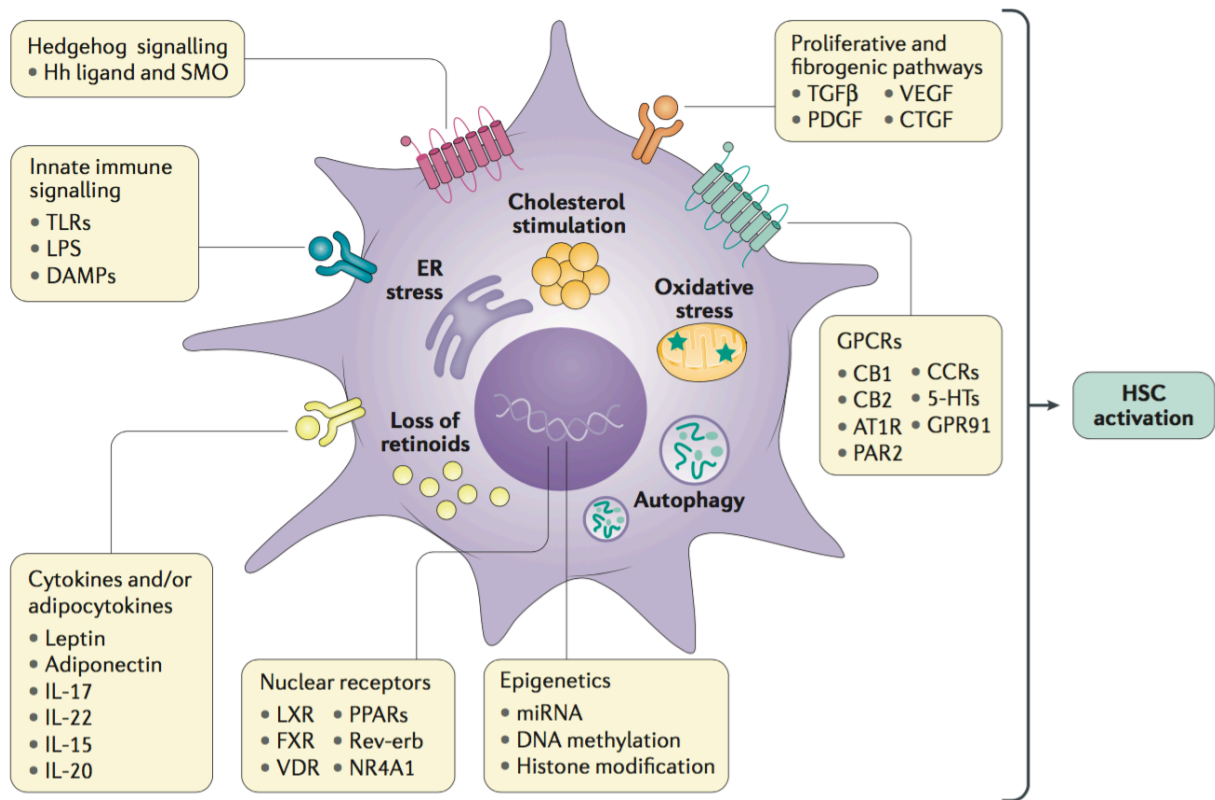


Figure 9. Mécanismes d'activation des cellules stellaires hépatiques

Schéma représentant les principales voies d'activation des HSCs qui sont les cytokines, les adipokines, les acides rétinoïques, les facteurs de croissance (TGF-β, VEGF, PDGF, CTGF), la voie hedgehog et le cholestérol. Figure issue de Friedman et al. ¹⁹.

2.c. Architecture du foie fibrotique

Le foie fibrotique a une architecture différente du foie sain, car l'accumulation pathogénique de collagène de type I entraîne un nombre important de changements dans la micro-anatomie hépatique (Figure 10) ¹. La première observation est la perte de la fenestration de l'endothélium. Ceci entraîne la capillarisation de l'endothélium produisant une dérégulation des échanges entre les hépatocytes et le flux sanguin portal. Avec la progression de la fibrose, la capillarisation de l'endothélium augmente limitant de plus en plus l'accès aux nutriments pour les hépatocytes ^{1,19}. La deuxième observation est la prolifération et la migration des HSCs actives au site de l'insulte hépatique ¹. Les HSCs se retrouvent ainsi dans des zones comprenant un important infiltrat immunitaire que l'on nomme les *septae*. C'est dans les *septae* que les HSCs reçoivent les nombreux signaux provenant des cellules immunitaires permettant de réguler positivement ou négativement la fibrose ^{94, 136, 137}. La localisation des *septae* et du dépôt de collagène sont unique à chaque insulte hépatique et ils permettent d'établir un diagnostic clinique. L'accumulation de matrice extracellulaire autour des vaisseaux sanguins entraîne de l'hypertension portale qui est une des causes principales de greffe chez les individus souffrant de cirrhose ¹. Enfin, la matrice extracellulaire pathogénique entraîne une dédifférenciation hépatocytaire qui affecte la polarisation des cellules et l'expression des microvillosités limitant grandement leurs fonctions métaboliques ^{1,3}.

2.d. Résolution de la fibrose hépatique

La fibrose est une réponse non contrôlée de régénération tissulaire lors des insultes chroniques. Si l'agent causant l'insulte tissulaire est enlevé, on observe *in vivo* une régression rapide de la fibrose ¹³⁸. L'apparition d'antiviraux permettant de traiter les infections chroniques par le VHC et le VHB a permis d'observer une régression de la fibrose hépatique chez l'homme ¹⁹. Ce processus est long et il est contrôlé par de nombreux facteurs comme le sexe, l'âge et la génétique. Une fois l'insulte hépatique terminée, les HSCs actives doivent être éliminées par apoptose ou sénescence, ou bien être inactivées pour permettre la résolution. Les HSCs actives ou sénescents sont éliminées par les cellules NK *via* leur activité cytotoxique ^{54, 139}. Ce processus est fortement inhibé par de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires pendant l'insulte chronique.

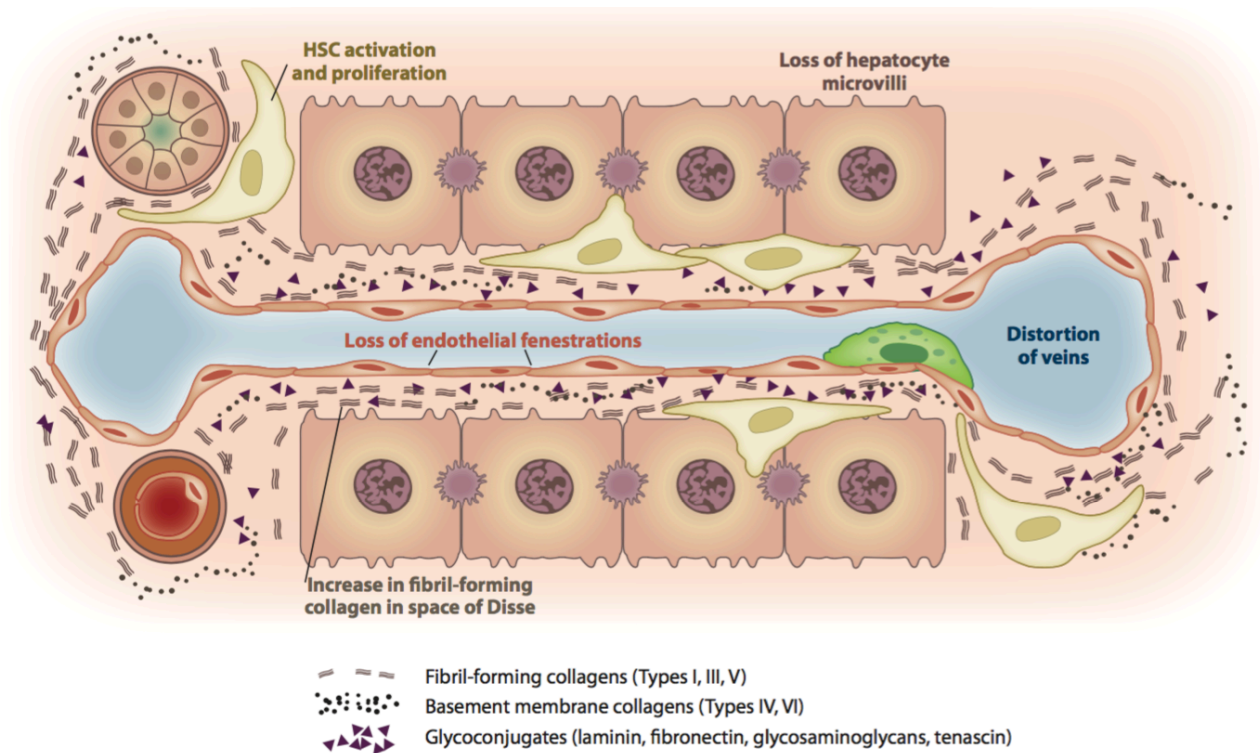


Figure 10. Architecture du foie fibrotique

Les signaux inflammatoires relâchés par les macrophages et les autres cellules immunitaires entraînent l'activation et la prolifération des cellules stellaires hépatiques. Le dépôt pathogénique de collagène de type I, de type III et de fibronectines entraîne la perte de la fenestration de l'endothélium ainsi que la perte progressive de la fonction hépatique par la perte des microvillosités. Figure issue de Friedman et al. ¹.

Cependant, lors de la résolution les cellules NK, par l'interaction du récepteur NKG2D avec son ligand NKG2D-L exprimé à la surface des HSCs actives, induisent l'élimination de ces cellules¹⁴⁰.

L'inactivation des HSCs a pu être observé par l'utilisation de souris transgénique avec un rapporteur de destinée pour les HSCs et les cellules produisant le collagène de type I¹⁴¹. Ces expériences ont permis de démontrer que 50% des HSCs actives sont éliminées pendant la résolution, tandis que les 50% restantes acquièrent un phénotype inactif. Les HSCs inactives (iHSCs) n'expriment plus les marqueurs de myofibroblastes et ne produisent plus de collagène de type I. Elles réacquièrent l'expression de PPAR- γ qui est exprimé dans les cellules quiescentes, mais elles ne réexpriment pas les autres gènes associés à la quiescence¹⁴¹. De plus, les iHSCs conservent une « mémoire » fibrotique qui se traduit par une signature épigénétique et transcriptionnelle unique. Les iHSCs sont capables de réacquérir un profil profibrotique plus rapidement que des HSCs quiescentes¹⁴¹. De nos jours, les thérapies visant à limiter le nombre d'iHSCs lors de la résolution constituent un intérêt majeur dans le domaine de la fibrose hépatique¹⁹.

3. Principales causes d'hépatites chroniques fibrogéniques

Les hépatites chroniques peuvent avoir des origines virales, parasitaires, génétiques et environnementales. Dans cette section, nous allons décrire les principales causes d'hépatites chez l'homme en couvrant l'épidémiologie, les complications et les possibilités de traitement.

3.a. Les hépatites virales

Chez l'homme cinq virus sont capables de causer des hépatites aiguës et/ou chroniques, les hépatites A à E. Ces virus ont été identifiés dans les 60 dernières années, et ils représentent la majorité des cas d'hépatites dans le monde. Seulement, deux de ces cinq virus peuvent causer une infection chronique chez un individu en pleine santé : l'hépatite B et l'hépatite C. Ces deux virus sont différents et n'appartiennent pas à la même famille¹⁴².

Le virus de l'hépatite B (VHB) est un petit virus à ADN enveloppé transmis par le sang, la salive, les sécrétions sexuelles et par transmission verticale de la mère à l'enfant. Plus de 350 millions d'individus sont infectés par le VHB à travers le monde¹⁴³. À l'exception des enfants, l'infection par le VHB résulte la majorité du temps à une infection aiguë. Cependant, le VHB peut

mener à une infection chronique persistante ¹⁴². En effet, le génome du VHB s'établit dans le noyau des cellules infectées sous forme d'ADN circulaire clos (cccDNA) ¹⁴⁴. L'infection aiguë est asymptomatique et non-déTECTABLE. Ce virus est capable de limiter fortement la réponse à l'IFN de type I permettant au virus de se « camoufler » ⁸⁹. De plus, la capsidE interagit avec les TLR-2 et TLR-4 à la surface de nombreuses cellules hépatiques pour induire une réponse anti-inflammatoire avec production d'IL-6 et IL-10 ^{145, 146}. Le contrôle de cette infection virale se fait par une réponse antivirale T-CD8-spécifique ainsi que par la production d'anticorps neutralisants. Lors de l'infection chronique, la réponse immunitaire est épuisée, ne permettant plus l'élimination du virus. La cytotoxicité liée à la réplication virale entraîne l'activation des HSCs et la fibrose hépatique ⁴⁷. De plus, certaines protéines virales comme HBx ont des propriétés carcinogéniques favorisant le développement du HCC ¹⁴³.

Le virus de l'hépatite C (VHC) est un virus à ARN simple brin positif transmissible par le sang qui infecte principalement les hépatocytes. La majorité des individus infectés par le VHC développe une infection chronique persistante (70%) et une minorité élimine le virus spontanément (30%) ¹⁴⁷. Comme le VHB, l'infection aiguë est majoritairement asymptomatique, la réponse innée étant bloquée par les protéines virales CORE et NS3 ^{148, 149}. L'élimination du virus nécessite une réponse T-CD8-spécifique du virus ainsi que l'aide des T-CD4 ^{150, 151}. À ce jour, le rôle des lymphocytes B dans l'élimination virale est toujours incertain ¹⁴⁷. Lorsque l'infection persiste chroniquement, le système immunitaire devient épuisé et la réplication virale cause de la cytotoxicité hépatocytaire entraînant la progression de la fibrose ^{152, 153}. Il est important de noter que le VHC ne peut pas infecter les HSCs ¹⁵⁴. Le VHC, comme le VHB, est une cause majeure d'hépatite dans le monde entraînant des greffes à la suite d'une cirrhose et de HCC (voir section 5). Il est prédit que l'utilisation d'agents antiviraux, permettant d'éliminer 95% des infections par le VHC, entraînera une diminution du nombre de greffes et de carcinomes liés à l'infection. Cependant, des études démontrent que les individus ayant éliminés le virus suite à un traitement ont un risque accru de HCC comparé à la population normale ^{143, 155, 156, 157}.

3.b. Les infections parasitaires

Les bilharzioses sont des infections parasitaires pouvant toucher l'homme qui sont causées par un ver hématophage : le schistosome. Ces parasites infectent plus de 240 millions d'individus dans le monde ^{158, 159}. La femelle pond chaque jour des œufs qui s'établissent dans les muqueuses,

dont le foie. Les œufs de *Schistosoma mansoni* induisent une fibrose périportale se formant autour de l'œuf, ces structures fibrotiques sont appelées granules. Les granules hépatiques peuvent ensuite entraîner une défaillance hépatique sévère suite à la fibrose induite principalement par les monocytes, les macrophages et une forte réponse immunitaire de type II entraînant la progression de la fibrose ^{160, 161}.

La malaria est une infection chronique causée par un parasite de la famille des *plasmodiums*, transmis par voie sanguine par le moustique. Lors du cycle de réplication, le parasite migre du sang vers le foie, où il établit une infection hépatocytaire prenant avantage de l'environnement tolérogène hépatique ^{162, 163}. Bien qu'asymptomatique cette étape contribue à la pathogenèse et l'établissement d'une infection persistante. L'élimination du parasite dans le foie nécessite une réponse T-CD8 cytotoxique spécifique avec production d'IFN- γ et de TNF- α . Il est intéressant de noter que ces T-CD8 nécessitent l'aide de T-CD4 produisant l'IL-4 ^{164, 165, 166, 167}. Si l'infection persiste, la cytotoxicité induite par la réplication parasitaire ainsi que la réponse de type II qu'elle induit peuvent mener à l'apparition de la fibrose.

3.c. Les hépatites auto-immunes

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie inflammatoire chronique du foie induite par une réponse immunitaire ciblant les hépatocytes dont l'auto-antigène n'a toujours pas été identifié ¹⁶⁸. Les facteurs pouvant déclencher cette réponse auto-immune sont inconnus, cependant les femmes sont plus susceptibles que les hommes. La pathogenèse de l'HAI est associée à des mutations dans les gènes HLA de classe II, ce qui laisse supposer une implication des T-CD4, et à une activité cytotoxique induite par les T-CD8 ainsi qu'à une augmentation d'immunoglobulines dans le sérum impliquant ainsi les lymphocytes B ¹⁶⁸. Les Tregs intrahépatiques ne sont pas suffisants pour contrôler la progression de cette maladie. Le diagnostic de l'HAI comprend une élévation des immunoglobulines et de l'ALT dans le sérum, l'exclusion d'autres causes d'hépatites virales et non virales par test histopathologique ^{168, 169}. De plus, la réponse à des molécules immunosuppressives comme des stéroïdes et l'azathioprine (un inhibiteur de la synthèse nucléotidique) permet de confirmer le diagnostic. Bien que les traitements immunosuppresseurs fonctionnent, 25% des patients traités développent de la fibrose ^{168, 169}.

3.d. Les hépatites liées à l'environnement

Les hépatites liées à l'environnement apparaissent après l'exposition aux toxines environnementales, l'ingestion d'alcool, ou suite à une alimentation riche en graisse causant la stéatose hépatique et un syndrome métabolique.

Les hépatites alcooliques surviennent suite à la prise chronique de forte quantité d'alcool causant une hépatotoxicité importante. La prise d'alcool chronique entraîne aussi un dérèglement métabolique augmentant ainsi le risque de diabète, un facteur pouvant aggraver la progression de la fibrose hépatique¹⁷⁰. De plus, l'alcool induit un stockage excessif des lipides par les hépatocytes induisant de la lipotoxicité¹⁷¹. L'abus d'alcool entraîne aussi des atteintes au niveau de la barrière intestinale pouvant mener à une translocation importante de bactéries vers le foie¹⁷². Les endotoxines libérées par ces bactéries peuvent activer les HSCs en augmentant leur réponse au TGF- β par l'activation de la voie NF- κ B via le TLR-4 et diminution de l'expression de BAMBI^{112, 173}. L'arrêt de la consommation d'alcool peut suffire à stopper la progression de la fibrose.

La stéatose hépatique non alcoolique (NASH) est une accumulation anormale de lipides dans le foie survenant à cause d'une alimentation trop riche en sucres et en graisses^{19, 174}. La stéatose hépatique est caractérisée par un syndrome métabolique et une progression rapide de la fibrose hépatique. Les données épidémiologiques montrent que les cas de stéatose hépatique ont fortement augmenté lors de la dernière décennie. NASH devrait devenir la première cause de transplantation hépatique et d'HCC lors de la prochaine décennie^{175, 176}. NASH est une maladie complexe liant le métabolisme, des prédispositions génétiques et une réponse immunitaire inflammatoire favorisant la progression de la fibrose. De plus, la progression de NASH peut être accentuée lors de coïnfection avec certains génotypes du VHC¹⁷⁷. En effet, l'accumulation de lipides dans les hépatocytes induit de la lipotoxicité entraînant leur apoptose, la libération de ROS et de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-18 qui peuvent induire l'activation des HSCs¹⁹. Le cholestérol libre ainsi que les acides gras libres favorisent l'activation des HSCs. Ces mêmes facteurs entraînent l'activation du système immunitaire et l'induction de réponses inflammatoires pouvant augmenter la réponse fibrotique. De plus, certains acides gras libres non saturés comme les acides linoléiques entraînent l'apoptose des T-CD4 favorisant l'apparition du HCC¹⁷⁸.

4. Évaluation clinique de la fibrose hépatique

L'évaluation du niveau de fibrose hépatique est vitale pour poser un diagnostic et pour l'établissement d'un plan de traitement chez les patients souffrant d'hépatites chroniques. En effet, il est nécessaire de suivre l'évolution de la fibrose avant que le stade de cirrhose soit atteint. De plus l'accès à certains traitements, comme les antiviraux dirigés contre le HCV, est limité au stade de fibrose avancé dans certains pays, états, ou province. La fibrose peut se quantifier selon différentes techniques plus ou moins invasives et selon différentes échelles dépendamment de la pathologie sous-jacente.

4.a. Technique invasive : la biopsie hépatique

La biopsie reste encore à ce jour l'étalon de l'évaluation pathologique de la fibrose hépatique. Elle consiste au prélèvement d'un échantillon hépatique d'une taille de 1-3 cm représentant ainsi 1/50000 de la taille totale du foie. Le spécimen doit comprendre au moins 11 espaces portes pour permettre l'établissement d'un diagnostic par un pathologiste^{179, 180, 181, 182}. De plus, l'information histologique permet de déterminer l'étiologie dont souffre le patient, car elle est caractérisée par un dépôt de collagène et un infiltrat immunitaire spécifique (Figure 11). Cette procédure nécessite une hospitalisation d'une journée. Le spécimen est récupéré par une aiguille sous anesthésie après une incision intercostale ou par une aiguille transjugulaire.

Il est aussi possible de collecter des cellules hépatiques par aspiration avec une aiguille fine « fine needle aspirate » (FNA). Le risque d'hémorragie est alors réduit, mais la qualité du spécimen ne permet pas d'évaluer précisément la fibrose. Le FNA est principalement utilisé pour obtenir une biopsie des nodules en diagnostic du cancer¹⁸⁰. Les risques et complications majeurs des techniques invasives impliquent des hémorragies internes, des douleurs respiratoires, un goût métallique et une perte temporaire de l'audition suite au prélèvement. Le risque d'hémorragies a chuté depuis que les biopsies sont effectuées sous échographie. Pour l'évaluation de la fibrose, le spécimen est ensuite fixé avant d'être soumis à évaluation par un pathologiste. Il existe de nombreuses échelles histologiques de classification de la fibrose hépatique.

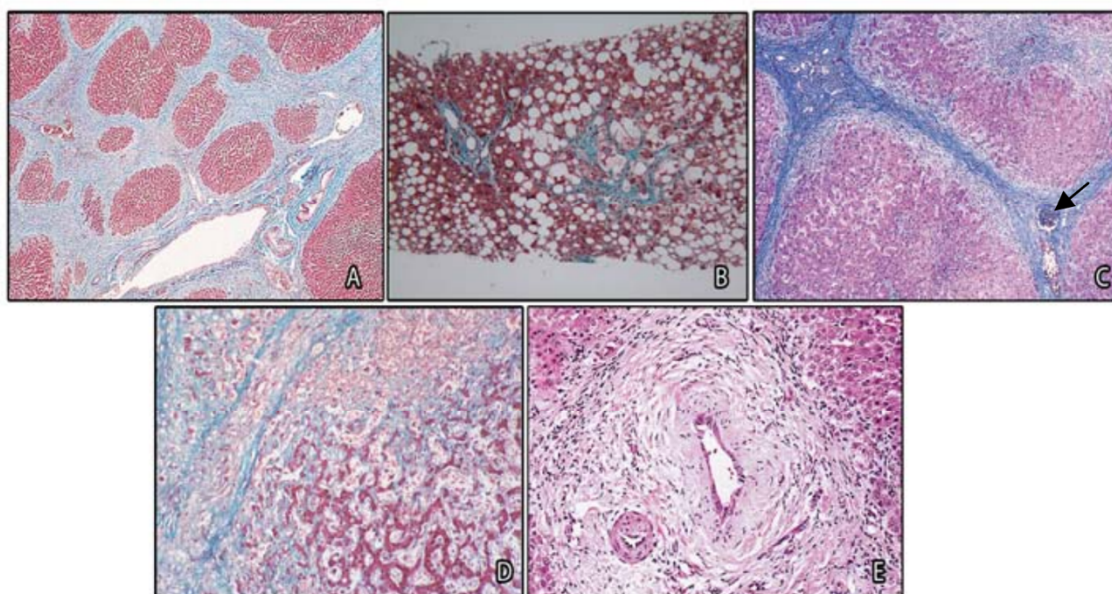


Figure 11. Dépôt de collagène caractéristique de la fibrose dans différentes étiologies

(A-D) Coloration au trichrome de Masson révèle le collagène tissulaire en bleu. (A) Cirrhose alcoolique avec nodules de régénération entourés d'importantes dépositions de collagène. (B) Stéatose non alcoolique avec fibrose péricellulaire autour des gouttelettes lipidiques. (C) Déposition de collagène autour des espaces portes formant des ponts avec la veine centrale. Et infiltrat lymphocytaire (flèche). (D) Fibrose hépatique sinusoidale avec obstructions des veines hépatiques lors d'insuffisance cardiaque. (E) Cholangite sclérosante primitive caractérisée par l'accumulation de collagène autour des canaux biliaires. (MacSween's Pathology of the liver, 5ème édition)

Elles se basent sur la quantification sur coupes histologiques : de la nécrose, de la formation de *septae*, de l'inflammation, de l'apoptose, de la nature de l'infiltrat immunitaire par coloration hématoxyline et éosine, et du dépôt de collagène par coloration au trichrome de Masson (marquant les collagènes de différents types en bleu) ou au rouge de picro Sirius (marquant le collagène de type I en rouge). Une fois les observations terminées, le pathologiste utilise une table de score pour déterminer le degré de fibrose.

Les scores les plus communément utilisés sont : « Histological Activity Index » (HAI) de Knodell ¹⁸³, le score METAVIR développé pour le diagnostic de la fibrose lors des hépatites virales ¹⁸⁴, le score Ishak qui est basé sur le score de Knodell ¹⁸⁵ et enfin le score SAF (steatosis, activity and fibrosis) pour l'évaluation de la fibrose lors de la stéatose hépatique ¹⁸⁶. Ces différents scores ne permettent pas d'évaluer tous les cas de fibrose précisément selon l'étiologie sous-jacente. C'est donc au pathologiste d'utiliser le score le plus approprié. Pour notre étude, nous avons utilisé le score METAVIR, car la majorité des biopsies hépatiques obtenues proviennent de patients avec le VHC.

4.b. Techniques non-invasives : biomarqueurs et échographie

L'utilisation de biomarqueurs en médecine a permis au cours des deux dernières décennies de développer des outils diagnostiques moins invasifs que la biopsie (Figure 12). Il existe deux types de tests non invasifs pour l'évaluation de la fibrose hépatique : ceux basés sur des marqueurs biochimiques et ceux sur la mesure de l'élasticité du foie. L'avantage des méthodes non invasives réside dans leur coût réduit et leur rapidité.

Les principaux tests basés sur des biomarqueurs sanguins quantifiés à partir de sérum sont le Fibrotest de la société Bioprotective (Paris, France), le score APRI (AST to platelet ratio index) et le test « enhanced liver fibrosis » de iQur Ltd (Southampton, Royaume-Uni). Le Fibrotest mesure 7 enzymes (α 2-magroglobuline, haptoglobine, γ -glutamyl-transpeptidase, bilirubine, apolipoprotéine A1 et alanine-aminotransférase (ALT)) dans le sérum en utilisant l'âge et le sexe du patient pour déterminer un score de fibrose corrélant avec le score METAVIR ¹⁸⁷. Ces tests nécessitent un petit volume de sang et ils sont facilement effectuables lors d'une visite de suivi par un médecin.

Les autres techniques non invasives sont basées sur la mesure de l'élasticité du foie. L'élasticité est inversement corrélée avec le degré de fibrose. En effet, le dépôt de collagène dans

le tissu amène à une rigidification tissulaire et donc à une perte de l'élasticité. La mesure de l'élasticité hépatique se fait en émettant une onde à l'aide d'un élastographe : plus celle-ci se propage rapidement, plus le tissu est élastique. On obtient alors une mesure en kilo pascal (KpA) qui corrèle avec le score de fibrose ^{180, 188}. Le Fibroscan est facilement transportable et il permet d'évaluer le degré de fibrose en quelques minutes. L'élasticité nécessite cependant d'être ajustée selon l'étiologie de la maladie hépatique ainsi que la présence d'obésité qui peut altérer la valeur mesurée ¹⁸⁹. En plus du Fibroscan, l'élasticité hépatique peut être évaluée par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM). Contrairement aux autres techniques d'évaluation de la fibrose, l'IRM permet de visualiser l'intégralité du foie permettant ainsi de tenir compte de l'hétérogénéité du tissu. Il permet aussi de détecter la présence de graisse dans le foie, car le gras résonne plus lentement que l'eau ¹⁸⁰. Finalement, les tests non invasifs permettent de facilement distinguer l'absence de fibrose (F0), la fibrose légère (F1-F2) et la fibrose avancée (F4). Cependant, ils ne permettent de déterminer les stades de fibrose aussi finement que l'analyse histologique. Lorsque les tests non invasifs sont contradictoires, la biopsie est alors requise pour confirmer le diagnostic. La majorité des patients de notre étude ont été recrutés pour une biopsie suite à la discordance entre le test sanguin et le Fibroscan.

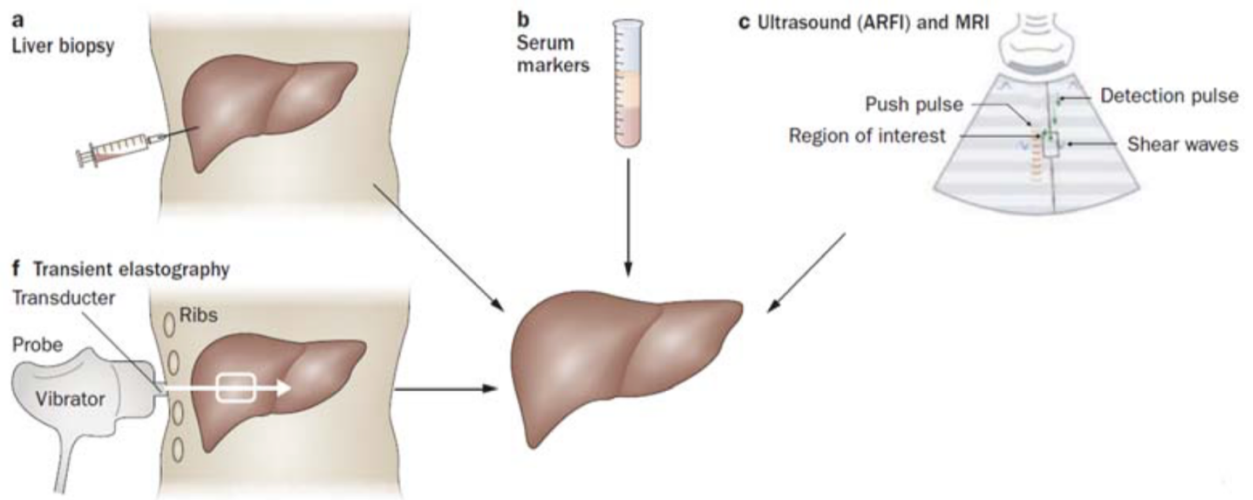


Figure 12. Techniques invasives et non-invasives pour l'évaluation clinique de la fibrose

(A) Biopsie hépatique intercostale. (B) Quantification de biomarqueurs dans le sérum. (C) IRM pour la détection de la fibrose hépatique par mesure de l'élasticité. (F) Élastographe permettant l'évaluation de la fibrose par mesure de l'élasticité. Figure issue de Friedman et al. ¹⁸⁰.

5. Complication liées à la fibrose hépatique et traitements

Les hépatites chroniques indépendamment de la cause entraînent à la progression de la fibrose hépatique. La fibrose est la première étape avant l'apparition de pathologies plus sévères comme la cirrhose et le HCC. Les changements moléculaires et cellulaires qui apparaissent lors de la fibrose influencent le développement du HCC par de nombreux mécanismes ¹⁹⁰. Pendant longtemps, il a été supposé que l'élimination de la cause de l'insulte mènerait à la résolution complète de la fibrose et ainsi à une réduction majeure du risque de carcinome. Or des études récentes démontrent qu'au stade de fibrose avancé la réduction du risque de complications hépatiques et de carcinomes est faible suggérant que le traitement de la fibrose est aussi important que le traitement de l'agent responsable de l'insulte tissulaire ¹⁹¹. Dans cette section, nous allons discuter des risques de complications hépatiques liées à la progression de la fibrose, puis des options thérapeutiques qui sont présentement en développement pour le traitement de la fibrose hépatique.

5.a. Complications hépatiques liées à la fibrose

De nombreuses études, sur de larges cohortes de patients infectés par le VHC ou souffrant de stéatose hépatique, ont démontré qu'un stade de fibrose avancé augmente fortement les risques d'incidents hépatiques sévères. En effet, dès le stade de fibrose F2 le risque de complications hépatiques augmente significativement pour atteindre un maximum au stade de cirrhose décompensée ³. À ce jour, on considère que le stade de fibrose F1 n'est pas lié à une augmentation du risque d'incidents hépatiques probablement à cause de sa forte réversibilité. Les manifestations d'un stade cirrhose sont nombreuses incluant l'accumulation de liquide dans l'abdomen (ascite), la défaillance rénale, les encéphalites et des saignements variqueux. La cirrhose est un facteur de risque important dans le développement du HCC puisque 90% des carcinomes apparaissent dans un foie cirrhotique ¹⁹¹. Les options thérapeutiques pour la cirrhose décompensée sont limitées à la greffe, alors que des interventions pendant le stade de fibrose pourraient être bénéfiques. Le HCC est un des cinq cancers les plus communs et la troisième cause de mortalité dans le monde ³. Au Canada, l'incidence est de 6.8 sur 100000 chez l'homme et 2 sur 100000 chez la femme ¹⁹². Le risque est fortement associé au stade de fibrose et les mécanismes moléculaires et cellulaires liant ces deux réponses sont encore peu caractérisés. Les principaux facteurs liant la fibrose au carcinome sont les interactions entre l'ECM et les intégrines, les sécrétions paracrines de

molécules oncogènes par les HSCs actives, la séquestration de ces molécules dans l'ECM et la diminution des fonctions d'immunosurveillance des cellules NK³. Ces mécanismes sont tous aussi importants pour la progression de la fibrose. Les thérapies visant à réduire la fibrose pourraient donc avoir un impact majeur sur l'incidence du HCC.

5.b. Thérapies anti-fibrotiques

La démonstration chez l'homme que la fibrose hépatique peut être réduite à mener au développement d'agents thérapeutiques agissant sur les principales voies de signalisation profibrotique. Cependant, la longue durée des essais cliniques permettant de démontrer une efficacité chez l'homme a fortement limité l'apparition de tels agents. Les principales voies thérapeutiques anti-fibrotiques sont la neutralisation des molécules profibrogéniques (TGF- β , PDGF, CTGF, IL-4, IL-13, IL-17), l'activation de voie anti-fibrotique (IL-10, FXR, PPAR), la neutralisation de chimiokines importantes pour la migration des HSCs et des macrophages (CCR2/CCR5), l'inhibition des intégrines et d'enzymes importantes pour la liaison des molécules de collagènes (LOXL2). La table suivante résume les principaux essais cliniques pour le traitement de la fibrose hépatique.

Compagnie	Molécule	Mode d'action	Phase
FibroGen	FG-3019 ¹⁹³	Anti-CTGF (anticorps monoclonal)	Phase II
Gilead	GS-6624 ¹⁹⁴	Anti-LOXL2 (anticorps monoclonal)	Phase I
Takeda	Cenicriviroc ¹⁹⁵	Double antagoniste de CCR2-CCR5	Phase II
Galectin Therapeutics	GR-MD-02 ¹⁹⁶	Antagoniste Galectin-3	Phase II
Genfit	Elafibranor ¹⁹⁷	Double ligand de PPAR α et PPAR γ	Phase II / III
Takeda	Pioglitazone ¹⁹⁸	Agoniste de PPAR γ	Phase III
Intercept Pharmaceuticals	Obeticholic acid ¹⁹⁹	Antagoniste de FXR	Phase II / III

Tableau 1. Liste des essais cliniques et traitements de la fibrose hépatique

6. Modèles expérimentaux de la fibrose hépatique

L'étude de la fibrose hépatique est possible à partir de différents modèles incluant l'accès à des spécimens biologiques (sang, tissus) obtenus chez des patients, l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules primaires, d'organelles générées à partir de cellules souches, et par de nombreux modèles animaux qui utilisent des approches génétiques, métaboliques, infectieuses ou toxiques. Chacun de ces modèles a ses propres avantages et limites, mais ils cherchent à reproduire au mieux la pathogenèse humaine.

6.a Modèles *ex vivo*

L'étude *ex vivo* de la fibrose hépatique est coûteuse, difficile et nécessite l'admission d'un patient dans un hôpital. L'obtention de spécimen clinique (biopsie ou explant hépatique) est possible après obtention d'un consentement éclairé. Au Canada, une biopsie hépatique ne peut pas être obtenue pour des raisons de recherche uniquement. L'obtention du spécimen doit se faire dans le cadre d'un diagnostic clinique. *Ex vivo*, il est possible d'obtenir du tissu frais permettant l'isolement de cellules primaires, des cultures de microsections hépatiques, ou du tissu hépatique fixé ou congelé permettant des études histologiques. Les facteurs limitants pour ces spécimens sont la variabilité entre les patients qui est induite par l'âge, le sexe, l'étiologie et la génétique. De plus, la conservation de tissu frais ou de cellules primaires est complexe. Les tissus fixés en paraffine sont plus faciles à conserver pour de longue période dépendamment des futures applications.

Il est possible d'obtenir des biopsies fixées en paraffine, après évaluation par un pathologiste. Ces spécimens peuvent servir à identifier des facteurs d'intérêt (protéines, ARNm, populations cellulaires) à l'aide de différentes techniques. L'immunohistochimie et l'immunofluorescence permettent de détecter des antigènes à l'aide d'anticorps permettant ainsi de visualiser des protéines ou des populations cellulaires spécifiques (par exemple, les lymphocytes à l'aide d'un anti-CD3). L'avantage de cette approche est d'avoir la localisation tissulaire qui peut donner des informations sur la fonction. La principale limitation de cette technique est que l'antigénicité tissulaire diminue avec le temps de conservation. Il existe des techniques permettant l'isolement d'ARNm à partir des tissus fixés qui permettent d'extraire une quantité d'ARN avec une qualité suffisante pour faire de la transcriptomique (bio-puce ou *RNA-seq*)^{200, 201}. La principale limitation

étant encore une fois la dégradation du matériel génomique avec le temps de conservation du spécimen biologique.

L'isolement de cellules primaires à partir de tissu est souvent réalisée à partir de spécimens prélevés sur des petits animaux (rongeurs), mais elle est aussi possible chez l'homme. Les biopsies hépatiques étant petites, elles ne permettent pas l'isolement de tous les types cellulaires (notamment les HSCs). Pour obtenir des cellules primaires humaines en quantité suffisante on utilise souvent des résections hépatiques « saines » provenant de patients avec des métastases de cancer d'origine extrahépatique. Il est aujourd'hui possible d'isoler avec une excellente pureté des lymphocytes intrahépatiques (IHLs), des KCs, des LSECs, des hépatocytes et des HSCs. La première étape consiste à digérer le tissu avec des enzymes permettant de dégrader la matrice extracellulaire (Collagénase II et Pronase) et l'ADN génomique (DNase I). Après digestion, le tissu est broyé puis filtré pour éliminer les débris. L'isolement des cellules primaires d'intérêts se fait sur gradient dont la densité est dépendante du type cellulaire à isoler ¹²¹. Enfin, pour assurer une meilleure pureté une sélection négative ou positive peut être effectuée par l'utilisation de billes magnétiques. Dans le cas des HSCs, on élimine les neutrophiles et les monocytes qui se retrouvent dans la même fraction. De plus, pour obtenir une pureté supérieure à 99% il est possible de trier en cytométrie de flux les HSCs du fait que les acides rétinoïques émettent dans le violet ¹²¹.

Enfin, il est aussi possible de réaliser des microsections hépatiques (de 1-50 μm) qui ont une architecture et composition tissulaire normale. Cette approche présente l'avantage d'être proche de l'état physiologique du tissu et d'évaluer les interactions entre les différents types cellulaires *ex vivo* ²⁰². Cependant, la rareté des tissus, les coûts liés à l'équipement, au milieu de culture, aux réactifs et le fait qu'il soit impossible de conserver ces échantillons pour une longue durée limitent l'utilisation de cette élégante technique.

6.b. Les modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont principalement basés sur l'étude de lignées cellulaires d'HSCs. Il existe deux lignées humaines non commerciales les Li90 et les LX-2 qui furent isolées à partir de résection de tumeur chez l'homme. Les Li90 ont été isolées à partir du foie d'une patiente. Elles n'ont pas subi de transformation et elles ont été conservées en culture pour environ 25 passages ²⁰³. On ne peut donc pas réellement les considérer comme une véritable lignée cellulaire. De plus, il est aujourd'hui difficile de faire proliférer ces cellules *in vitro*. Les cellules LX-2 ont été

immortalisées par passages successifs en présence faible de sérum et par transfection avec l'antigène T du SV-40²⁰⁴. Les LX-2 sont facilement transfectables et elles prolifèrent parfaitement pour de nombreux passages. En culture, elles peuvent accumuler des acides rétinoïques, mais cette capacité diminue fortement avec le temps de culture. En réponse au TGF- β , elles montrent une augmentation de l'expression des gènes profibrotiques²⁰⁴. Cependant, l'utilisation des lignées cellulaires (LI90 et LX-2) dans l'étude de la fibrose hépatique a fortement diminué à cause de nombreuses limitations. Tout d'abord, les passages successifs ont induit un état d'activation permanent de ces cellules et elles ne reflètent donc pas l'état des cellules quiescentes. De plus, la sensibilité au TGF- β de ces lignées diminue à chaque passage rendant leur utilisation complexe. Finalement, le défaut majeur des études *in vitro*, qui s'applique aussi aux cellules primaires, et que le plastique des flasques qui a une forte rigidité suffit à induire l'activation des HSCs avec le temps. Il est possible de limiter cet effet en utilisant des flasques cotées avec de la fibronectine ou du collagène. Cependant, les cellules Li-90 et les LX-2 ont été à l'origine passées de nombreuses fois sur du plastique, expliquant ainsi leur état d'activation.

Récemment, l'utilisation de cellules souches pluripotentes avec des facteurs de croissances, des cytokines spécifiques et la présence d'une ECM permet la différenciation *in vitro* de HSCs primaires quiescentes, mais aussi d'organelles avec une architecture hépatique conservée (hépatocyte, HSCs et LSECs formant un espace de Disse). Ce modèle et l'utilisation d'HSCs primaires isolées à partir de foie murin ou humain représente l'outil le plus physiologique pour étudier *in vitro* la fibrose hépatique^{205, 206, 207, 208}. Mais encore une fois, le coût ainsi que l'accès aux cellules souches pluripotentes limitent fortement l'utilisation de cette méthode.

6.c. Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* de la fibrose hépatique sont basés sur l'utilisation de petits rongeurs (souris et rat). Ils peuvent être basés sur des souris « knock-out », transgéniques et/ou sauvages qui subissent des traitements (toxines ou métaboliques) induisant une toxicité hépatique menant à l'activation des HSCs et à l'induction de fibrose plus ou moins sévère selon la période de traitement. Il existe donc des modèles induisant des hépatites aiguës entraînant une réponse de guérison tissulaire, et d'autres induisant des hépatites chroniques entraînant une guérison anormale fibrogénisante. L'utilisation des modèles aigus et chroniques permet de déterminer si une réponse tissulaire et immunologique est dérégulée lors de la progression de la fibrose. Il est important de

noter que la souche de souris utilisée lors de ces études influence fortement sur l'interprétation des résultats. Par exemple, les souris BALBc sont plus susceptibles que les souris C57BL/6.

6.c.1 La concanaviline-A

La concanaviline-A (Con-A) est une molécule de la famille des lectines qui une fois injectée se lie à la surface des hépatocytes²⁰⁹. Les lectines entraînent l'activation non spécifique des lymphocytes T qui se traduit par leur prolifération et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type I (IFN- γ et TNF- α)²¹⁰. De plus, la Con-A induit une activité cytotoxique chez les lymphocytes T entraînant ainsi une réponse inflammatoire sévère menant à la mort des hépatocytes, qui se traduit par une forte augmentation de l'ALT dans le sérum 8 h post-injection²¹⁰. Suite à cette blessure, une réponse de régénération tissulaire est induite dans le foie. Cependant, la sévérité de l'hépatite induite par la Con-A est trop importante pour être administrée de manière chronique. Ce modèle reste donc principalement utilisé pour l'étude des insultes tissulaires aiguës.

6.c.2. Le tétrachlorure de carbone

Il existe d'autres toxines qui peuvent être administrées chroniquement par voie orale ou intrapéritonéale. Elles induisent l'apoptose, une fois métabolisées par les hépatocytes. La molécule la plus couramment utilisée est le tétrachlorure de carbone (CCl₄). Cette substance contrôlée est un vermifuge naturel utilisé depuis le début du XX^e siècle pour traiter la nourriture du bétail. Lorsque le CCl₄ était mal dosé, on observait des décès dans les stocks de bétails. En 1922, des prisonniers anglais condamnés à la peine capitale ont reçu des injections de CCl₄ entraînant leur mort. Après nécropsie, Docherty et Burgess ont observé une nécrose et une inflammation hépatique sévère²¹¹. Depuis, le CCl₄ est utilisé comme modèle d'induction chronique de la fibrose hépatique et il se caractérise par l'apparition d'une fibrose sévère avec présence de nécrose modérée et une forte inflammation. Le CCl₄ agit sur la peroxydation des lipides et la libération de ROS entraînant l'apoptose des hépatocytes et l'activation des HSCs²¹². Suite à une injection de CCl₄, les KCs mènent la réponse inflammatoire qui entraîne la sécrétion de cytokines et de chimiokines recrutant d'autres cellules inflammatoires comme les neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes amplifiant ainsi la réponse initiale. Il faut au minimum 2 à 3 semaines de traitement pour induire un dépôt fibreux dans le foie et une fibrose de type sévère avec des ponts de collagène apparaît entre 4 et 6 semaines d'injections²¹².

6.c.3. Le thioacétamide

Le thioacétamide (TAA) est une autre toxine communément utilisée pour induire une hépatite chronique avec fibrose sévère. C'est un composé chimique sulfuré, qui peut être administré par voie orale ou intrapéritonéale. Le TAA sert souvent de validation aux observations faites avec du CCl₄²¹². De plus, le TAA induit une inflammation beaucoup plus faible que le CCl₄ se rapprochant plus de ce qui est observé chez les patients souffrant d'hépatites chroniques, lorsqu'il est administré par voie orale²¹³. Même si ce modèle est utilisé depuis les années soixante, le mécanisme d'action est toujours inconnu. L'oxydation du TAA mène à la production de S-oxyde et S-S oxyde qui sont probablement responsable de l'hépatotoxicité²¹⁴.

6.c.4. Les souris *Mdr2* déficientes

Les souris *mdr2* « knockout » sont un modèle génétique reconnu pour l'étude de la fibrose hépatique et du carcinome hépatocellulaire. Ces souris sont déficientes pour un transporteur biliaire, multidrug resistance gene 2 (*mdr2*), entraînant une accumulation anormale de bile qui sera toxique au cours de la vie de l'animal. Ce modèle représente un modèle spontané qui évolue avec l'âge de l'animal²¹⁵.

6.c.5. La ligature du choléduque

La ligature du choléduque permet d'induire une fibrose sévère en quelques jours accompagnée d'une nécrose tissulaire importante. En moins d'un mois, les souris ayant reçu cette chirurgie développent une fibrose importante associée à une réduction massive du nombre d'hépatocytes²¹⁶.

6.c.6. L'administration d'alcool

L'hépatite acholique peut être facilement induite chez la souris par l'ajout d'éthanol dans l'eau de boisson. Les animaux développent une dépendance à l'alcool, menant à une altération du microbiome, à la translocation bactérienne, à la dérégulation du système immunitaire et à la rétention lipidique dans le foie similaire à ce qui est observé chez l'homme²¹⁷. Les produits bactériens, comme le LPS, la toxicité lipidique et la production de ROS entraînent l'activation des HSCs et à la progression de la fibrose²¹⁴.

6.c.7. Les modèles d'hépatite auto-immunes

Les modèles d'hépatite auto-immune sont basés sur des souris transgéniques pour l'expression d'un antigène spécifiquement sur les hépatocytes par insertion d'un transgène exprimant l'antigène sous le contrôle du promoteur à l'albumine spécifiquement exprimé par les hépatocytes. La majorité des modèles sont basés sur l'expression de l'ovalbumine ou de glycoprotéine hépatique, l'hépatite est ensuite induite par vaccination contre ce peptide. Les T-CD8, qui sont activés, induisent l'apoptose des hépatocytes exprimant l'ovalbumine. Ce qui induit une hépatite sévère avec augmentation de l'ALT plasmique et la progression de la fibrose²¹⁸. La Con-A est aussi utilisée comme modèle d'hépatite auto-immune.

6.c.8. Les modèles de diètes riches en graisse

La stéatose hépatique peut être induite chez la souris par l'utilisation de diète riche en graisse et en sucre (HFD, pour « high fat diet »). Il existe de nombreuses diètes riches en gras qui ont des propriétés différentes, le choix de la diète ainsi que du fond génétique des souris influent fortement sur les résultats²¹⁹. En effet, pour ce type d'études les C57BL/6 de type J qui ont une mutation dans le gène « Nicotinamide nucleotide transhydrogenase » (*Nmt*) important pour la fonction mitochondriale des cellules β pancréatiques, mène à une dérégulation du métabolisme du glucose homéostatique. De ce fait, les B6J sont communément utilisés pour les modèles HFD car elles sont plus susceptibles, même si les B6N se rapprochent plus de l'homme. La première génération de HFD utilisée pour l'étude de la fibrose hépatique était les diètes avec une déficience en choline et/ou méthionine (CDD et MCDD, respectivement) qui entraîne une forte toxicité hépatique et une fibrose importante en 12 semaines²²⁰. Cependant, malgré l'accumulation massive de graisse dans le foie, les souris recevant ces diètes déficientes en choline et/ou méthionine n'ont pas de syndrome métabolique et ont une perte de poids significative ne répliquant pas les symptômes humains associés à NASH²²¹. De ce fait, les diètes riches en gras et en fructose sont devenues le standard pour l'étude de la stéatose hépatique. La période d'induction est plus longue que pour les diètes CDD et MCDD, car il faut 15 semaines pour induire un état de stéatose sévère avec fibrose légère et 40 semaines pour une fibrose modérée²²². Cependant, ce type diète riche en gras et en fructose entraîne une dérégulation métabolique et un gain de poids semblable aux observations humaines. La supplémentation en cholestérol à 2% permet d'accélérer la progression du syndrome métabolique et de la fibrose de manière significative²²².

6.c.9. Les modèles d'hépatites virales

Les modèles murins d'hépatites virales sont très limités, du fait que les rongeurs ne peuvent être infectés par le VHC ou le VHB. On utilise donc des souris transgéniques exprimant le génome complet ou une protéine virale d'un virus hépatotropique comme le VHC ou VHB²²³. Ces modèles ne sont pas physiologiques, car l'expression des facteurs viraux est constitutive et il nécessite à être couplé à une autre source de dommage hépatique (alcool, toxine, diète) pour induire la fibrose. Il existe des modèles de souris avec un foie humanisé permettant d'être infecté avec des virus provenant de sérum de patients²²⁴. Cependant, les hépatocytes humains disparaissent avec le temps et ces souris ne sont pas immunocompétentes ce qui ne permet pas d'étudier la fibrose hépatique. Récemment, un virus avec tropisme hépatique murin a été isolé et permet d'établir une infection chronique si les lymphocytes T-CD4 sont éliminés pendant la phase aiguë de l'infection. Malgré cela, ce virus n'induit pas de dommages hépatiques suffisant pour induire la fibrose²²⁵.

6.c.10. Les souris transgéniques pour l'étude de la fibrose

Enfin, l'étude de la fibrose hépatique *in vivo* peut être facilitée par l'utilisation de souris transgéniques. Ces modèles permettent de marquer ou transformer spécifiquement les myofibroblastes en utilisant l'expression du PDGF- β -Rb¹¹⁴, les cellules responsables de la fibrose en utilisant l'expression du collagène de type I (*Colla1*) et les cellules stellaires en utilisant le marqueur astrocytaire GFAP¹⁰⁴ ou une enzyme liée au métabolisme de la vitamine A (*Lrat*)⁹⁹.

7. Modulation immunitaire de la fibrose hépatique

La fibrose hépatique se caractérise par l'accumulation pathogénique de collagène de type I, de type III et de fibronectine produit par des myofibroblastes menant à une perte progressive de la fonction hépatique, due à la dédifférenciation des hépatocytes et la désorganisation de l'architecture tissulaire¹. Pendant longtemps, la fibrose a été considérée comme une maladie non immunologique puisque les souris immunodéficientes sont capables de former une réponse fibrogénisante suite à des blessures chroniques^{54,226}. Cependant, une dérégulation immunitaire est observée dans tous les tissus fibrotiques laissant suggérer que ce procédé peut être induit, modulé et contrôlé par l'inflammation induite par le système immunitaire⁴. Dans cette section, nous allons d'abord discuter des trois différents types de réponses immunitaires et inflammatoires en abordant leur composition cellulaire et les cytokines associées. Puis nous discuterons du rôle de l'immunité

de type I, de type II et de type III dans la progression de la fibrose en spécifiant les mécanismes spécifiques à l'organe hépatique.

7.a. Les trois types d'immunité et d'inflammation

Le système immunitaire est complexe comprenant de nombreux types cellulaires qui contribuent à des fonctions différentes comme l'homéostasie, l'élimination des pathogènes intra- ou extracellulaires. Il agit par la sécrétion de cytokines, de chimiokines, d'anticorps ou par des fonctions cytotoxiques. Au fil du temps, notre vision sur le système immunitaire ainsi que sa complexité ont évolué menant à différentes classifications des réponses immunitaires. Le premier type de classification divise le système immunitaire en deux : la réponse innée et adaptative. La réponse innée qui regroupe les cellules immunitaires capables de combattre de nombreux pathogènes, mais restreintes à un répertoire limité ou invariant de récepteurs pour reconnaître les microorganismes. Tandis que la réponse adaptative regroupe les lymphocytes qui possèdent un récepteur spécifique à un antigène spécifique qui est généré au cours d'une infection. La réponse adaptative peut mener à une réponse immunologique mémoire permettant de protéger un individu pendant le cours de sa vie. Bien que cette classification récapitule principalement la chronologie des événements survenant suite à une infection. Elle néglige l'importance du système adaptatif à réguler et à orchestrer la réponse innée lors des insultes chroniques⁶⁶. La deuxième classification est basée sur la polarisation de la réponse T auxiliaire par les cytokines que ces cellules produisent. À l'origine, cette classification était divisée en deux : les réponses aux pathogènes intracellulaires qui nécessitent une réponse de type Th1 avec lymphocytes T-CD8 cytotoxiques⁴, et les pathogènes extracellulaires qui requièrent une réponse de type Th2 avec production d'anticorps par les lymphocytes B²²⁷. Cependant, la découverte des cellules T-CD4 régulatrices (Treg)²²⁸, ainsi que des nouvelles populations de lymphocytes T-CD4 spécialisées dans l'immunité bactérienne ou fongique, comme les Th17, les Th22 et les Th9, limitent fortement l'utilisation de cette classification dans les maladies inflammatoires complexes^{229, 230}. De ce fait, une nouvelle classification est apparue regroupant les réponses immunitaires par les cellules innées et adaptatives contribuant à une signature immunitaire et inflammatoire précise qui se divisent ainsi en trois groupes : I, II, III^{4, 66}. Cette nouvelle nomenclature bien qu'extrêmement utilisée en immunité inflammatoire ne représente pas une classification classique.

7.a.1. L'immunité de type I

L'immunité de type I est caractérisée par une réponse inflammatoire principalement induite par l'IFN- γ induite et orchestrée par les Th1 (Figure 13). Les autres cellules immunitaires associées à cette réponse sont les cellules NK, les NKT-1, les ILC-1, les T-CD8 et les monocytes pro-inflammatoires⁶⁶. *In vivo*, l'absence d'IFN- γ ou d'IL-12 une cytokine importante pour le développement de la réponse de type I mène à une réponse de type II aberrante^{222, 231, 232}. La réponse de type I est importante pour contrôler les infections contre les pathogènes intracellulaires. Cependant, cette réponse peut entraîner la nécrose tissulaire *via* ses propriétés inflammatoires importantes. D'ailleurs la dérégulation des réponses de type I est associée à la pathogenèse dans le diabète auto-immun et à l'inflammation du tissu adipeux lors de l'obésité qui participe ainsi à l'aggravation du syndrome métabolique^{4, 233}.

7.a.2. L'immunité de type II

L'immunité de type II est caractérisée par une réponse inflammatoire modérée induite principalement par l'IL-4, l'IL-13 et orchestrée par les Th2 (Figure 13). Les autres cellules immunitaires associées à cette réponse sont les monocytes anti-inflammatoires, les ILC-2, les NKT-2, les éosinophiles, les mastocytes et les lymphocytes B⁶⁶. L'inflammation de type II est essentielle pour la régénération tissulaire lors des insultes aiguës en régulant négativement l'inflammation de type I et en induisant une réponse réparatrice⁶. *In vivo*, l'absence d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 entraîne une réponse de type I aberrante^{160, 222, 231}. La réponse de type II est importante pour maintenir l'homéostasie dans le tissu adipeux et le poumon où elle permet l'induction d'IgE²³⁴. La perte de la réponse de type 2 dans le tissu adipeux entraîne la progression du syndrome métabolique²²². À l'inverse, dans le poumon une augmentation de la réponse type II est associée à la sévérité de l'asthme^{235, 236, 237}.

7.a.3. L'immunité de type III

L'immunité de type III est une réponse inflammatoire importante pour l'homéostasie des muqueuses induite par l'IL-17 et l'IL-22 orchestrées par les Th17 (Figure 13)^{7, 238, 239, 240, 241, 242}. Les cellules immunitaires associées à cette réponse sont les ILC-3, les monocytes pro-inflammatoires, les neutrophiles, les MAITs, les lymphocytes T- $\gamma\delta$ et les lymphocytes T-CD8 capables de produire l'IL-17 et l'IL-22 (Tc17)⁶⁶. La réponse de type III est essentielle pour contrôler les infections bactériennes et fongiques en permettant l'expression de « défensines » par

les cellules épithéliales^{243, 244}. Elle permet aussi le recrutement de cellules pro-inflammatoire par la sécrétion de chimiokines permettant d'éliminer ces pathogènes comme les neutrophiles⁶⁶. *In vivo*, l'absence d'IL-23 permet de limiter de manière importante la réponse de type III puisque cette cytokine est importante pour le développement et la stabilisation du phénotype des Th17 et des ILC-3^{245, 246, 247, 248}. L'immunité de type III est aussi importante pour combattre les infections virales²⁴⁹. Cette réponse essentielle est régulée pour maintenir un état d'homéostasie et l'intégrité tissulaire. Cependant, une dérégulation de la réponse de type III est virtuellement associée à la majorité des maladies inflammatoires humaines comme la colite, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, la sclérose en plaques, le diabète et l'asthme^{230, 250, 251, 252, 253, 254}. En effet, les propriétés pro-inflammatoires de l'IL-17 entraînent la production de chimiokines recrutant des cellules inflammatoires, la nécrose et des dommages tissulaires importants⁴.

Les différentes réponses inflammatoires sont essentielles pour notre organisme, nous permettant de combattre des infections et de maintenir un état d'homéostasie. Ces réponses sont, en condition normale, régulées pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Lors des insultes tissulaires, ces réponses doivent être induites pour limiter les dommages, puis régulées pour induire la régénération tissulaire et retournées à la normale. Ce mécanisme d'induction de l'inflammation est extrêmement efficace pour lutter contre les insultes tissulaires aiguës⁴. Cependant, lors des insultes chronique la balance inflammatoire et le retour à l'homéostasie n'est pas atteint entraînant ainsi des réponses anormales néfastes pour le tissu. Dans les prochaines sections, nous allons discuter de l'impact des réponses de type I, de type II et de type III dans la progression de la fibrose lors des insultes hépatiques chroniques.

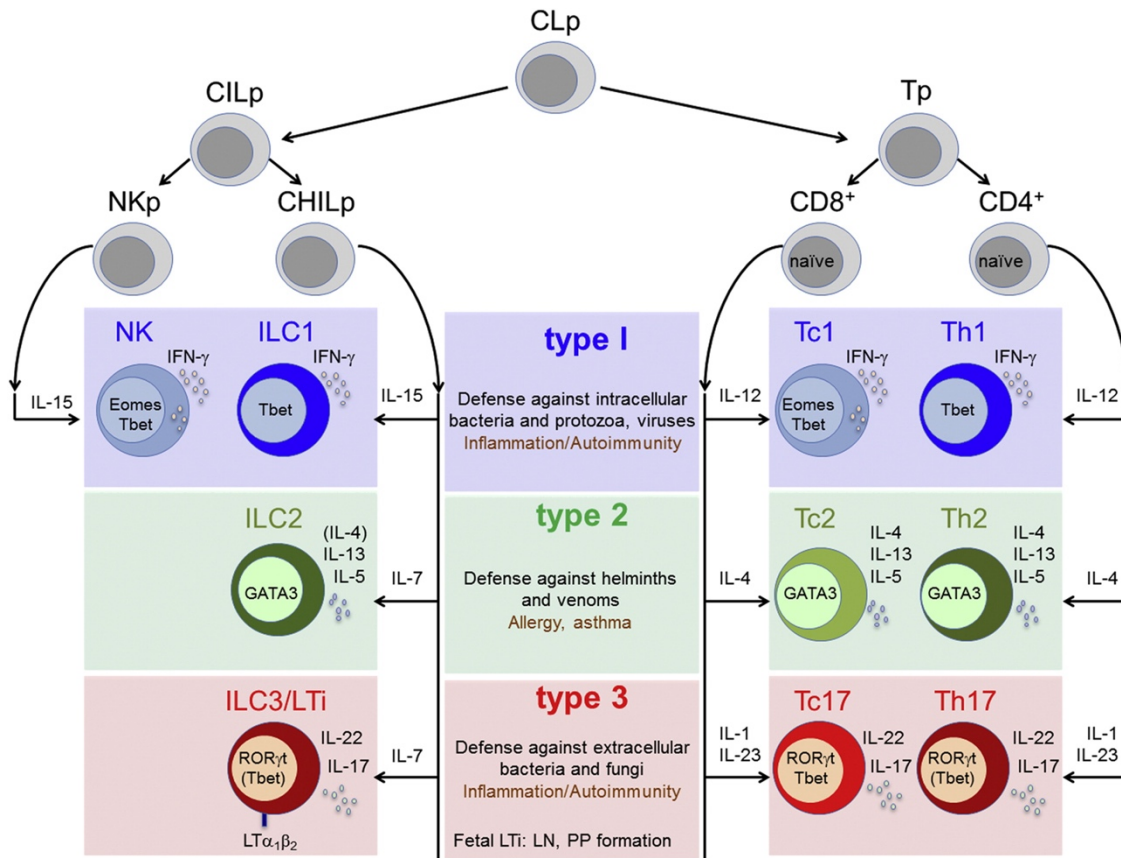


Figure 13. Les trois types d'immunité et d'inflammation

L'immunité de type I est caractérisée par la production d'IFN- γ produit par les ILC-1, les cellules NK, les Tc1 et Th1. Cette réponse inflammatoire, dépendante de l'IL-12 et l'IL-15, permet de lutter contre les pathogènes intracellulaires. L'immunité de type II est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 par les ILC-2, les Tc2, les Th2, les éosinophiles et les mastocytes. Cette réponse de régénération tissulaire, dépendante de l'IL-4, l'IL-7, l'IL-25 et l'IL-33, permet de lutter contre les pathogènes extracellulaires. L'immunité de type III est caractérisée par la production d'IL-17 et d'IL-22 produite par les ILC-3, les Tc17 et les Th17. Cette réponse inflammatoire, dépendante de l'IL-23, est importante pour l'immunité muqueuse pour lutter contre les bactéries et les infections fongiques. Figure issue de Annunziano et al. ⁶⁶.

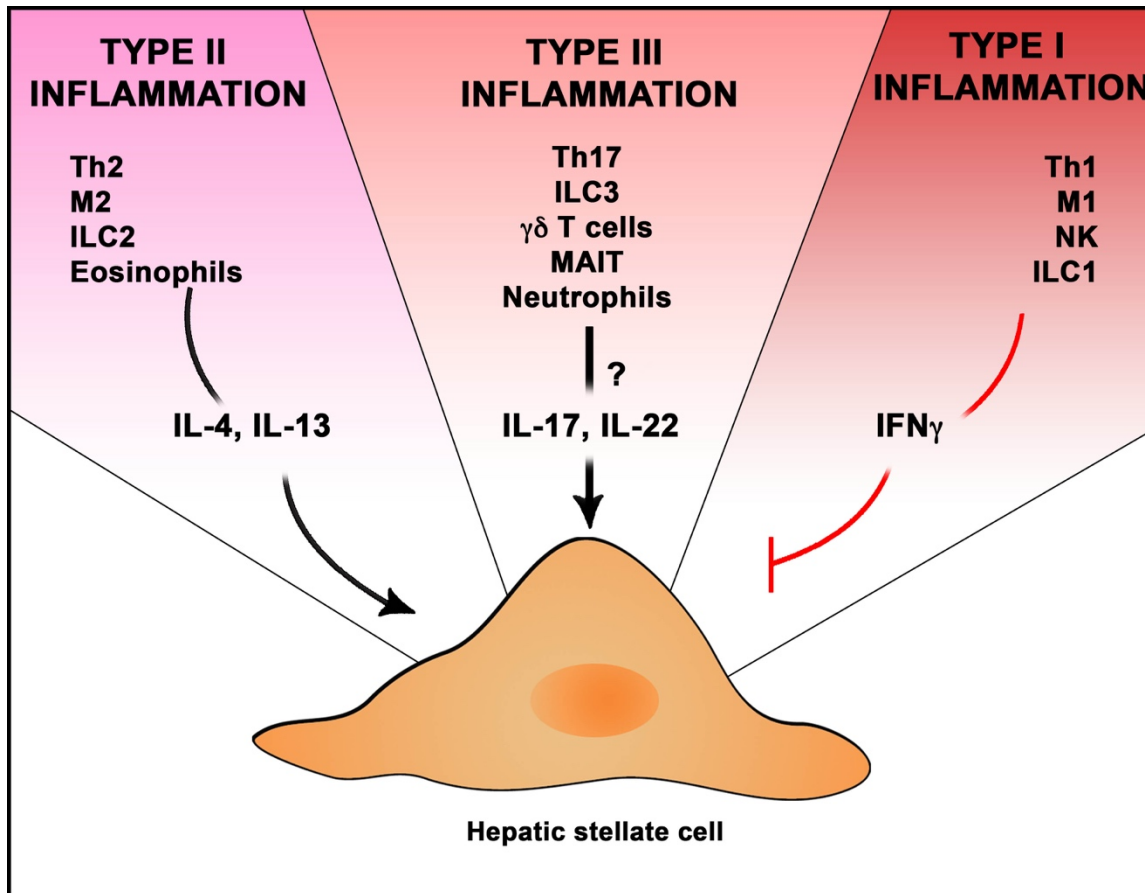


Figure 14. Rôle de l'immunité et de l'inflammation de type I, II et III dans la progression de la fibrose hépatique

L'immunité de type I induit une réponse inflammatoire, par la production d'IFN- γ , qui inhibe directement l'activation des HSCs. L'IFN- γ active aussi les cellules NK qui limitent la fibrose en éliminant les HSCs actives grâce à leur activité cytotoxique. L'immunité de type II induit une réponse inflammatoire, par la production d'IL-4 et d'IL-13, qui induit l'activation des HSCs. L'IL-4 et l'IL-13 induisent les M2 macrophages qui augmentent la fibrose en sécrétant du TGF- β et du PDGF. L'immunité de type III induit une réponse inflammatoire, par la production d'IL-17 et d'IL-22, qui induit la progression de la fibrose. L'IL-17 agit de manière indirecte en activant les monocytes. La fonction de l'IL-22 est encore peu explorée.

7.b. L'immunité de type I dans la progression de la fibrose

L'inflammation de type I est principalement caractérisée par la production d'IFN- γ qui malgré ces propriétés inflammatoires importantes possède des propriétés anti-fibrotiques²⁵⁵ (Figure 14 et 15). En effet, la réponse IFN- γ corrèle avec l'intensité des dommages hépatiques comme la mort hépatocytaire pouvant être mesurés par le niveau plasmique d'ALT. Cependant, l'IFN- γ est une molécule anti-fibrotique importante, car elle limite l'activation des qHSCs et la fonction des aHSCs en limitant la réponse au TGF- β ⁵. En effet, la liaison de l'interféron à la surface des HSCs induit la phosphorylation de STAT1 qui se relocalise ainsi dans le noyau où il réprime le promoteur du collagène de type I et induit l'inhibiteur de la signalisation au TGF- β : SMAD7¹³⁹. Les principales sources d'IFN- γ lors des insultes hépatiques chroniques sont les ILC-1, les cellules NK et NKT-1 ainsi que les Th1⁶⁶. L'IFN- γ est aussi important pour induire l'activité des cellules NK. Les NKs sont importantes pour contrôler la progression de la fibrose, car elle participe à l'élimination des aHSCs grâce à leur activité cytotoxique⁵⁴. En effet, les NKs sont activées suite à l'interaction du récepteur NKG2D avec le ligand NKG2DL fortement exprimé sur les HSCs actives ou sénescents¹⁴⁰. Cependant, la densité de l'ECM dans un foie fibrotique inhibe le contact cellulaire entre les NKs et les HSCs. De plus, les HSCs en produisant des TIMPs et des composants de la matrice extracellulaire limitent la motilité tissulaire des NKs qui est dépendant des MMPs³.

L'IFN- γ n'est pas la seule cytokine produite par la réponse de type I qui compte un nombre important de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α . Ces cytokines qui peuvent être produites par la majorité des cellules de la réponse de type I n'ont pas de propriétés anti-fibrotiques. Ces cytokines ne permettent pas de directement activer les HSCs, cependant elle contribue à la stabilisation du phénotype de myofibroblaste et donc à la persistance de la fibrose hépatique²⁵⁶. Lors des insultes aiguës, elles permettent le recrutement des monocytes pro-inflammatoire (M1) et des neutrophiles permettant l'élimination des débris cellulaires^{26, 93}. Cependant, l'exposition chronique à ces cytokines contribue à la prolongation d'un état inflammatoire, induit principalement par les M1, entraînant la nécrose tissulaire qui favorise l'activation des HSCs et la progression de la fibrose *via* la présence de ROS et de corps cellulaire dans l'environnement hépatique⁵². De plus, l'IFN- γ contribue aussi à augmenter cette réponse nécrotique menant à une production accrue de TGF- β induisant la fibrose^{4, 231}. Ce concept a été démontré et prouvé récemment par l'utilisation de souris déficiente pour la réponse de type I (IFN-

γ knockout), la réponse de type II (IL-13 knockout) et pour les deux réponses (IFN- γ , IL-13 knockout). En l'absence d'IFN- γ une fibrose sévère est observée tandis qu'une fibrose réduite est observée dans les souris déficientes pour l'IL-13. Les souris doubles *knockouts* sont quant à elle protégées avec une fibrose faible²³¹. L'administration d'anticorps neutralisant contre le TGF- β chez les souris déficientes pour le type I permet d'éliminer la fibrose. Ceci démontre qu'une réponse de type I dérégulée peut devenir pathogénique par l'induction de la voie profibrotique du TGF- β .

Lors de la stéatose hépatique, le syndrome métabolique (diabète et inflammation adipocytaire) est associé à une dérégulation positive de la réponse de type I. Il est donc supposé que la réponse de type I induit un état inflammatoire dans le foie favorisant la lipotoxicité hépatocytaire menant à l'activation des HSCs par les mécanismes décrits précédemment. De plus, les cytokines de type I comme l'IFN- γ et le TNF- α favorisent l'expression des TLR-2 et TLR-4 sur les monocytes pro-inflammatoires du foie ainsi que sur les HSCs^{112, 173}. Ceci entraîne une réponse accrue au LPS provenant de l'intestin menant à la production d'IL-1 β , d'IL-6 par les monocytes et à une diminution de l'expression du récepteur inhibiteur au TGF- β , BAMBI qui augmente l'activation des HSCs¹¹².

En conclusion, bien que l'immunité de type I est principalement associée à une réponse anti-fibrotique principalement induite par l'IFN- γ et l'activité cytotoxique des cellules NKs, elle nécessite d'être proprement régulée à défaut d'entraîner une réponse pathogénique par l'induction de nécrose⁴. Cette réponse est fortement régulée par l'inflammation de type II, et le dogme actuel, qui commence à être réfuté, est que la progression de la fibrose est une balance entre la réponse de type I et de type II.

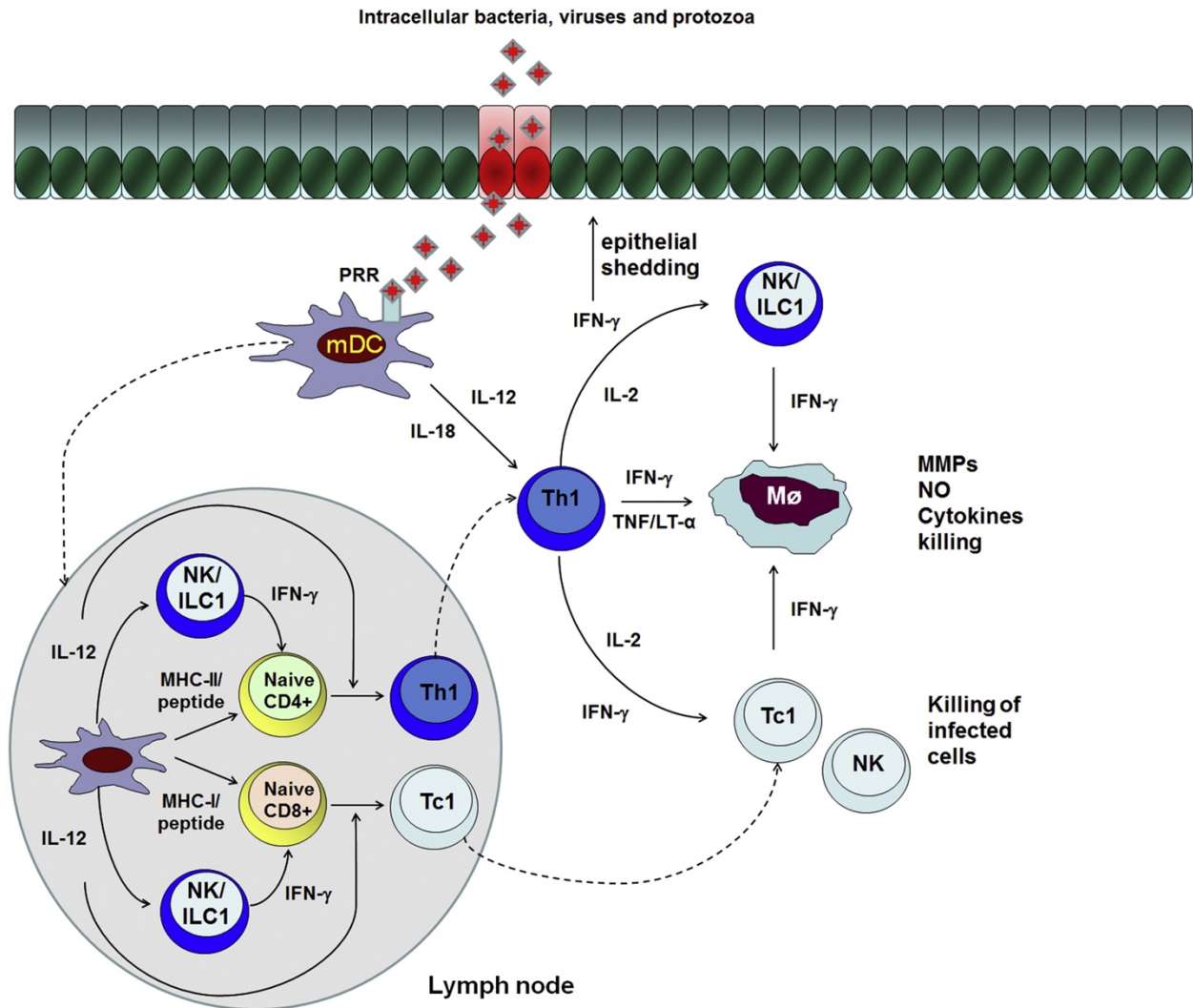


Figure 15. L'immunité de type I : une réponse anti-fibrotique et nécrotique.

En réponse à des insultes tissulaires, l'activation des APCs entraîne la production d'IL-12 et d'IL-18 qui permettent l'induction des ILC-1 et des Th1. La sécrétion d'IFN-γ active les cellules NK qui limitent l'activation des HSCs. L'IFN-γ induit aussi l'activation de macrophages pro-inflammatoires qui contribuent à l'élimination des débris et à la réorganisation de la matrice extracellulaire. La persistance de cette réponse induit la nécrose tissulaire. Figure issue de Annunzianto et al. ⁶⁶.

7.c. L'immunité de type II dans la progression de la fibrose

La réponse de type II est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 qui sont majoritairement produites par les éosinophiles, les mastocytes, les ILC2 et les Th2 (Figure 14 et 16)⁶⁶. Ces cytokines agissent sur le système immunitaire et sur les HSCs pour induire une réponse fibrotique qui peut être indépendante du TGF- β ²⁵⁷. L'inflammation de type 2 est principalement induite par la production d'IL-25, d'IL-33 et de « thymic stromal lymphopoietin » (TLSP) par les cellules épithéliales en réponse à une insulte²⁵⁸. Ces cytokines entraînent l'activation des ILC2, qui produisent de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13, ainsi que des cellules dendritiques entraînant un phénotype favorisant la différenciation des cellules T naïves en type Th2^{259, 260}. L'IL-33 et TLSP favorisent aussi l'activation des mastocytes qui sont une source importante d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 pendant les réponses de type II⁶⁶. Les mastocytes induisent la production d'IgE, en réponse à ces mêmes cytokines, menant au développement de l'asthme^{261, 262}. Les mastocytes sont importants pour la progression de la fibrose hépatique dans de nombreux modèles d'insultes hépatiques, mais leur action est principalement induite par les cytokines et non la sécrétion d'IgE²⁶³. L'IL-5 est importante pour l'activation des éosinophiles qui sont eux aussi une source importante d'IL-4 et d'IL-13^{264, 265}. Le rôle des éosinophiles lors de la fibrose pulmonaire est évident, mais celui dans le foie est encore limité aux infections parasitaires et à la cirrhose biliaire primaire^{264, 266}. Lors de la fibrose, une fonction importante de l'IL-4 et l'IL-13 est d'induire l'activation des myofibroblastes indépendante du TGF- β ^{6, 257}. Ces deux cytokines sont capables d'entraîner la synthèse de collagènes, de MMPs et de TIMPs par les HSCs⁶. D'ailleurs les myofibroblastes activés par l'IL-4 et l'IL-13 ont une signature différente qui se caractérise par la production de composant de la matrice extracellulaire spécifique comme la périostine et le collagène de type 6^{231, 258}. De plus, les myofibroblastes en réponse aux cytokines de type II sécrètent un récepteur soluble inhibiteur l'IL-13RA2 qui agit comme un leurre pour l'IL-13. Ce mécanisme de régulation nécessite aussi l'IL-10 et il est important pour la résolution de la fibrose en agissant comme une boucle de régulation négative^{267, 268}.

L'IL-4 et l'IL-13 agissent aussi sur les monocytes et les macrophages, qui expriment fortement les récepteurs IL-4RA et IL-13RA1, et induisent avec l'aide de l'IL-10 leur différenciation en macrophage alternativement activé avec un phénotype régulateur (M2c ou

Mreg)⁵². Les Mregs, caractérisés par l'expression d'arginase-1, sont importants pour la régénération permettant dans un premier temps d'entraîner la sécrétion de matrice extracellulaire. Dans un deuxième temps, ils limitent la réponse inflammatoire par la sécrétion d'IL-10 qui inhibe les macrophages pro-inflammatoires, mais aussi les HSCs²⁶⁹. L'absence de M2 dans le foie et le poumon entraîne une progression anormale de la fibrose. Cependant, lors des insultes hépatiques chroniques, les monocytes et les macrophages ne peuvent pas se différencier en Mreg par manque de réponse à l'IL-10. Ces monocytes ont donc un phénotype alternatif (M2a). En réponse à l'IL-4 et l'IL-13, ils produisent les principaux facteurs profibrogéniques tels que le CTGF, le PDGF, le VEGF et le TGF- β qui induisent l'activation des HSCs^{270, 271, 272, 273}. En conclusion, les cytokines de type 2 sont importantes pour contrôler la balance entre les M1 et les M2 pouvant ainsi amplifier le processus de fibrose.

L'IL-9 est une cytokine faisant partie de la réponse de type II qui est produite par les lymphocytes T-CD4 de type Th9. Les Th9, une sous population de Th2, se développent suite à la signalisation du TGF- β ²⁷⁴. Ils sont caractérisés par l'expression d'IL-4 et d'IL-9. L'IL-9 est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines comme la sclérose en plaques, la colite, l'arthrite et l'inflammation pulmonaire^{274, 275, 276}. La fonction de l'IL-9 dans la progression de la fibrose hépatique est pour le moment limitée à une étude montrant son importance dans les bilharzioses causées par *Schistosoma japonicum*²⁷⁷. Cependant, l'IL-9 est associé à la différenciation et au recrutement des lymphocytes Th17 dans la colite et la sclérose en plaques, ce qui pourrait entraîner un environnement inflammatoire mixte composé d'une réponse de type II et de type III²⁷⁶. Ces réponses mixtes ont aussi été associées à la pathogenèse dans le poumon.

En conclusion, l'immunité de type II est importante pour orchestrer la régénération tissulaire lors des insultes aiguës en induisant l'activation des monocytes et des macrophages avec un phénotype réparateur. Cependant, l'activation chronique de la réponse de type II entraîne une boucle régulation positive de la fibrose par l'induction massive de facteurs profibrotiques comme le TGF- β produits par les M2. De plus, les cytokines de type II à l'exception de l'IL-5 contribuent à l'activation directe des HSCs favorisant ainsi la progression de la fibrose.

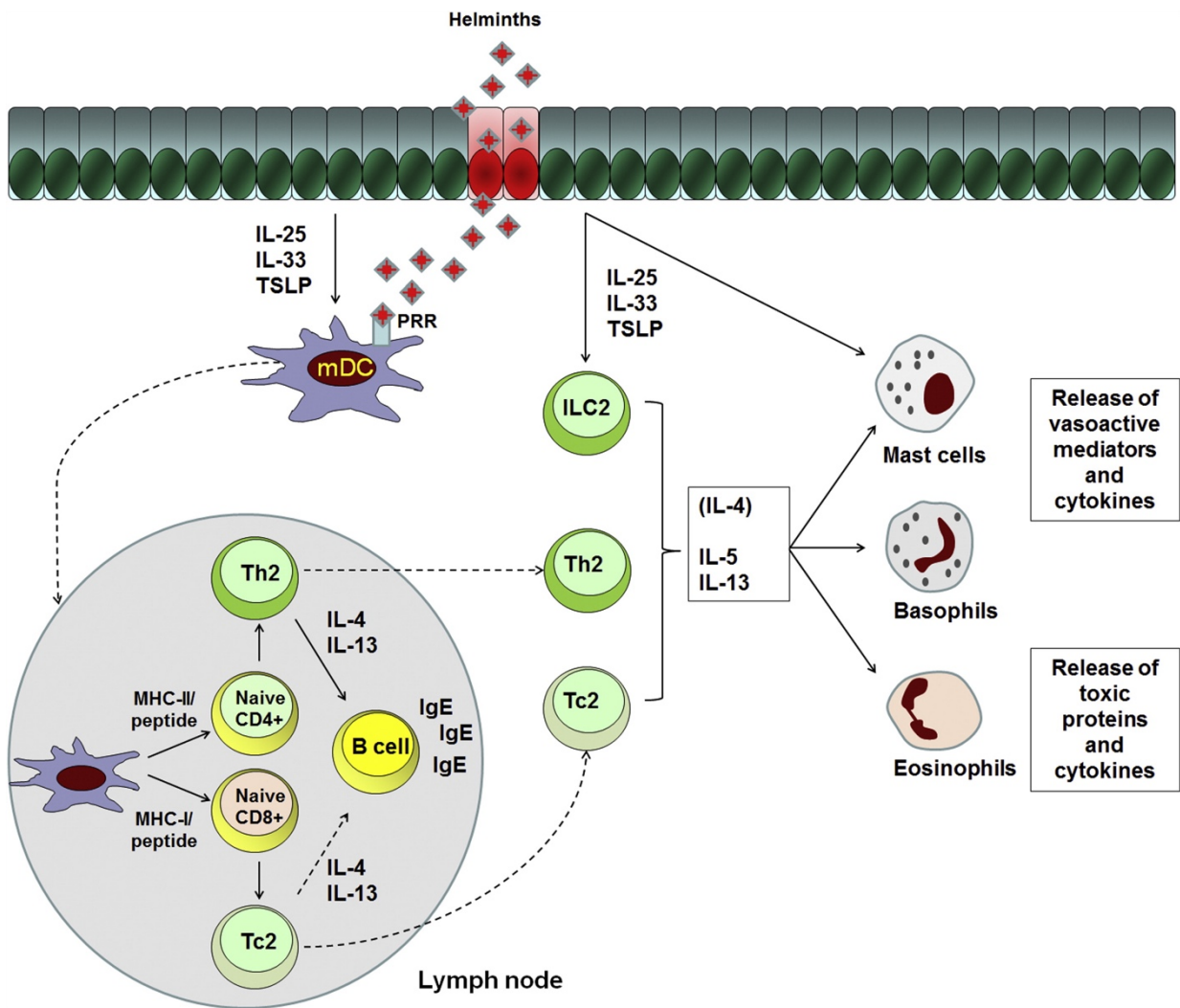


Figure 16. L'immunité de type II : une réponse de régénération tissulaire

Suite à des lésions, les cellules épithéliales produisent de l'IL-25, l'IL-33 et TSLP qui mènent à l'activation des ILC-2, des Th2, des mastocytes, des basophiles et des éosinophiles. L'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 par les ILC-2 et les Th2 amplifient l'activation des mastocytes et des éosinophiles. L'IL-4 et l'IL-13 activent les cellules B, induisent la différenciation des macrophages en M2 et activent les HSCs. Figure issue de Annunziano et al. ⁶⁶.

7.d. L'immunité de type III dans la progression de la fibrose

L'immunité de type III est caractérisée par la production d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 principalement produites par les Th17, les ILC3, les T $\gamma\delta$, les MAITs (Figure 14 et 17) ⁶⁶. Récemment, il a été reporté que les neutrophiles sont aussi capables de produire les cytokines de type III incluant l'IL-17A et l'IL-22 ^{278, 279}. Les Th17 orchestrent la réponse de type III et sont induits par les cytokines inflammatoires suivantes l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-23 en combinaison avec le TGF- β ²⁸⁰. L'IL-23 permet de stabiliser le phénotype de ces cellules ainsi que d'induire l'expression de l'IL-22. L'IL-1 β et l'IL-6 induisent la phosphorylation de STAT3 dans les T naïfs qui permet la transcription du facteur de transcription ROR γ t et de l'IL-23R. L'IL-23 active ensuite STAT3 et STAT4 qui avec à l'activation de la voie SMAD induite par le TGF- β permet la pleine différenciation des Th17 ²³⁰. ROR γ t est essentiel pour la production de l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22, bien que l'IL-22 nécessite aussi le facteur AHR ^{281, 282, 283, 284}. Il est important de noter que les Th17 peuvent se différencier en Tregs et vice versa. Ce phénomène, appelé plasticité, a été démontré *in vivo* en utilisant des modèles murins avec un rapporteur de destinée, et il dépend de la signalisation au TGF- β et du facteur de transcription AHR ²⁸⁵. Les cellules de l'immunité de type III sont généralement enrichies dans les muqueuses comparativement à la périphérie. L'organe hépatique est particulièrement riche en Th17, en MAIT et en lymphocytes T $\gamma\delta$. Les Th17 hépatiques sont aussi plus propices à produire l'IL-17A et l'IL-22 en combinaison ²⁸⁶. Les Th17 sont associés à la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires chez l'homme comme la colite, la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis par des effets principalement dépendant de l'IL-17A ^{7, 287, 288}.

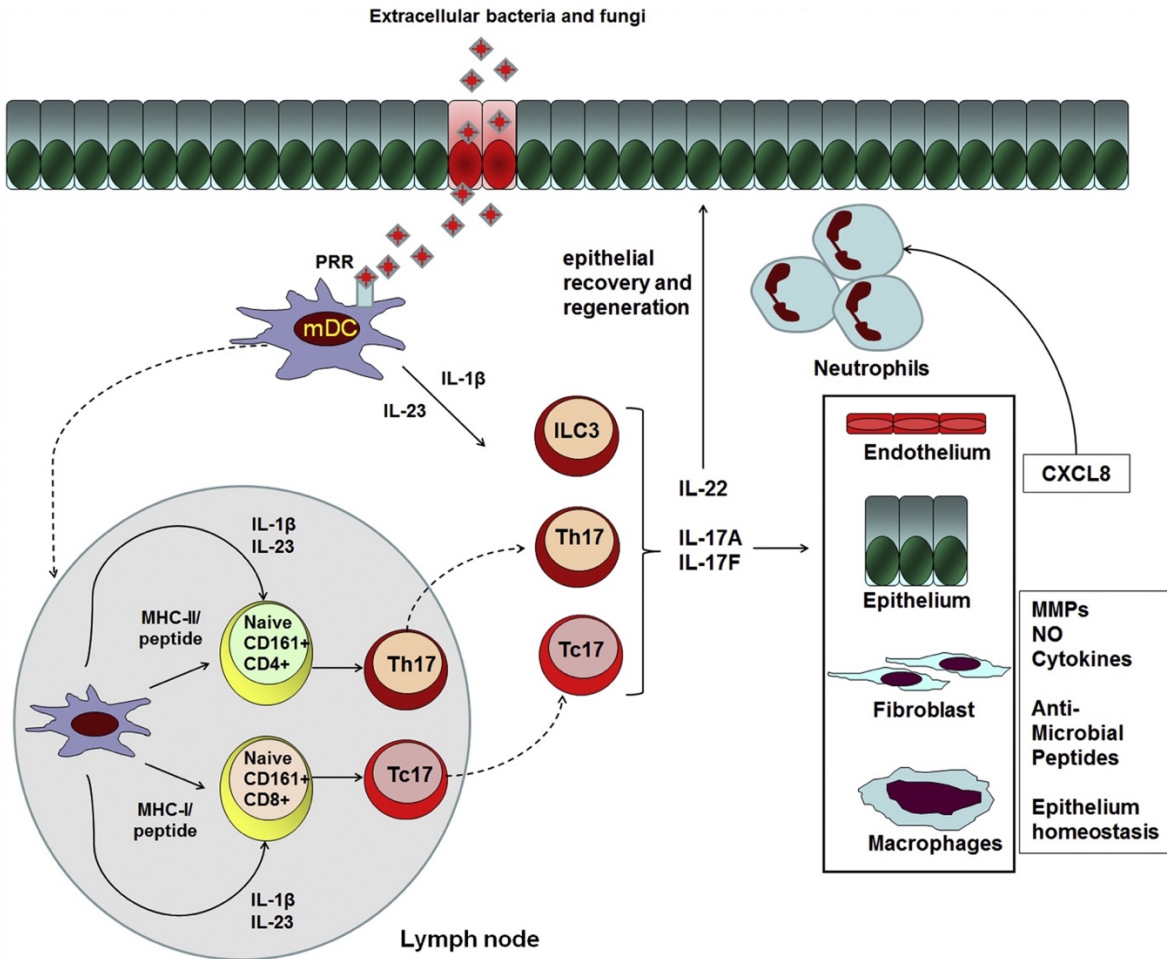


Figure 17. L'immunité de type III : une réponse inflammatoire et profibrotique

L'immunité de type III est induite par l'IL-1β et l'IL-23 produites par les DCs en réponse à des DAMPs et PAMPs. Ceci entraîne la différenciation des Tc17 et Th17 qui expriment fortement CD161 et qui produisent l'IL-17A, l'IL-17F et l'IL-22. L'IL-1β et l'IL-23 activent aussi les ILC-3. L'IL-17A et l'IL-17F induisent une réponse pro-inflammatoire chez les macrophages, l'épithélium et les neutrophiles menant à la sécrétion de défensines. L'IL-17A induit aussi la sécrétion de TGF-β par les macrophages et l'activation des fibroblastes. L'IL-22 agit sur les cellules épithéliales et les fibroblastes uniquement. Elle induit des signaux de survie et de prolifération indispensables pendant les insultes tissulaires. Figure issue de Annunzianto et al.

7.d.1 L'interleukine 17

L'IL-17 est une famille de cytokine majoritairement pro-inflammatoire composée de 6 membres : l'IL-17A, l'IL-17B, l'IL-17C, l'IL-17D, l'IL-17E (ou IL-25) et l'IL-17F²⁸⁹. Ces cytokines signalent par un récepteur hétérodimérique composé d'une chaîne spécifique et d'une chaîne commune l'IL-17RC. L'IL-17A et l'IL-17F sont les deux cytokines de la famille produite par la réponse de type III et elles signalent par le récepteur IL-17RA/IL-17RC²⁸⁹. Ce récepteur est exprimé sur les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les monocytes²⁸⁹. L'IL-17B est exprimé constitutivement dans de nombreux organes, mais sa fonction est encore inconnue. L'IL-17C est une alarmine produite par les cellules épithéliales en réponse à l'inflammation et aux infections bactériennes induisant la production de défensines et de peptides antimicrobiens par l'épithélium²⁹⁰. La fonction de l'IL-17D est inconnue. L'IL-17E ou IL-25 est une cytokine de l'immunité de type II importante pour l'activation des ILC2, des Th2, des éosinophiles et des mastocytes (Figure 15). L'IL-17A et l'IL-17F induisent des gènes similaires *via* l'activation des voies de signalisation STAT3, MAPK (p38, JNK) et NFκB qui sont associés à la progression de la fibrose hépatique^{291, 292, 293, 294}. La fréquence des cellules IL-17⁺ corrèle positivement avec la progression de la fibrose lors de l'infection par le VHB ou lors des hépatites alcooliques²⁹⁵. L'origine de ces cellules IL-17⁺ dans le foie varie selon les études à cause des différentes techniques employées, et demeure une question ouverte dans le domaine. Les principales sources d'IL-17A hépatique associé à la progression de la fibrose regroupent les neutrophiles, les MAITs, les T γδ et les Th17.

L'IL-17A est une cytokine profibrotique qui agit sur les hépatocytes, les monocytes, les macrophages et les HSCs lors de la fibrose hépatique^{293, 296}. Une fonction importante de cette cytokine est l'induction de chimiokines (IL-8, GROα et CXCL10) par les hépatocytes, les monocytes et les HSCs qui entraînent le recrutement hépatique de cellules pro-inflammatoires (neutrophiles, monocytes et Th17)^{293, 297}. Cette boucle de régulation positive de recrutement cellulaire est importante pour l'amplification de la réponse de type III et la progression de la pathogenèse. L'IL-17A induit la sécrétion d'IL-1β, d'IL-6 et de TNF-α par les monocytes et les neutrophiles dans un mécanisme dépendant de l'activation de STAT3²⁹³. De plus, l'IL-17A induit la production de TGF-β par les monocytes hépatiques amplifiant l'activation des HSCs⁶.

Les études sur les HSCs humaines ont révélé que l'IL-17A ne possède pas d'effet direct sur l'activation des HSCs, contrairement à ce qui est observé chez les HSCs murines²⁹⁷. *In vivo* les souris déficientes pour l'IL-17RA, démontrent une fibrose réduite comparativement à des souris WT dans les modèles de toxines, de ligature du cholédoque et de diète riche en gras prouvant ainsi une fonction profibrotique de cette cytokine^{293,298}. Enfin, la fonction profibrotique de l'IL-17A a aussi été validée dans de nombreux organes incluant la peau, le poumon et le rein⁶.

7.d.2. L'interleukine 22

L'IL-22 est une cytokine énigmatique appartenant à la famille de l'IL-10 comprenant l'IL-19, l'IL-20, l'IL-24, l'IL-26 et l'IL-28²⁹⁹. L'IL-19, L'IL-20 et l'IL-28 peuvent être produites par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les monocytes. L'IL-10, l'IL-22, l'IL-24 et l'IL-26 sont produites par les cellules du système immunitaire. L'IL-10 est produite par une variété de cellules immunitaires (DCs, monocytes, lymphocytes T et lymphocytes B), et possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-fibrotiques importantes qui induisent l'apoptose des HSCs actives^{299, 300}. L'IL-24 est une cytokine produite majoritairement par les Th2, et son expression est limitée à la peau³⁰¹. L'IL-26 et l'IL-22 font partie de la réponse de type III et elles sont produites par les Th17, et dans le cas de l'IL-22 par les ILC3s et certaines populations de neutrophiles^{278,302,303,304}. L'IL-22 signale *via* un récepteur hétérodimérique constitué de la chaîne IL-10RB, commune à la famille de l'IL-10, et de la chaîne IL-22RA1³⁰⁵. Ce récepteur est uniquement exprimé sur les cellules épithéliales et les fibroblastes. L'IL-22 est capable d'activer la voie STAT3 et de manière non canonique les MAPKs³⁰⁶. L'IL-22 est importante pour l'homéostasie des muqueuses en induisant la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales^{307,308}. L'IL-22 peut avoir des propriétés pro- ou anti-inflammatoires selon la composition de l'environnement. Sa fonction est principalement modulée par le TNF- α et l'IL-17³⁰⁹. En effet, il a été démontré qu'en absence d'IL-17 l'IL-22 a une fonction bénéfique anti-inflammatoire lors des insultes pulmonaires, mais en présence d'IL-17 elle contribue à l'inflammation et à l'induction de la fibrose³⁰⁹. Lors des insultes hépatiques et intestinales aiguës, l'IL-22 exerce une fonction protectrice pour le tissu en activant la voie STAT3 qui favorise la survie des cellules épithéliales via l'expression des molécules anti-apoptotiques BCL-XL et BCL-2³¹⁰. De plus, elle induit la prolifération des cellules épithéliales permettant de régénérer le tissu. Enfin, par le même effet elle réduit

l'inflammation tissulaire. On considère donc que l'IL-22 est une cytokine hépatoprotectrice. Comme l'IL-13, la fonction de l'IL-22 est modulée par la sécrétion d'un récepteur inhibiteur soluble l'IL-22RA2 ou « IL-22 binding-protein » (IL-22BP)^{311, 312}. L'IL-22BP est principalement produite par les DCs, mais aussi par les lymphocytes T et les éosinophiles. Lors des insultes tissulaires les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) répriment l'expression de ce leurre^{311, 313}. Au même moment, l'inflammation induit l'activation de la réponse de type III et la sécrétion d'IL-22. Ce processus est important pour contrôler la durée de la signalisation à l'IL-22 pour permettre une régénération tissulaire. *In vivo*, l'absence d'IL-22BP entraîne une réponse de guérison anormale pouvant induire le carcinome via l'exposition chronique à l'IL-22³¹¹. Dans le foie, des fonctions pro- et anti-fibrotiques ont été reportées selon le modèle utilisé. La surexpression de l'IL-22 dans le foie réduit la fibrose en induisant la sénescence des HSCs *via* l'activation de STAT3 qui induit la voie SOCS3/p21³¹⁴. À l'exception de cette étude, la voie STAT3 n'a jamais été associée à l'induction de la sénescence³⁰⁶. Une autre étude a montré en utilisant des souris IL-22 knockouts que l'IL-22 contribue indirectement à l'induction de la fibrose par le recrutement accru des Th17 en induisant la production de CXCL10 et CCL20 par les HSCs^{223, 315}. Cet effet est quant à lui induit par les MAPKs. À ce jour, la fonction de l'IL-22, dans la progression de la fibrose, n'a toujours pas complètement été élucidée.

En conclusion, la réponse de type III est associée à une forte inflammation tissulaire capable de s'intensifier par l'induction de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires. La fonction de l'immunité de type III dans la progression de la fibrose hépatique réside principalement sur l'étude de la fonction de l'IL-17. La fonction des autres cytokines de type III, comme l'IL-22 dans la progression de la fibrose reste à mieux élucider. Finalement, les sources, la présence et la contribution de l'inflammation de type III vis-à-vis de l'inflammation de type I et de type II dans les maladies fibrogénisantes hépatiques d'origines variées restent à déterminer.

7.e. Régulation de l'inflammation par les T régulateurs et fonction dans la progression de la fibrose hépatique

La fibrose est la conséquence d'une inflammation chronique, les cellules ayant des propriétés immunorégulatrices contribuent donc à limiter la progression de la maladie. Il existe de nombreuses cellules immunitaires pouvant contrôler la réponse immunitaire et par extension

l'inflammation. Dans le contexte de la fibrose, les principales cellules régulatrices sont les Mregs, les Tregs et probablement les Tr1^{52, 316, 317, 318}. La fonction anti-fibrotique de ces cellules peut être directe *via* la sécrétion d'IL-10 qui inhibe les HSCs³⁰⁰. L'IL-10 agit aussi comme cytokine immunosuppressive limitant l'activation des lymphocytes T qui indirectement réduit l'inflammation en diminuant la sécrétion de cytokines^{319, 320}.

Les Tregs sont des lymphocytes T-CD4 spécialisés dans le contrôle de la réponse immunitaire. Ils sont caractérisés par l'expression du récepteur à l'IL-2 (CD25) et l'expression du facteur de transcription FOXP3³²¹. La découverte de FOXP3 en 2000 a été possible *via* des recherches menées par l'armée américaine lors de la guerre froide. En effet, la peur d'une attaque nucléaire et des effets néfastes des radiations a entraîné la recherche intensive sur ce sujet dans les années soixante. En irradiant des souris, les chercheurs ont généré une lignée, appelée « scurfy », qui souffre de maladies auto-immunes importantes³²². Le séquençage du génome des souris scurfy a permis l'identification d'une mutation dans le gène codant pour FOXP3. Cette mutation entraîne une perte de fonction des Tregs qui ne pouvant supprimer les réponses immunitaires contre le soi, mène à des pathologies auto-immunes³²².

Les Tregs peuvent être induits (iTreg) lors des réponses inflammatoires par la sécrétion de TGF- β qui permet l'expression de FOXP3³²³. Les iTregs diffèrent des Tregs développés dans le thymus (nTreg, pour « natural Treg ») qui sont les plus importants pour limiter les réponses auto-immunes³²³. L'expression du facteur Helios est exclusive au nTreg ce qui permet donc de différencier ces deux populations³²⁴. Les Tregs peuvent être considérés comme le couteau suisse de la réponse immunitaire, car ils sont capables de réprimer les réponses inflammatoires par de nombreux mécanismes. Premièrement par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme le TGF- β et l'IL-10³²⁵. Deuxièmement, par l'expression de ligands pour de nombreux points de contrôles immunitaires comme PD-L1. Troisièmement, ils agissent comme éponge à l'IL-2 grâce à la forte expression du CD25 limitant ainsi l'accès à cette cytokine homéostatique pour les autres lymphocytes³²⁶. Quatrièmement, ils possèdent une activité cytotoxique pouvant éliminer les cellules effectrices³²⁷. Cinquièmement, la sécrétion d'exosomes contenant de micro-ARN capables d'inhiber l'expression de molécules effectrices chez les autres lymphocytes³²⁸. Finalement les Tregs expriment des ectonucléotidases, CD39 et CD73, qui permettent l'hydrolyse de ATP en cAMP, puis en adénosine libre, qui en se liant à son récepteur induit l'inactivation des cellules effectrices³²⁹.

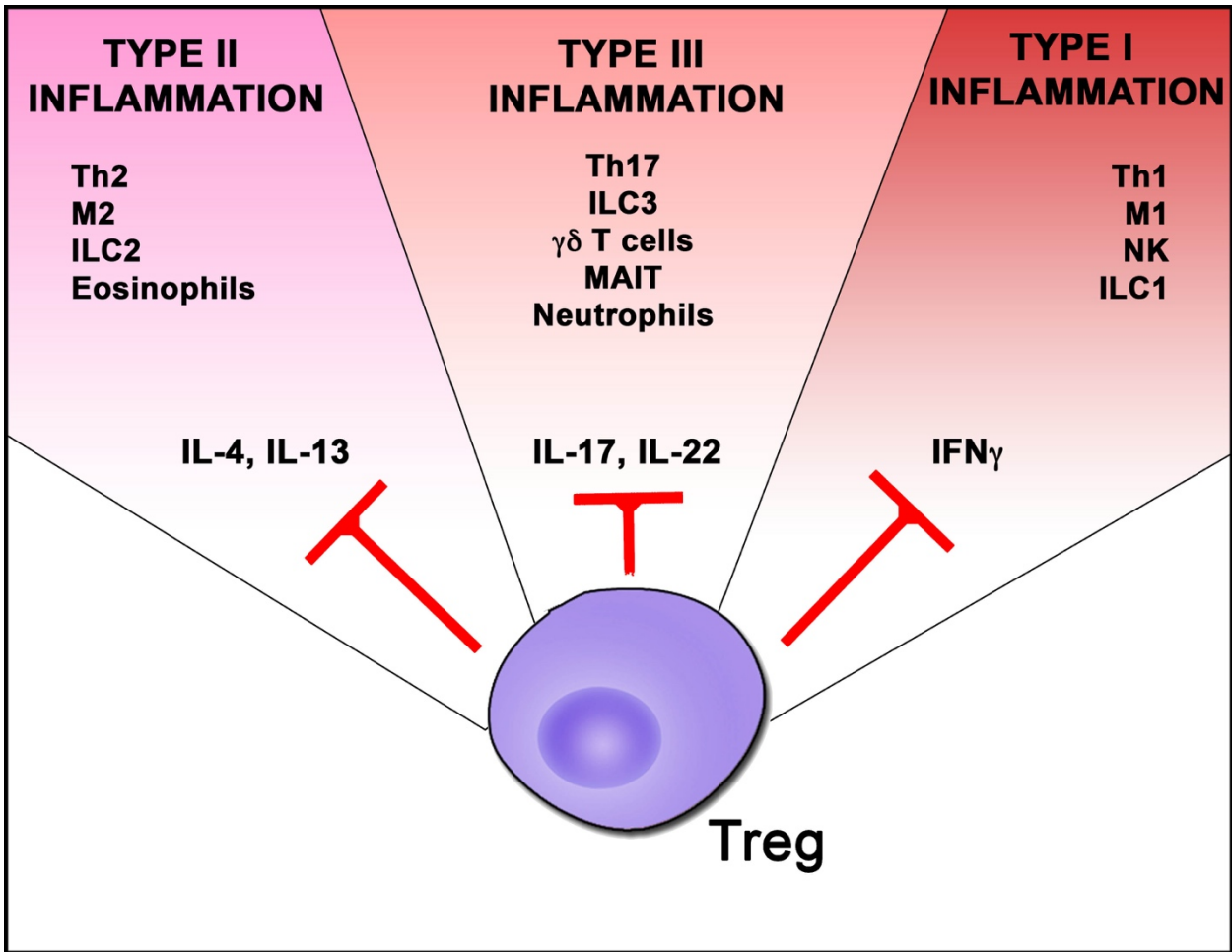


Figure 18. Modulation de l'inflammation par les T-CD4 régulateurs

Les Tregs contrôlent les réponses inflammatoires et donc indirectement la progression de la fibrose. Les Tregs peuvent agir par la sécrétion de cytokines, l'expression de molécules inhibitrices, la sécrétion d'exosomes, leur activité cytotoxique et l'expression d'ectonucléotidases.

L'ensemble de ces mécanismes permet donc de moduler négativement l'inflammation et peut donc limiter la progression de la fibrose (Figure 18). De plus, la sécrétion d'IL-10 peut directement limiter l'activation des cellules stellaires³⁰⁰. De plus, la progression de la pathogenèse, dans de nombreuses maladies inflammatoires, est associée à une dérégulation du ratio entre les cellules effectrices, principalement les Th17, et les Tregs^{330, 331}. Cependant, des études récentes ont démontré que les Tregs sont associés à la progression de la fibrose hépatique lors de l'infection par le VHC. Les Tregs protègent les HSCs actives en inhibant de l'action cytotoxique des NKs *via* l'expression de CTLA-4³³². De plus, ces Tregs intrahépatiques induits lors de l'infection sécrètent de l'IL-8, du TGF- β et expriment « Glycoprotein A repetitions » (GARP) qui permet l'activation du TGF- β ³³³. Les HSCs actives sont aussi capables d'induire la différenciation des T-CD4 naïfs en iTreg, ce qui semble jouer un rôle critique dans la persistance des infections chroniques hépatiques^{20, 21}. Ensemble ces résultats suggèrent que les HSCs actives utilisent les Tregs pour persister dans le foie menant à la progression de la fibrose hépatique.

Les cellules Tr1 sont des T-CD4 anti-inflammatoires induites lors de l'inflammation par l'IL-27 et l'IL-10^{334, 335}. Ils sont caractérisés par l'expression membranaire de CD49b et « leukocyte antigen-G 3 » (LAG-3) ainsi que l'expression transitoire de FOXP3 lors de leur différenciation³³⁶. La fonction de ces cellules est dépendante de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β , qui limite l'activation des APCs³¹⁶, mais aussi de leur activité cytotoxique dirigée contre les cellules myéloïdes. Ils confèrent ainsi une mémoire anti-inflammatoire tissulaire visant à limiter les réponses pouvant endommager le tissu lors d'insultes tissulaires chroniques. La fonction des Tr1 lors de la fibrose hépatique est inconnue, mais leur capacité à limiter l'inflammation, à inhiber les Th17 et à sécréter l'IL-10 pourrait contribuer à limiter la progression^{316, 335}.

En conclusion, la balance entre les signaux pro- et anti-inflammatoire contrôle la progression et l'arrêt de la réponse régénérative tissulaire. Si les signaux pro-inflammatoires persistent et dépassent les signaux anti-inflammatoires, la réponse de régénération tissulaire continue et mène à la progression de la fibrose. Si les signaux anti-inflammatoires deviennent majoritaires, le processus de fibrose s'arrête pour laisser place à la résolution et au retour à l'homéostasie. Cette balance est très bien contrôlée lors des insultes aiguës. Lors des insultes chroniques, la réponse pro-inflammatoire continue brise ce processus biologique menant ainsi à une réponse pathogénique. Ainsi, il est important d'évaluer les deux branches (pro- et anti-

inflammatoire) du système immunitaire pour comprendre son implication dans les pathologies tissulaires.

II. Hypothèse et objectif

Hypothèse

Au cours des dernières décennies, l'implication du système immunitaire dans la pathogenèse des maladies chroniques inflammatoires et dans la progression de la fibrose a été démontrée. La fonction des réponses de type I et type II dans la progression de la fibrose hépatique a été clairement identifiée dans la majorité des hépatites à l'exception de la stéatose non alcoolique hépatique. Le dogme est que la balance entre l'inflammation de type I et de type II dicte la progression de la fibrose hépatique. La fonction de l'immunité de type III dans ce processus, caractérisé par l'activation des Th17 et une altération de la fonction des Tregs, reste encore peu explorée malgré les preuves croissantes de son implication dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques. Chez l'homme, la fréquence des Th17 corrèle positivement avec la progression de la fibrose, cependant les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les cytokines IL-17A et IL-22 modulent l'activation des HSCs sont incompris. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une réponse de type III dérégulée, avec un ratio Th17/Treg altéré, entraîne un milieu hépatique riche en cytokines profibrotiques.

Objectifs

Nos objectifs étaient premièrement d'évaluer chez l'homme *ex vivo* et *in situ* la réponse immunitaire de type III et d'établir une corrélation avec le stade de fibrose. Deuxièmement de valider la fonction de cette signature immunologique, en étudiant la fonction des cytokines de type III : l'IL-17A et l'IL-22. Tout d'abord, *in vitro* en testant leur potentiel à activer des HSCs via le modèle optimisé lors de ma maîtrise qui consiste à mesurer la différenciation des HSCs en myofibroblastes et à quantifier la production de collagène de type I. Puis de déterminer les mécanismes d'actions moléculaires par des études transcriptomiques. Ensuite, *in vivo* en utilisant des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-22 dans des modèles d'insultes hépatiques chroniques par administration de TAA et de CCl₄. Finalement, de tester si l'inhibition de la réponse de type III *in vivo*, par administration d'antagoniste contre ROR γ t et AHR, peut mener à une réduction de la fibrose hépatique. Finalement de valider *in vivo*, les autres signatures

inflammatoires (type I et type II) observées lors de l'objectif 1 en collaboration avec Dr. Wynn au NIH.

III. Chapitre 3 : Manuscrit 1

**TYPE III INFLAMMATION DRIVES LIVER FIBROSIS BY
ENHANCING TGF-BETA SIGNALING THROUGH
ACTIVATION OF MAPKs**

(Science translational Medicine, In revision)

Author's contribution to the manuscript "TYPE III INFLAMMATION DRIVES LIVER FIBROSIS BY ENHANCING TGF-BETA SIGNALING THROUGH ACTIVATION OF MAPKs"

Author contributions: Naglaa Shoukry (N.H.S.), Thomas Fabre (T.F.) and Manuel Flores Molina (M.F.M.) conceived the study. T.F., M.F.M. and N.H.S. designed the experiments. T.F. designed human (in situ and ex vivo), primary cells culture, RNA-seq and mouse in-vivo experiments. T.F. performed all experiments, M.F.M. contributed to the mouse experiments (necropsy, flow cytometry) and immunofluorescence experiments. T.F. performed all human flow cytometry data, in vitro experiments, contributed to immunofluorescence staining in collaboration with M.F.M, performed necropsy and mouse flow experiments with M.F.M and T.F. performed all qPCR, proline assays, Sirius red and immunofluorescence for in vivo experiments. T.F. analyzed the data. T.F., M.F.M., Marc Bilodeau (M.B.), Jean-Pierre Villeneuve (J.P.V), Bernard Willems (B.W.) recruited patients. M.B. and Geneviève Soucy (G.S.) performed the clinical assessments. T.F. and N.H.S wrote the paper. All authors reviewed the manuscript for intellectual content and approved the final version.

Title: TYPE III INFLAMMATION DRIVES LIVER FIBROSIS BY ENHANCING TGF-BETA SIGNALING THROUGH ACTIVATION OF MAPKs

Authors: Thomas Fabre^{1,2}, Manuel Flores Molina^{1,2}, Genevieve Soucy^{1,3}, Bernard Willems^{1,4}, Jean-Pierre Villeneuve^{1,4}, Marc Bilodeau^{1,4} and Naglaa H. Shoukry*^{1,4}

Affiliations:

¹Centre de Recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

²Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

³Département de Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

***To whom correspondence should be addressed:**

Dr. Naglaa H. Shoukry
Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM),
Tour Viger, Local R09.414
900 rue St-Denis,
Montréal, QC H2X 0A9
CANADA

One Sentence Summary: Type III inflammation characterized by increased production of IL-22 is a common driver of liver fibrosis during chronic liver injury through enhancement of TGF- β signaling in a p38 MAPK dependent manner.

ABSTRACT

Inflammatory immune cells can modulate activation of hepatic stellate cells (HSC) and progression of liver fibrosis. Inflammation is divided in three types characterized by distinct cytokine profiles. Type I inflammation (characterized by IFN- γ production) has anti-fibrogenic properties in contrast to type II inflammation (characterized by IL-4 and IL-13 production). Type III inflammation characterized by production of IL-17 and IL-22 is implicated in many inflammatory conditions of the gut and can be counteracted by regulatory T cells (Tregs), but its contribution to liver fibrosis is still poorly understood. Here, we evaluated the contribution of type III inflammation in liver fibrosis using clinical liver biopsies, *in vitro* stimulation of primary HSCs and *in vivo* mouse models. We report dysregulated type III responses in fibrotic lesions with increased Th17/Treg ratio as well as elevated IL-17A and IL-22 production in liver biopsies. In addition, we demonstrate a new pro-fibrotic function of IL-22 through enhancement of TGF- β signaling in HSCs in a p38 MAPK dependent manner. *In vivo*, IL-22RA1 knockout mice exhibited reduced fibrosis in response to thioacetamide and carbon tetrachloride. Blocking either IL-22 or IL-17 production using aryl hydrocarbon receptor (AHR) or RAR-related orphan receptor gamma-t (ROR γ t) antagonists resulted in reduced fibrosis. Altogether, we identified a novel role for type III inflammation mediated by IL-22 in driving liver fibrosis during chronic liver injury.

INTRODUCTION

Liver fibrosis is triggered as a tissue repair mechanism in response to injury and inflammation induced by viral infections, toxins, metabolic and autoimmune conditions (1). Chronic injury leads to advanced fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma independent of the underlying aetiology (2). TGF- β signaling is the key fibrogenic signal resulting in activation of hepatic stellate cells (HSCs), the main producers of extracellular-matrix (ECM) in the liver, and is modulated by pro-inflammatory mediators such as cytokines, damage-associated molecular patterns (DAMPs), and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that act on HSCs and liver immune cells (1, 3, 4).

The inflammatory immune response can be divided according to the activation and expansion of distinct immune cell subsets with different cytokine profiles that translate into three types of immunity/inflammation (5). Type I inflammation is characterized by production of IL-1 β , IL-6, TNF- α and IFN- γ by pro-inflammatory macrophages, NK cells, neutrophils, adaptive CD4 Th1 cells and CD8 T cells. Type I cytokines are pro-inflammatory, correlate with liver inflammation but exert anti-fibrogenic properties (6, 7). Indeed, robust Th1 responses were associated with slower progression of liver fibrosis (8). Type II inflammation is characterized by secretion of IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-25, and IL-33 by alternatively activated (M2) macrophages, innate lymphoid cells (ILC) type 2, and adaptive CD4 Th2 cells (6). This response was associated with lower hepatic inflammation demonstrated by reduced serum alanine transaminase (ALT), but correlated with progression of liver fibrosis during parasitic infections, HCV infection and toxin-induced fibrosis (6, 9-12). Based on this evidence, the current theory is that dysregulation between type I and type II inflammation is the major driver of fibrosis in the liver (1). Type III inflammation is associated with production of pro-inflammatory IL-17A, IL-17F, and cytokines of the IL-10 family such as IL-22 and IL-26 produced by neutrophils, mast cells, ILC3, $\gamma\delta$ T cells, Th17 and Th22 cells (5, 13, 14). Type III cytokines play an important physiological role in tissue homeostasis (15, 16). However, pathogenic type III inflammation is associated with multiple chronic inflammatory diseases including colitis, dermatitis, arthritis and cancer (17-21). Dysregulation of type III immunity is associated with abnormal tissue repair and cancer in the gut and the lung (18, 19, 21-24). In the liver, type III inflammation as a whole remains uncharacterized.

IL-17A, the hallmark cytokine of type III immunity has pro-fibrogenic properties through recruitment of pro-inflammatory monocytes, increased production of TGF- β and enhanced TGF- β responses in HSCs (25-28). IL-22 is hepatoprotective during acute liver injury (29, 30) but its function during chronic injury is controversial. Both pro and anti-fibrotic effects were reported in the lung and the liver depending on the duration of injury and aetiology (22, 31, 32). IL-22 plays an important role in promoting liver cancer development in underlying cirrhosis, which suggests that its protective function is detrimental on the long-term with persistent injury (33, 34). The balance between IL-17A and IL-22 also contributes to pathogenesis in the lung, but the molecular mechanisms are unknown (22). Thus, the role of type III inflammation in liver disease and fibrosis progression remains elusive.

Finally, regulatory T cells (Treg) are professional anti-inflammatory cells characterized by expression of FOXP3. Tregs impact the inflammatory milieu by reducing activation of pro-inflammatory cells leading to reduced pathogenesis in several inflammatory diseases (35-38). IL-10, a cytokine that can be produced by Tregs, induces apoptosis of activated HSC (39-41). It is therefore possible that Tregs could limit fibrosis progression through the secretion of IL-10. However, Tregs may have a dual-role as it was reported that they are enriched in fibrotic livers and protect activated HSCs from the cytotoxic activity of natural killer (NK) cells (42, 43). During chronic liver injury, Tregs also induce aberrant B-cell responses that may contribute to pathogenesis through the expression of CD40-L (44). Finally, the ratio between Tregs and other inflammatory cells is one of the key determinants of the progression of pro-inflammatory diseases (45-47).

In this study, we investigated whether type III immune responses contribute to fibrosis progression during viral- and non-viral hepatitis in human and animal models. Using primary human intra-hepatic lymphocytes (IHLs) and HSCs, liver biopsy specimens, advanced microscopy, gene expression and knockout mice, we evaluated the contribution of the type III cytokines IL-17A and IL-22 to the progression of liver fibrosis. We observed that dysregulation of Th17/Treg ratio and increased type III cytokines, especially IL-22, are associated with fibrosis progression. Lack of IL-22 signaling *in vivo* led to significant reduction of hepatic fibrosis. Similarly, blocking of type III cytokines IL-22 and IL-17A using AHR- and ROR γ t-

antagonists resulted in reduced fibrosis. Here, we report a novel pro-fibrogenic function of IL-22 through enhancement of TGF- β signaling in HSCs in a MAPKs dependent manner.

RESULTS

Increased frequency of Th17 cells in advanced liver fibrosis

To determine if a dysregulated type III response is implicated in liver fibrosis progression, we examined the frequency of Th17 cells, a hallmark of type III inflammation, by flow cytometry directly *ex vivo* in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and IHLs obtained from patients with viral-hepatitis (VH, n=19) or non-viral hepatitis (NVH, n=15) with different degrees of fibrosis (**Table S1**). Because of the limited number of cells, Th17 cells were identified by co-expression of the cell surface makers CD161, CD26, and CCR6 on CD4 T cells (48, 49) (**Fig. 1C, and Fig. S1E**). METAVIR score was used to stratify patients with moderate (F0-F2, n=18) or advanced (F3-F4, n=16) fibrosis. In peripheral blood, we did not observe significant changes in the frequency of Th17 cells (**Fig. S1F**). However, we observed a significant increase in the frequency of intrahepatic Th17 cells in patients with advanced liver fibrosis independent of liver disease aetiology (**Fig. 1C and D**). Interestingly, frequency of intrahepatic Th17 cells did not correlate with liver injury measured by serum alanine aminotransferase (ALT) (**Fig. S1G**), suggesting that they do not directly contribute to liver inflammation but rather contribute to fibrogenesis.

Dysregulated Th17/Treg ratio in scars associated with advanced fibrosis

Next, we examined the *in situ* frequency and localization of IL-17-producing (IL-17⁺, CD4⁻) and Th17 (IL-17⁺, CD4⁺) cells by immunofluorescence (IF) on formalin fixed paraffin embedded (FFPE) liver sections (**Fig. 1A, Fig. S1A**). To avoid any bias in counting, we scanned full liver biopsy specimens and performed automated counting using Visiopharm (Visiopharm). Liver sections were stained with picro Sirius red to differentiate scar from normal parenchyma and to delineate the region of interest for further analysis (**Fig. S2**). As expected, we observed increased immune infiltrate in fibrotic livers (**Fig. 1A and 1E-F**). Interestingly, we detected higher numbers of IL-17⁺ (p<0.0001, n=28) and Th17 cells (p<0.0001, n=28) in livers with advanced compared to moderate fibrosis (**Fig. 1B and 1E-F**). Despite the use of different

markers to identify Th17 cells *ex vivo* (CD161, CD26, CCR6) and *in situ* (IL-17, CD4), and the possibility that the functional read-out used *in situ* may not be sensitive enough to identify resting cells or low producers of IL-17, the *ex vivo* frequency of Th17 cells measured by flow cytometry correlated with the *in situ* number of Th17 cells quantified by immunofluorescence ($p=0.031$, $r=0.17$, $n=17$) in individuals where paired samples were available. This validates the use of cell surface markers to identify Th17 cells (**Fig. S1H**). We then generated tissue heatmaps for IL-17-producing or Th17 cells to further confirm that type III responses were increased in advanced fibrosis and within the scar (**Fig. 1B**). IL-17 producing cells accumulated in the scar region of patients with advanced fibrosis suggesting a direct fibrogenic role (**Fig. 1J-K**). Similar to our flow cytometry data, there was no correlation between the frequencies of neither IL-17-producing nor Th17 cells and serum ALT (**Fig. S1B-C**). Tregs limit fibrosis through secretion of IL-10 and inhibition of other inflammatory cells including Th17 cells. Therefore, we examined the frequency of Tregs (FOXP3⁺, CD4⁺) in liver biopsy samples (**Fig. 1A**). We observed increased numbers of intrahepatic Tregs ($p=0.0008$, $n=28$) in patients with advanced compared to moderate fibrosis (**Fig. 1G**). The number of intrahepatic Tregs correlated with serum ALT ($p=0.028$, $r=0.23$, $n=28$) (**Fig. S1D**). This suggests that Tregs may be recruited to the liver as a mechanism to control ongoing inflammation. However, it has been proposed that the imbalance between Th17 and Tregs contributes to the pathogenesis of several inflammatory diseases and therefore may influence fibrosis progression (35-38). To answer this question, we examined the Th17/Treg ratio in our biopsy samples. We observed a tendency ($p=0.103$, $n=28$) for increased Th17/Treg ratio in the entire liver biopsy sample of patients with advanced compared to moderate fibrosis (**Fig. 1H**). When we delineated the scar versus parenchyma, we observed a significant increase in the Th17/Treg ratio ($p=0.032$, $n=28$) in the scar region (**Fig. 1I**) suggesting that dysregulation of the type III response is associated with enhanced fibrosis.

IL-22 signaling pathway is a common signature of advanced liver fibrosis

To investigate if type III cytokines are the major drivers of liver fibrosis, we profiled the cytokines produced by IHLs isolated from liver biopsy samples from VH and NVH with different degrees of fibrosis. Due to the limited number of cells obtained from needle biopsies, IHLs were expanded *in vitro* then polyclonally stimulated, and supernatants used to quantify type I (IFN- γ , IL-6, TNF- α), type II (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13), and type III (IL-17A, IL-

17F, IL-21, IL-22) cytokines using the flowcytometry based LEGENDplex assay. Type I cytokines were predominantly produced by IHLs independent of aetiology, or fibrosis score suggesting a common signature of hepatitis (**Fig. 2A-B**). Type II cytokines were increased in NVH compared to VH (**Fig. 2A-B**) and correlated with progression of fibrosis and transition from NAFLD to NASH as we have recently reported (50). Interestingly, we also observed increased levels of type III cytokines in patients with advanced liver fibrosis independent of the aetiology (**Fig. 2A-B**). There was a significant increase of both IL-17A (VH, mean=680 pg/mL for F0-F2 vs. 3754 pg/mL for F3-F4; NVH, mean=370 pg/mL for F0-F2 vs. 1719 pg/mL for F3-F4) and IL-22 (VH, mean=630 pg/mL for F0-F2 vs. 2349 pg/mL F3-F4; NVH, mean=129 pg/mL for F0-F2 vs. 1240 pg/mL for F3-F4) in VH and NVH patient with advanced fibrosis (**Fig. 2C**). The *in situ* number of Th17 cells detected by IF correlated with IL-17A level (n=13, $r=0.606$, $p=0.006$) measured by LEGENDplex (**Fig. 2D**) supporting evidence from our *in situ* scan of FFPE samples. To further validate that the type III cytokines IL-17 and IL-22 are common markers of liver fibrosis, we consulted publically available microarray data comparing moderate and advanced fibrotic liver specimens in two studies on NASH (51) and HCV (52), respectively. We performed gene set enrichment analysis (GSEA) using GENE-GO and KEGG databases and focused our analysis on the top 15-upregulated pathways between moderate and advanced fibrosis ($p<0.05$, $FDR<25\%$, $FC>1.3$). IL-22 signaling pathway was in the top 5 modulated pathways in both studies ($p=0.000006$ NASH, and $p=0.0305$ HCV) with key pathways involved in fibrogenesis such as cell adhesion molecules and ECM-receptor interaction (**Fig. 2E and Fig. S3**). Collectively, these results suggest a key role for IL-22 in advanced liver fibrosis.

Type III cytokines produced by intra-hepatic lymphocytes promotes activation of hepatic stellate cells

To investigate the molecular mechanisms associated with a fibrogenic role for IL-22, we next investigated if type III cytokines enhanced fibrogenesis by modulating activation of HSCs, the key fibrogenic mediator. We used IHL culture supernatants from 6 patients with advanced fibrosis and high levels of IL-17A and IL-22 to stimulate the HSC cell line LX2 cells for 48 h then examined the expression of the pro-fibrogenic genes *ACTA2* (α -SMA), *COL1A1*, *TGFBI*, *TIMPI* and the chemokines *CXCL10*, *CCL20* involved in recruitment of type III immune cells

by qRT-PCR (**Fig. 2F**). We observed significant increase in expression of pro-fibrotic genes following stimulation (**Fig. 2F**). Furthermore, neutralization of IL-17A (upper panels) with anti-IL17RA (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or IL-22 (lower panels) with recombinant IL-22 binding protein (rIL-22BP) (50 ng/mL) led to significant reduction in expression of pro-fibrogenic genes. This result validated the previously reported pro-fibrotic function of IL-17A (25-28) but also highlighted a novel pathogenic role of IL-22 during liver fibrosis through modulation of HSC activation.

IL-22 enhances TGF- β signaling in HSCs independent of TGF- β -RII expression

To further explore the pro-fibrotic function of IL-22, we stimulated *in vitro* primary human HSCs with low physiological (1 ng/mL) or high doses of IL-22 (40 ng/mL) for 48 h and investigated whether it will induce a transition from quiescent- to activated-HSCs producing extracellular matrix (ECM). TGF- β (2.5 ng/mL , TGF- β^{hi}) treated HSCs were used as a positive control in all experiments. IL-22 alone was not sufficient to induce HSC activation as demonstrated by comparable mRNA expression levels of *ACTA2*, *COL1A1*, *TIMP1* and *TGFBI* by qRT-PCR (**Fig. 3A**) in treated versus untreated cells. This was further validated by low expression of α -SMA detected by IF (**Fig. 3B-C**) and western blot (**Fig 3D**). However, when combined with a low dose of TGF- β (0.1 ng/mL , TGF- β^{lo}), that was not sufficient by itself to activate HSCs (25), IL-22 induced activation of HSCs as shown by increased α -SMA expression detected by IF (**Fig. 3B-C**) and confirmed at the mRNA (**Fig. 3A**) and protein level (**Fig 3D**). To confirm that IL-22 enhances TGF- β responses, we repeated our co-stimulation in presence of LY2109761, an inhibitor of TGF- β signaling and observed significant reduction of activation of HSCs (**Fig. S4A-B**). As we have previously demonstrated that IL-17A can enhance fibrosis by stabilizing cell surface expression of TGF- β -RII (25), we examined whether IL-22 would have a similar effect. In contrast to IL-17A, IL-22 did not alter cell surface expression of TGF- β -RII (25) (**Fig 3E**) but enhanced phosphorylation of SMAD2/3 in response to low doses of TGF- β in IL-22 stimulated HSCs (**Fig. 3F**). These results suggested that IL-22 enhances TGF- β responsiveness in HSCs but not through direct action on the TGF- β receptor.

IL-22 enhances TGF- β signaling in HSCs through activation of the p38/MAPK pathway

To identify pathways activated by IL-22 that lead to an enhanced TGF- β response, we performed RNA-seq analysis on primary human HSCs from three different donors stimulated with IL-22

and TGF- β^{lo} and compared the modulated pathways to TGF- β^{lo} and TGF- β^{hi} treated cells normalized to untreated cells. GSEA analysis for transcription factors (TF) showed upregulation of a TF-cluster regulated by p38, including MEF2, a known regulator of fibrosis and TGF- β signaling (53-55), in IL-22 + TGF- β^{lo} compared to TGF- β^{hi} treated cells (**Fig. 4A**). We then validated that IL-22 induces phosphorylation of p38 in primary human HSCs (**Fig. 4B**). Finally, to confirm that IL-22 enhances TGF- β signaling through activation of p38/MAPKs, we used a chemical inhibitor of p38 (SB203538, 10 μ M) and measured HSCs activation following IL-22 + TGF- β^{lo} stimulation. Chemical inhibition of p38 in IL-22 + TGF- β^{lo} treated primary HSCs led to significant reduction of HSCs activation shown by decreased α -SMA expression (**Fig. 4C-D**), but had no impact on TGF- β^{hi} treated cells. This demonstrates that SB203538 did not alter the viability nor the ability of HSCs to activate in response to the regular dose of TGF- β . Treatment of HSCs with SB203538 significantly reduced phosphorylation of SMAD2/3 in response to a sub-optimal dose of TGF- β and IL-22 stimulation of HSCs (**Fig. 4E**). This indicated that IL-22 enhances TGF- β signaling in HSCs via activation of the p38/MAPK pathway.

IL-22 signaling is not required for control of hepatic inflammation during chronic liver injury

To investigate the function of IL-22 during chronic liver injury, we treated 6-8 weeks old male and female IL-22RA1 knockout (KO) C57BL/6 mice and wild-type (WT) littermates with either carbon tetrachloride (CCl₄) or thioacetamide (TAA) for 12 weeks to model high and mild hepatic inflammation, respectively. At 12 weeks, we observed increased liver size, liver body mass ratio and splenomegaly after treatment with CCl₄ (**Fig S5A-C**) compared to vehicle treated mice. Serum ALT levels were also increased in both models (**Fig. S5D and Fig. S6B**). There was no significant difference between IL-22RA1 KO and WT treated mice suggesting that IL-22 does not exert hepatoprotective functions in this chronic injury model as previously reported during acute injury (29). We also observed increased frequency of activated Tregs, expressing CD39 and CTLA-4 following injury in both IL-22RA1 and WT littermate mice (**Fig. S7A-B**). We also established a positive correlation between Tregs and serum ALT similar to our human data (**Fig. S7C**). Interestingly, the frequency of Tregs also correlated with the hydroxy-proline liver content (**Fig. S7D**) suggesting a pro-fibrotic function of these cells, as previously reported (42, 43).

IL-22 enhances liver fibrosis during chronic hepatic injury

IL-22 has hepatoprotective properties during acute liver injury but it also promotes tissue repair in other mucosal sites (13, 18, 29, 56) suggesting it may modulate the fibrogenic process. Our *in vitro* data showed that IL-22 exerts a pro-fibrogenic effect by enhancing TGF- β signaling (**Fig. 3A-C**). So, we sought to determine if lack of IL-22 signaling *in vivo* following chronic liver injury will lead to a reduction in fibrosis. WT littermates exhibited overt fibrosis, whereas IL-22RA1 KO had significant reduction of liver fibrosis. We observed reduction in the mRNA levels of pro-fibrogenic genes *colla1*, *timp1*, *tgfb1* and *loxl2* as well as genes expressed in activated HSCs *acta2* and *tgfbrii* by qRT-PCR in the liver of IL-22RA1 knockouts compared to WT (**Fig. 5A and H and Fig. S6A**). We confirmed this phenotype at the protein level as shown by decreased expression of α -SMA, desmin and collagen type I deposition (**Fig. 5B and D-H**) measured by immunofluorescence, picro Sirius red staining and hydroxy-proline liver content, respectively. Interestingly, WT showed severe bridging fibrosis and thick collagen network as compared to the IL22RA1 KO (**Fig. 5D**). This correlates with the reduced expression of *loxl2* (**Fig. 5A**). We observed 40% reduction in collagen deposition in IL-22RA1 KO compared to WT littermates following both CCl₄ and TAA treatment (**Fig. 5E-F and Fig. S6C-D**). We also observed significant increase ($p < 0.0001$) of IL-22 in both WT and IL-22RA1 KO (**Fig. 5A and Fig. S8A**). Finally, we confirmed that IL-22 producing cells were present in the liver of treated mice by IF. In both WT littermates and IL-22RA1 knockout mice, IL-22 producing cells were increased in the liver and located in close proximity of HSCs (**Fig. 5C**). We further characterized these IL-22 producing cells by flow cytometry and found that the majority were CD3 negative ROR γ t expressing cells suggesting they were either ILC3 or NK22 cells (**Supplementary 8A-C**). There were no major differences in the distribution of immune cell subsets between IL-22RA1 KO and WT suggesting that the reduction in fibrosis is due to the absence of IL-22 signaling and not due to alterations in inflammatory cell frequencies.

Inhibition of the type III cytokines, IL-22 and IL-17, with AHR and ROR γ t antagonists reduces liver fibrosis

ROR γ t and AHR are important master regulators of type III responses (57, 58). ROR γ t is important for the differentiation of type III immune cells and controls production of IL-17A, whereas production of IL-22 by type III immune cells is largely dependent on expression of the transcription factor AHR (57-60). These two pathways have become interesting targets for therapeutic intervention in various inflammatory conditions. *In vivo*, modulation of IL-17 responses using ROR γ t-antagonist during colitis showed strong efficacy and safety (61). We then investigated if inhibition of IL-22- and IL-17-producing cells *in vivo* could lead to reduced liver fibrosis. WT mice were treated for 4 weeks with CCl₄. At two weeks mice started receiving either daily I.P injection of the AHR-antagonist (CH-223191, 10 mg/kg), or ROR γ t-antagonist (GSK805, 10mg/kg) while control mice received vehicle (1% DMSO in corn oil) (**Fig. 6A**). We observed reduction in the mRNA levels of the pro-fibrogenic genes *colla1*, *acta2*, *timp1*, *tgfb1* and *lox12* in the liver (**Fig. 6B**). We then quantified the desmin-positive area and the liver density of IL-22⁺ cells. Mice treated with either the AHR- or the ROR γ t-antagonist exhibited significant reduction of both desmin-positive area (closed symbols) and the liver density of IL-22⁺ cells (open symbols), suggesting that these two antagonists can negatively modulate the production of type III cytokines in the liver (**Fig. 6C**). We also confirmed that collagen deposition in the liver was reduced as shown by picro Sirius red staining and measurement of the hydroxy-proline liver content (**Fig. 6D-F**), respectively. In conclusion, modulation of IL-22- and IL-17-producing cells using AHR and ROR γ t antagonists during chronic liver injury reduced the degree of liver fibrosis (**Fig 6G**).

DISCUSSION

Chronic hepatic inflammation, mediated partly by immune responses, is linked to liver fibrogenesis. The balance between type I and type II inflammation is associated with fibrosis progression (7), the function of type III inflammation during this process remains elusive. Here, we demonstrated that type III inflammation is a major driver of fibrogenesis in humans during chronic liver injury. We observed dysregulation of type III responses in fibrotic livers, with increased production of IL-17A and IL-22. This was confirmed by gene signatures observed in publically available microarray data from two independent studies. We then demonstrated novel pro-fibrogenic properties of IL-22 both *in vivo* and *in vitro* using primary human HSCs through positive regulation of TGF- β signaling in a p38-dependent mechanism (**Fig. 7**).

We studied a group of 62 individuals with different aetiologies of liver disease and varying degrees of fibrosis. This cohort allowed us to evaluate the relative impact of type I, II and III cytokines during chronic liver injury and fibrosis progression. We detected increased frequency of IL-17 producing cells in livers with advanced fibrosis both directly *ex vivo* and *in situ* (**Fig. 1C-K**). Interestingly, the vast majority of IL-17⁺ cells were not CD4 T cells, suggesting that innate cells and not Th17 cells are the main producers of type III cytokines in fibrotic livers (**Fig. 1E-F**). It is possible that Th17 cells enhance innate lymphocyte recruitment through their action on endothelial cells and induction of pro-inflammatory chemokines (20, 26, 62). However, these cells accumulated in the scar region independent of the aetiology suggesting an active role in the fibrogenic process (**Fig. 1J-K**). Furthermore, the frequency of neither IL-17⁺ nor Th17 cells correlated with serum ALT levels despite the pro-inflammatory properties of these cells. This suggests that type III inflammation does not contribute directly to liver inflammation and hepatocyte death.

CD4 helper T cell responses are negatively regulated by Tregs (37, 63). Therefore, we quantified the number of FOXP3^{hi} CD4 T cells *in situ* and observed increased number of Treg in livers with advanced fibrosis and frequency of Tregs correlated with elevated serum ALT levels (**Fig. 1G**). This is consistent with earlier observations in mice (44) and suggests that Tregs are recruited to the liver as a mechanism to regulate ongoing inflammation and damage. Increased Treg numbers were also reported in fibrotic livers during HCV infection (43). However, distribution of Tregs was not uniform throughout the tissue as we observed

dysregulation of the Th17/Treg ratio in the scar region compared to normal parenchyma in patients with advanced fibrosis (42, 43). Since, TGF- β is essential for the differentiation of both Th17 and Tregs (38) and given the reported plasticity between these two cell subsets (37), it is possible that liver inflammation mediated by TNF- α , IL-1 β and IL-6 indirectly promotes differentiation of Tregs into Th17 cells and therefore promotes fibrosis. TGF- β may also favor inhibition of Th17 cells by Tregs during chronic liver injury (64). It is also possible that these Tregs contribute positively to liver fibrosis progression through inhibition of the anti-fibrogenic function(s) of NK cells (42, 43).

To confirm that type III responses are the main driver of liver fibrosis, we evaluated the relative production of type I, II and III cytokines by IHLs from patients with different degrees of fibrosis and aetiologies (**Fig. 2A-B**). The type I cytokines (IFN- γ and TNF- α) were the two major cytokines produced during chronic liver injury; however, similar to previous reports they did not correlate with fibrosis progression (8). Type II cytokines (IL-4, IL-5, and IL-13) were significantly associated with fibrosis progression only in patients with NASH from our NVH group. In fact, type II cytokines exacerbate NAFLD and promotes fibrosis progression during NASH (50). Finally, the type III cytokines, IL-17A and IL-22, were significantly increased in the livers of patients with advanced fibrosis in both viral and non-viral hepatitis. This type III signature was further validated using publically available microarray data (**Fig. 2E**) comparing non- and fibrotic livers in NASH and HCV (51, 52), respectively. Type III signaling pathways, especially IL-22, were significantly upregulated in livers with advanced fibrosis in these two studies and were part of the top 15 regulated pathways along with classical pathways of fibrosis. The same signature was also reported during HBV infection (31). All together, these studies revealed that type III responses are a major driver of liver fibrosis and may extend to other organs with increased evidence of dysregulated type III responses that have been reported in human or experimental models of fibrosis and chronic inflammation in the kidney, lung, gut, and pancreas (6, 17, 22, 65, 66).

IL-22 was the cytokine most significantly associated with fibrosis progression in clinical samples. Furthermore, we observed that IL-22 enhances TGF- β signaling in primary HSCs in a p38-dependent mechanism, as it increases phosphorylation of SMAD2/3 and therefore activation of HSCs (**Fig. 3**). Interestingly, IL-22+TGF^{lo} treated HSCs exhibited a gene signature

associated with MEF-2 activation (**Fig. 4A**). MEF-2 is a p38-dependent transcription factor important for activation of HSCs and regulation of TGF- β signaling (53, 55). TGF- β is a key pro-fibrogenic cytokine as it promotes activation of HSCs, which indirectly contribute to tissue repair by enhancing proliferation and survival of hepatocytes. In contrast, TGF- β also inhibits hepatocyte entry into cell cycle and induces apoptosis during acute injury (67-69). IL-22 was reported to have hepatoprotective properties during acute liver injury (29). It also promotes proliferation of epithelial cells through activation of STAT3 in different organs (70, 71). This synergistic effect between IL-22 and TGF- β may promote optimal tissue repair under normal or acute injury conditions. However, dysregulation of IL-22 signaling in chronic injury, by prolonged exposure or lack of regulation by IL-22BP, is associated with pathogenesis and promotion of carcinogenesis (18, 34). *In vivo*, we observed that IL-22 played a pathogenic pro-fibrotic role during chronic liver injury as WT littermates showed overt fibrosis compared to IL-22RA1 knockout (**Fig. 5**). Lack of IL-22 signaling *in vivo* led to reduction of fibrosis as well as decreased activation of HSCs shown by decreased α -SMA expression (**Fig. 5B**). IL-22 producing cells were found in proximity to HSCs suggesting that they contribute to their activation by regulating TGF- β signaling (**Fig. 5C**). *In vivo*, most IL-22 producing cells were innate cells expressing high levels of ROR γ t (data not shown) suggesting that they either are NK-22 or ILC3 (72, 73). The *in vivo* regulation of IL-22 by IL-22BP during acute and chronic liver injury remains an open question and should be examined in future studies. We then demonstrated that targeting the transcription factor AHR, important for production of IL-22 by immune cells (58-60), with an antagonist led to reduction of liver fibrosis *in vivo* (**Fig. 6**). The AHR antagonist CH-223191 was well tolerated and significantly reduced the number of IL-22 producing cells *in vivo* (data not shown). In contrast to the acute injury where AHR signaling is required to maintain homeostasis and tissue repair (59), modulation of AHR *in vivo* during chronic liver injury was achievable and resulted in reduced liver fibrosis. Furthermore, AHR activation during chronic pancreatic injury led to increased fibrosis in an IL-22 dependent manner, which suggests that chronic IL-22 signaling is pathogenic (74). We also demonstrated that targeting of ROR γ t, the master regulator of type III responses that controls the differentiation and the function of IL-17- and IL-22 producing cells (57) led to significant reduction in liver fibrosis *in vivo*. GSK805, an inhibitor of ROR γ t-mediated transcription, was used as previously described in a colitis model (60), and was well tolerated. This suggests that

GSK805 is a potent inhibitor of the pathogenic type III inflammatory mediators IL-17 and IL-22 in the liver and the gut. Furthermore, we demonstrated that targeting of type III inflammation is possible, safe and efficient to reduce fibrogenic responses during chronic liver injury.

In conclusion, we demonstrated a previously unappreciated and novel pro-fibrogenic function of IL-22 through enhancement of TGF- β signaling in a p38-dependent mechanism. Furthermore, our data suggest that dysregulation of type III inflammation during chronic injury is one of the key mechanisms of liver fibrosis in humans. Novel therapies targeting production or signaling of type III cytokines (IL-17A and IL-22) with antagonist of transcription factors such as AHR and ROR γ t, during chronic liver injury may be an interesting approach for treatment of liver fibrosis.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statements and study subjects

Following informed consent, peripheral blood, fresh and FFPE human liver biopsy specimens were obtained from patients undergoing diagnostic liver biopsies at the hepatology clinic of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). This study was approved by the institutional ethics committee (protocol SL09.228) and all experiments were performed in accordance with the declaration of Helsinki. Relevant clinical information was also collected during the study and can be found in **Table S1**.

Mice

All experimental procedures were approved by the institutional animal ethics committee, Comité Institutionnel de Protection des Animaux (CIPA) (protocol 4I14048NSs). The program complies with all applicable provisions from institutional, provincial, and federal regulations for treatment of animals. IL-22RA1 knockouts were rederived at the animal facility of the Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM) using sperm purchased from the Mutant Mouse Resource and Research Center (MMRRC, UC Davis, CA). C57BL6 mice from The Jackson Laboratory (Sacramento, CA) were used to rederive the line. 6-8 week old male and female IL-22RA1 knockout and WT littermates were put either on carbon tetrachloride (Sigma-Aldrich, Oakland, ON) resuspended in corn oil (CCl₄, 0.5mL/kg I.P, twice per week), thioacetamide (Sigma-Aldrich) in PBS (TAA, 200mg/kg I.P, three times per week) or vehicle (corn oil or PBS). For the therapeutic intervention using the AHR antagonist (CH-223191) or ROR γ t-antagonist (GSK805), WT mice were put on CCl₄ (0.5mL/kg I.P, twice per week) for 4 weeks and treated from week 2 to 4 daily with either CH-223191 (10mg/kg I.P in corn oil), GSK805 (10mg/kg I.P in corn oil) or vehicle (1% DMSO in corn oil I.P). Mice were terminally euthanized with sodium pentobarbital and xylocaine 2%. All animals were housed under specific pathogen-free conditions at the CRCHUM.

Histopathology

Human liver specimens were fixed and processed at the Pathology laboratory of St-Luc Hospital of the CHUM. Murine liver lobes were harvested and fixed with tissuefix (Chaptec, Montreal,

QC) for 48h) and embedded in paraffin for sectioning (BZ-Histo Services Inc., Montreal, QC). Alternatively, murine lobes were fixed overnight at 4°C in Tissuefix, transferred in sucrose gradient and included in OCT (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA). Sections were stained with Picrosirius red (Sigma-Aldrich) with or without Fast green (Sigma-Aldrich), or H&E performed by BZ-Histo Services Inc.

Hydroxy-proline Assay

20-100 mg of tissue was hydrolyzed in 2 mL of 6 N HCl at 110°C for 18 h. 10 µL of the hydrolyzed sample or standard were placed in 30 µL of citric acetate buffer (10 g citric acid (5% w/v), 2.4 ml Glacial Acetic Acid (1.2% v/v), 14.48 g sodium acetate (7.24% w/v), 6.8 g sodium hydroxide (3.4% w/v) up to 200 ml with sterile deionized water). 100 µL of Chloramine T solution (0.282 g Chloramine T, 2 ml isopropanol, 2 ml sterile water, 16 ml citrate acetate buffer) were mixed with the samples or standards and allowed to oxidize for 20 min at room temperature. 100 µL of Ehrlich's Reagent (2.5 g of p-dimethylaminobenzaldehyde, 9.3 ml isopropanol, and 3.9 ml 70%-perchloric acid) were mixed with the oxidized samples or standards and allowed to incubate at 65°C for 20 mins. Absorbance was read at 550 nm and compared to the standard curve for quantification.

Serum analysis

Blood was collected in EDTA tube (BD biosciences, Santa Diego, CA) and serum was collected after 5 min centrifugation at 10000 rpm. Serum ALT was measured by the Diagnostic Molecular Biology Laboratory of St-Luc hospital of the CHUM.

Immunofluorescent staining and image analysis

Deparaffinization and rehydration of FFPE sections were first performed. Antigen retrieval was performed using Sodium citrate pH 6 solution for 10 min at high temperature and pressure. Frozen OCT sections were stored at -80°C and warmed up to room temperature before usage. All sections were blocked with either 10 % human serum in 1% BSA in PBS solution or in serum-free blocking agent (DAKO, Santa Clara, CA). To reduce auto-fluorescence, sections were incubated in 0.1 mM glycine for 10 min then incubated with primary antibodies raise in mouse, rabbit and goat overnight in 1% BSA, 0.3% Triton X in PBS-tween 0.1% solution at 4°C. Sections were then washed 5 times for 5 min in PBS-Tween 0.1% solution. Secondary

antibody incubation was performed in 1% BSA, PBS-tween 0.1% solution at room-temperature for 1 h using secondary antibodies raised in donkey. Finally, sections were mounted in Slowfade Gold mounting media with DAPI (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA). The following primary antibodies were used: anti- α -SMA (mouse, clone 1A4, Sigma), desmin (rabbit polyclonal, Thermo Fisher Scientific), IL-17A (goat polyclonal, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), IL-22 (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FOXP3 (rabbit polyclonal, R&D Systems, Inc.), CD4 (mouse monoclonal, eBioscience, San Diego, CA). Secondary antibodies donkey anti-mouse Alexa-488, donkey anti-rabbit Alexa-647 and donkey anti-goat Alexa-568 (Thermo Fisher Scientific). Acquisition was performed at the CRCHUM molecular pathology core on an Olympus slide scanner model VS120-L100-W. Image analysis was performed on VIS (Visiopharm, Broomfield, CO). Tissue align tool was used to align and co-register Sirius red and immunofluorescent staining. Bayesian method using red channel was used to identify tissue from the background. Scar region of interest was found using Bayesian method in the green channel. Thresholding using histogram (2 standard variation above background) was used as a method to identify cells of interest, in addition to post-processing excluding non-circular objects smaller than $3 \mu\text{m}^2$ and bigger than $10 \mu\text{m}^2$. All positive events were associated to a nucleus identified by DAPI staining. Automated counting and area of interest were calculated using VIS.

Human intrahepatic lymphocyte isolation and quantification of cytokines

Intrahepatic lymphocytes (IHL) were isolated by enzymatic digestion with collagenase type 2 (100 IU/mL) (Worthington, Lakewood, NJ) of the liver biopsy followed by mechanical dissociation through a $70 \mu\text{m}$ filter. IHLs were expanded for 15 days in 24-well plates with 2×10^6 autologous irradiated (3000 rads) peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as feeder cells in presence of 50 IU/mL of IL-2 (R&D systems) and $1 \mu\text{g/mL}$ of anti-CD3 (clone UCHT1) (BD Biosciences, San Diego, CA). Expanded IHLs ($2 \times 10^6/\text{mL}$) were re-stimulated for 3 days with anti-CD3/CD28 ($1 \mu\text{g/mL}$, BD Biosciences). Cytokine production was quantified, from supernatants collected at day 3 diluted 1:2, by LEGENDplex analysis for human T helper (Th) cytokines (Biolegend, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions. Data were acquired on a standard LSRII instrument (BD biosciences) using FACS DIVA software version 8 and analyzed using LEGENDplex software version 7 (Biolegend).

Mouse intrahepatic lymphocyte isolation

400-600 mg of liver was diced and digested in Collagenase D (100 IU/mL, Roche, Laval, QC) and benzonase (10 U/mL, EMD Millipore, Darmstadt, Germany) at 37°C rocking for 1 h. Tissue was then passed through a 70 µm cell strainer to obtain single cell suspension. To remove hepatocytes, we performed slow spin centrifugation at 50 g for 5 min. Leukocytes were then isolated using a Ficoll gradient (GE healthcare Buckinghamshire, U.K.). Isolated cells were directly stained for flow cytometry or stimulated with PMA/Ionomycin (50 ng/mL and 1 µg/mL Sigma-Aldrich, respectively) in presence of brefeldin A (5 µg/mL, Sigma-Aldrich) and monensin (5 µg/mL, Sigma-Aldrich) for 6 h prior to staining.

Flow cytometry

For cell surface staining, freshly isolated IHLs from human and mouse were washed twice with FACS Buffer (PBS 1% FBS 0.01% azide). Incubation with primary antibody was performed at 4°C for 30 min. Cells were then washed twice with FACS buffer and fixed in PBS 1% PFA. For intracellular staining, surface staining was performed first as describe above except cells were fixed and permeabilized with a FOXP3 fixation buffer (eBioscience). Cells were washed twice in washing buffer from eBioscience and incubated with antibodies for intracellular antigens at 4°C for 30 min. Finally, cells were washed twice in washing buffer from eBioscience. Live cells were identified using Aqua Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, Burlington, ON). Data were acquired on a BD LSRII instrument equipped with an additional yellow-green laser (561 nm) and UV laser (355 nm) FACS DIVA software version 8 and analyzed using FlowJo software, version 9.9 for Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Fibrosis quantification

The fibrotic area (Picro Sirius red stained) was calculated using total liver section area and Sirius red positive area calculated by the thresholding method in the green channel using FIJI (Image J) image analysis software.

Western blot

Total liver proteins or primary human HSC total proteins were extracted in RIPA buffer RIPA buffer (NaCl, Nonidet P-40, SDS, Tris-HCl buffer [pH 8]) in the presence of protease and

phosphatase inhibitors (Roche). Western blots were performed as previously described(25). Detection of α -SMA and TIMP-I was done using 20 mg of total proteins, whereas 50 mg were used for phosphorylated SMAD2/3 and p-38.

Cell culture

The human HSC line LX2 (obtained from Dr. Scott Friedman, Ichan School of Medicine, Mount Saini, New York, NY) and primary human HSCs (ScienCell, San Diego, CA) were used as previously described(25). LX2 and primary HSCs cells were cultured in DMEM (Wisent, St. Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% FBS (HyClone, Nepean, ON, Canada) and GlutaMAX (Life Technologies, Burlington, ON, Canada). Stimulation were performed as previously described (25).

Cytokines, neutralizing antibodies and chemicals

Recombinant human IL-22, TGF- $\beta\beta$, IL-22BP and IL-17A were obtained from R&D. Neutralizing TGF- β and IL-17RA antibodies were also obtained from R&D. TGF- β inhibitor (Ly2109761, used at 100 μ M) and p38 inhibitor (SB203580, used at 10 μ M) were obtained from Sigma-Aldrich and Selleckchem (Houston, TX), respectively. CH-223191 (AHR antagonist) was obtained from Selleckchem and resuspended in DMSO (100 mg/mL). GSK805 was obtained from EMD Milipore and resuspended in DMSO (100 mg/mL).

Quantitative real-time PCR

Total liver RNA or primary human HSCs RNA were isolated with RNeasy Mini kit plus (QIAGEN, Germantown, MD). cDNAs were generated from 750 ng of total RNA with a Transcriptor Universal cDNA (Roche) kit with DNase I treatment. cDNAs were then diluted with ultra-pure water (Roche) and amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit on a LightCycler 480 (Roche). Relative quantification was performed as previously described (25). For quantification of mouse genes, we used validated primers from (QIAGEN), *lox12* (NM_033325), *acta2* (NM_007392), *timp1* (NM_001044384), *colla1* (NM_007742), *il22* (NM_016971), *tgfb1* (NM_011577), *tgfbrii* (NM_009371) and *lrat* (NM_023624).

RNA-seq and bioinformatic analysis

Primary human HSCs from 3 different donors were stimulated with different cytokines and RNA extracted with RNeasy Mini kit plus (QIAGEN). cDNA libraries and RNA-seq were performed by The McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, QC. 100 bp paired-end sequencing was performed on an Illumina-Hiseq (depth was above 150 million reads). Gene expression levels were normalized to unstimulated cells to account for donor variability. GSEA enrichment for biological processes, pathways and transcription factors component using KEGG; BIOCARTA, and GENE-GO databases. Publically available microarray data were obtained from the EBI ArrayExpress. GSEA was performed by CRCHUM bioinformatics platform using KEGG and GENE-GO databases with CAGE.

Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism 6 and 7 for generation of heatmap (GraphPad Software, La Jolla, CA). Differences between two groups were determined by Mann-Whitney, whereas differences between groups were determined by ANOVA followed by Tukey post-hoc test. Correlations were tested using Spearman's rank correlation. Data points were excluded only in the case of technical or processing error that caused poor quality control of the sample.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Fig. S1. Identification of IL-17 producing, Th17 and Treg cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) liver biopsies and by multi-color flow cytometry.

Fig. S2. Image processing and definition of region of interest.

Fig. S3. Top 15 regulated pathways associated with fibrosis in NASH and HCV.

Fig. S4. IL-22 enhances TGF- β responses in primary human HSCs independent of TGF- β receptor expression.

Fig. S5. IL-22 signaling is not required for control of hepatic inflammation during chronic liver injury.

Fig. S6. IL-22 enhances liver fibrosis during chronic thioacetamide (TAA)-mediated hepatic injury.

Fig. S7. Chronic liver injury induces activation of regulatory T cells in both WT and IL-22RA1 knockout.

Fig. S8. Phenotypic characterization of intrahepatic IL-17 and IL-22 producing cells during chronic liver injury.

Table S1. Patients' characteristics and demographics.

REFERENCES AND NOTES

1. V. Hernandez-Gea, S. L. Friedman, Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol* **6**, 425-456 (2011).
2. D. Y. Zhang, S. L. Friedman, Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **56**, 769-775 (2012).
3. I. Mederacke *et al.*, Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* **4**, 2823 (2013).
4. E. Seki *et al.*, TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med* **13**, 1324-1332 (2007).
5. F. Annunziato, C. Romagnani, S. Romagnani, The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *J Allergy Clin Immunol* **135**, 626-635 (2015).
6. L. Barron, T. A. Wynn, Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**, G723-728 (2011).
7. T. A. Wynn, Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199-210 (2008).
8. G. S. Baroni *et al.*, Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* **23**, 1189-1199 (1996).
9. M. M. Mentink-Kane *et al.*, Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology* **141**, 2200-2209 (2011).
10. M. G. Chiamonte, D. D. Donaldson, A. W. Cheever, T. A. Wynn, An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* **104**, 777-785 (1999).
11. R. L. Gieseck, 3rd *et al.*, Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis. *Immunity* **45**, 145-158 (2016).
12. S. Li *et al.*, Hepatitis C virus-specific T cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. *Hepatology*, (2012).
13. L. A. Zenewicz, R. A. Flavell, Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol* **23**, 159-163 (2011).

14. L. Hammerich, F. Heymann, F. Tacke, Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clin Dev Immunol* **2011**, 345803 (2011).
15. S. Rutz, X. Wang, W. Ouyang, The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 783-795 (2014).
16. C. S. Klose, D. Artis, Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* **17**, 765-774 (2016).
17. G. F. Sonnenberg, L. A. Fouser, D. Artis, Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. *Adv Immunol* **107**, 1-29 (2010).
18. S. Huber *et al.*, IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*, (2012).
19. S. Sanjabi, L. A. Zenewicz, M. Kamanaka, R. A. Flavell, Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 447-453 (2009).
20. T. Korn, M. Oukka, V. Kuchroo, E. Bettelli, Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol* **19**, 362-371 (2007).
21. D. M. Roeeveld, M. I. Koenders, The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine* **74**, 101-107 (2015).
22. G. F. Sonnenberg *et al.*, Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *J Exp Med* **207**, 1293-1305 (2010).
23. N. Qu *et al.*, Pivotal roles of T-helper 17-related cytokines, IL-17, IL-22, and IL-23, in inflammatory diseases. *Clin Dev Immunol* **2013**, 968549 (2013).
24. W. Strober, I. J. Fuss, Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **140**, 1756-1767 (2011).
25. T. Fabre, H. Kared, S. L. Friedman, N. H. Shoukry, IL-17A Enhances the Expression of Profibrotic Genes through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-Dependent Manner. *J Immunol* **193**, 3925-3933 (2014).
26. F. Meng *et al.*, Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* **143**, 765-776 e761-763 (2012).

27. A. Lemmers *et al.*, The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* **49**, 646-657 (2009).
28. L. Zhao *et al.*, Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One* **6**, e18909 (2011).
29. L. A. Zenewicz *et al.*, Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* **27**, 647-659 (2007).
30. S. Radaeva, R. Sun, H. N. Pan, F. Hong, B. Gao, Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* **39**, 1332-1342 (2004).
31. J. Zhao *et al.*, Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* **59**, 1331-1342 (2014).
32. X. Kong *et al.*, Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* **56**, 1150-1159 (2012).
33. D. M. Kuang *et al.*, B7-H1-expressing antigen-presenting cells mediate polarization of protumorigenic Th22 subsets. *J Clin Invest* **124**, 4657-4667 (2014).
34. R. Jiang *et al.*, Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* **54**, 900-909 (2011).
35. P. Ratajczak *et al.*, Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* **116**, 1165-1171 (2010).
36. Z. Etesam *et al.*, Altered Expression of Specific Transcription Factors of Th17 (ROR γ mat, ROR α) and Treg Lymphocytes (FOXP3) by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci* **60**, 94-101 (2016).
37. S. Huber *et al.*, Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* **34**, 554-565 (2011).
38. D. Mucida *et al.*, Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* **317**, 256-260 (2007).

39. L. J. Zhang, W. D. Zheng, M. N. Shi, X. Z. Wang, Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World J Gastroenterol* **12**, 1918-1923 (2006).
40. H. Louis *et al.*, Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* **31**, 381-390 (2000).
41. H. Louis *et al.*, Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* **28**, 1607-1615 (1998).
42. B. Langhans *et al.*, Regulatory CD4+ T cells modulate the interaction between NK cells and hepatic stellate cells by acting on either cell type. *J Hepatol* **62**, 398-404 (2015).
43. B. Langhans *et al.*, Intrahepatic IL-8 producing Foxp3(+)CD4(+) regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. *J Hepatol* **59**, 229-235 (2013).
44. D. Tedesco *et al.*, CD4+ Foxp3+ T cells promote aberrant immunoglobulin G production and maintain CD8+ T-cell suppression during chronic liver disease. *Hepatology* **65**, 661-677 (2017).
45. B. He *et al.*, The imbalance of Th17/Treg cells is involved in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *BMC Immunol* **18**, 33 (2017).
46. K. Nistala, L. R. Wedderburn, Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **48**, 602-606 (2009).
47. M. Noack, P. Miossec, Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* **13**, 668-677 (2014).
48. H. Kared, T. Fabre, N. Bedard, J. Bruneau, N. H. Shoukry, Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog* **9**, e1003422 (2013).
49. B. Bengsch *et al.*, Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Immunol* **188**, 5438-5447 (2012).
50. K. M. Hart *et al.*, Type 2 immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD collaboratively with TGF-beta. *Sci Transl Med* **9**, (2017).

51. A. D. Lake *et al.*, Analysis of global and absorption, distribution, metabolism, and elimination gene expression in the progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos* **39**, 1954-1960 (2011).
52. S. Munshaw *et al.*, Laser captured hepatocytes show association of butyrylcholinesterase gene loss and fibrosis progression in hepatitis C-infected drug users. *Hepatology* **56**, 544-554 (2012).
53. Y. Yang *et al.*, Histone deacetylase 9 plays a role in the antifibrogenic effect of astaxanthin in hepatic stellate cells. *J Nutr Biochem* **40**, 172-177 (2017).
54. Z. Lv *et al.*, Effect of salvianolic-acid B on inhibiting MAPK signaling induced by transforming growth factor-beta1 in activated rat hepatic stellate cells. *J Ethnopharmacol* **132**, 384-392 (2010).
55. X. Wang *et al.*, Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* **127**, 1174-1188 (2004).
56. L. A. Zenewicz *et al.*, Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* **29**, 947-957 (2008).
57. Ivanov, II *et al.*, The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
58. M. Veldhoen *et al.*, The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106-109 (2008).
59. M. S. Alam *et al.*, Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4+ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5943-5948 (2010).
60. J. Qiu *et al.*, Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity* **39**, 386-399 (2013).
61. D. R. Withers *et al.*, Transient inhibition of ROR-gammat therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nat Med* **22**, 319-323 (2016).
62. T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517 (2009).
63. J. Li *et al.*, Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PLoS One* **7**, e39307 (2012).

64. J. E. Konkel *et al.*, Transforming Growth Factor-beta Signaling in Regulatory T Cells Controls T Helper-17 Cells and Tissue-Specific Immune Responses. *Immunity* **46**, 660-674 (2017).
65. P. Mehrotra *et al.*, IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* **312**, F385-f397 (2017).
66. X. Peng *et al.*, IL-17A produced by both gammadelta T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *J Pathol* **235**, 79-89 (2015).
67. F. A. Oberhammer *et al.*, Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 5408-5412 (1992).
68. W. E. Russell, R. J. Coffey, Jr., A. J. Ouellette, H. L. Moses, Type beta transforming growth factor reversibly inhibits the early proliferative response to partial hepatectomy in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 5126-5130 (1988).
69. G. K. Wollenberg, E. Semple, B. A. Quinn, M. A. Hayes, Inhibition of proliferation of normal, preneoplastic, and neoplastic rat hepatocytes by transforming growth factor-beta. *Cancer Res* **47**, 6595-6599 (1987).
70. I. Kryczek *et al.*, IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* **40**, 772-784 (2014).
71. P. Conti *et al.*, IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett* **88**, 171-174 (2003).
72. E. Montaldo, K. Juelke, C. Romagnani, Group 3 innate lymphoid cells (ILC3s): Origin, differentiation, and plasticity in humans and mice. *Eur J Immunol* **45**, 2171-2182 (2015).
73. J. Ren, Z. Feng, Z. Lv, X. Chen, J. Li, Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor-alpha. *J Rheumatol* **38**, 2112-2118 (2011).
74. J. Xue *et al.*, Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Cigarette Smoke Induce Production of Interleukin-22 to Promote Pancreatic Fibrosis in Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* **151**, 1206-1217 (2016).

Acknowledgments: We would like to dedicate this work to the memory of Dr. Gilles Pomier-Layrargues, an outstanding hepatologist and mentor who helped us start this project. We would also like to thank the study participants and research nurses involved in this project. We wish to acknowledge the flow cytometry, cell imaging platforms and the animal facility at the CRCHUM for excellent technical assistance. **Funding:** This study was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (HEO-115696) and pilot project funding from Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI) and the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). CanHepC is funded by a joint initiative of CIHR (NHC-142832) and the Public Health Agency of Canada (PHAC). TF received doctoral fellowships from CIHR and CanHepC. MFM received fellowships from the Université de Montréal, Bourse Gabriel Marquis and the FRQS. NHS received a Chercheur Boursier salary award from the FRQS. **Authors' contributions:** TF and MFM designed and performed experiments and analyzed data. GS performed all the pathological scoring of liver biopsies and provided input on all the pathology aspects of the project. BW and JPV recruited participants and provided clinical data. MB coordinated, supervised and provided valuable input on all the clinical aspects of the project. TF, MB and NHS conceptualized the study and designed the overall experimental plan. NHS supervised the work and obtained funding. TF and NHS wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript. **Competing interests:** The authors declare no competing interests. **Data and materials availability:** RNA-seq raw data will be deposited in a publically available resource and the link will be provided prior to publication.

FIGURE LEGENDS

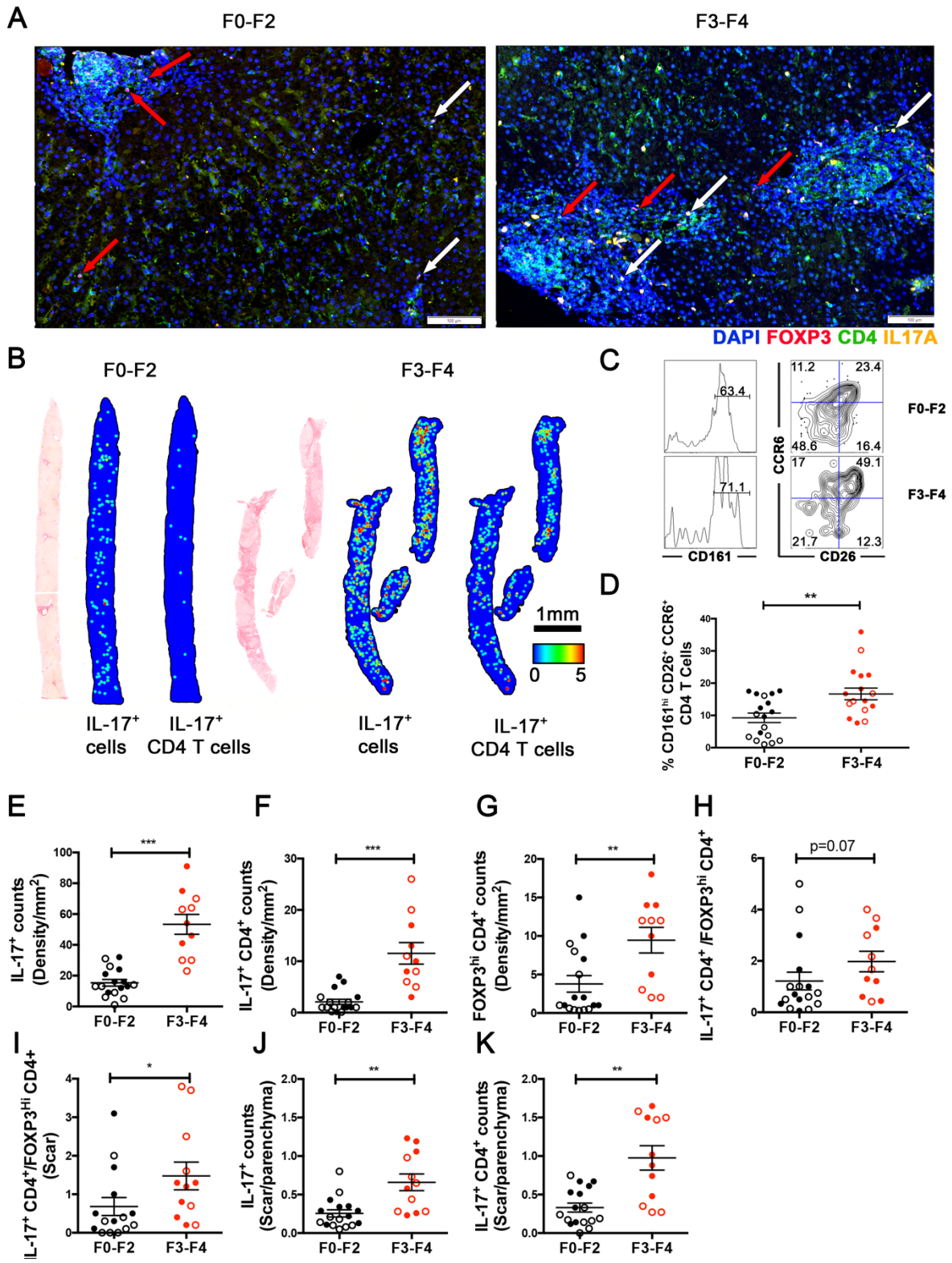


Figure 1. Dysregulated intrahepatic Th17/Treg ratio in advanced liver fibrosis.

(A) Detection of IL17-producing cells (white arrows) and Tregs (red arrows) by immunofluorescence staining of IL-17A (Yellow), FOXP3 (red) and CD4 (green) on paraffin-embedded liver biopsies, representative images from F0-F2 and F3-F4 VH are shown (200X magnification). **(B)** Representative tissue heatmap (scale, blue=0 to red=5 cells/50 μ m) of IL-17-producing (IL-17⁺ CD4⁻) and Th17 (IL17⁺ CD4⁺) cells from moderate and advanced fibrosis. Intrahepatic lymphocytes (IHLs) were isolated from liver biopsies of patients stratified as moderate (F0-F2, black symbols) or advanced liver fibrosis (F3-F4, red symbols) with viral hepatitis (VH, closed symbols) or non-viral hepatitis (NVH, open symbols) using METAVIR scale. **(C)** Representative FACS plots of intrahepatic Th17 cells identified by co-expression of CD161, CD26 and CCR6 on CD4 T cells. **(D)** Frequency of Th17 in the liver of patients with different degrees of fibrosis from VH and NVH. **(E-K)** Total number of intrahepatic IL-17 producing cells **(D)**, Th17 cells **(E)**, Tregs **(F)** and Th17/Treg ratio **(G)** from patients with moderate (black symbols) and advanced (red symbols) fibrosis with viral hepatitis (closed symbols) and non-viral hepatitis (open symbols). **(H-J)** Th17/Treg ratio in the scar **(H)**, ratio of IL-17 producing **(I)** and Th17 cells **(J)** between scar and normal parenchyma. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Kruskal–Wallis test)

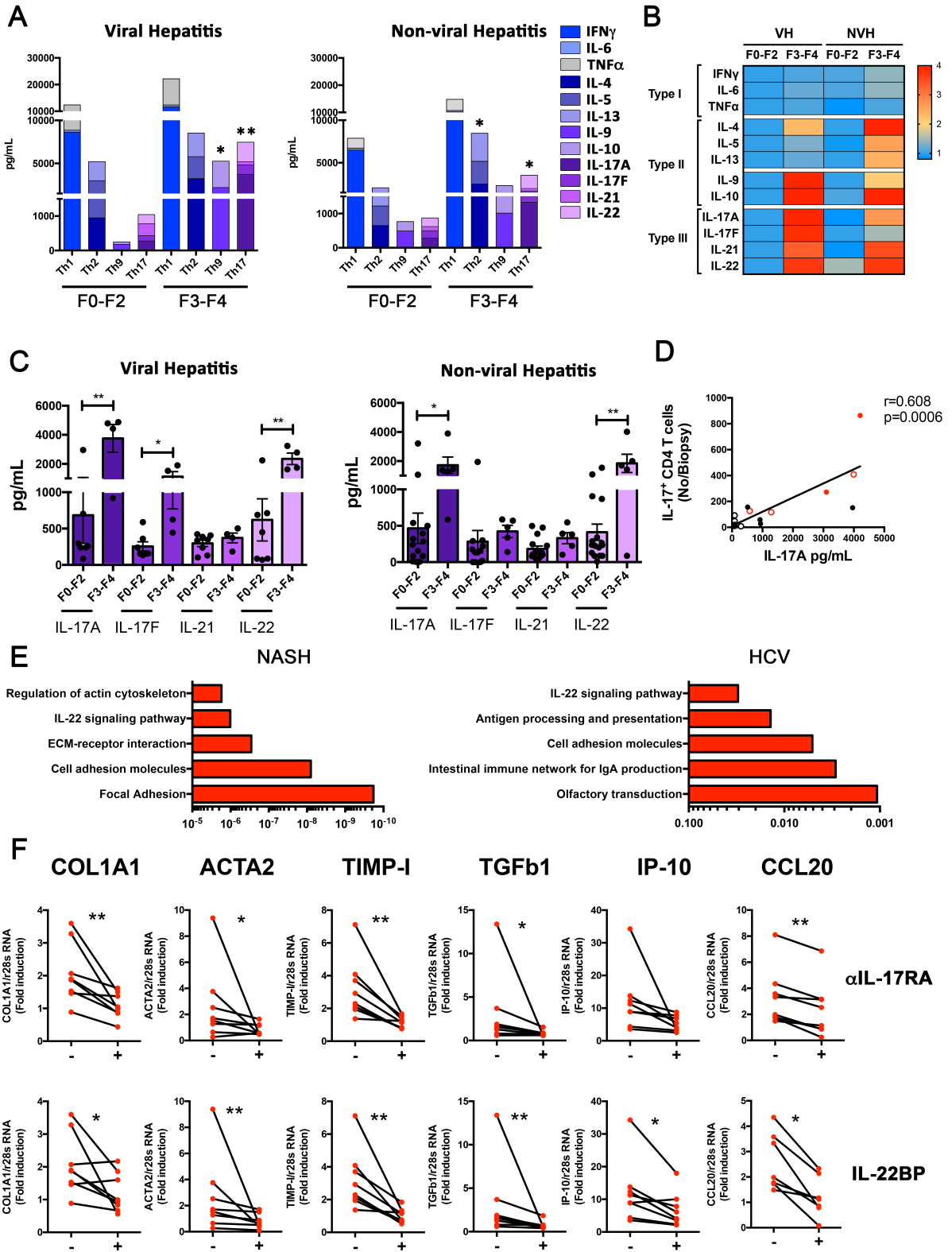


Figure 2. Increased type III cytokines are a signature of liver fibrosis and drive HSC activation.

Expanded intrahepatic lymphocytes (2×10^6 cells/mL) were stimulated with anti-CD3/CD28 for 3 days. Supernatant were collected and screened by LEGENDplex for type I (Th1), II (Th2, Th9) and III (Th17) cytokines. **(A)** Stacked bar comparing the mean production of Th1, Th2, Th9 and Th17 cytokines by IHLs of patients with viral hepatitis and non-viral hepatitis with moderate (F0-F2) and advanced (F3-F4) fibrosis. **(B)** Heatmap comparing fold change in type I, II and III cytokines of VH and NVH patients with moderate or advanced fibrosis **(C)** Quantification of Th17 cytokines (IL-17A, IL-17F, IL-21 and IL-22) by IHLs. **(D)** Correlation between the number of intrahepatic Th17 cells measured by immunofluorescence and concentration of IL-17A measured by LEGENDplex (Spearman's rank). **(E)** Gene-set enrichment analysis (GSEA) of publicly available microarrays data from two studies examining fibrosis in the context of NASH (ref 50) and HCV (ref 51). Top 5 upregulated pathways associated with fibrosis are shown ($p < 0.05$, $FDR < 25\%$, $FC > 1.3$). KEGG and GENE-GO database were used. **(F)** Fold change in the expression of pro-fibrotic genes *COL1A1*, *ACTA2*, *TIMP1*, *TGFBI*, *CXCL10* and *CCL20* after stimulation of LX2 cells with F3-F4 supernatant (n=6) with or without IL-17RA neutralizing antibodies (50 ng/mL, upper panels) and rIL-22BP (50 ng/mL, lower panels). Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey and Kruskal–Wallis tests were used for multiple and dual comparisons, respectively).

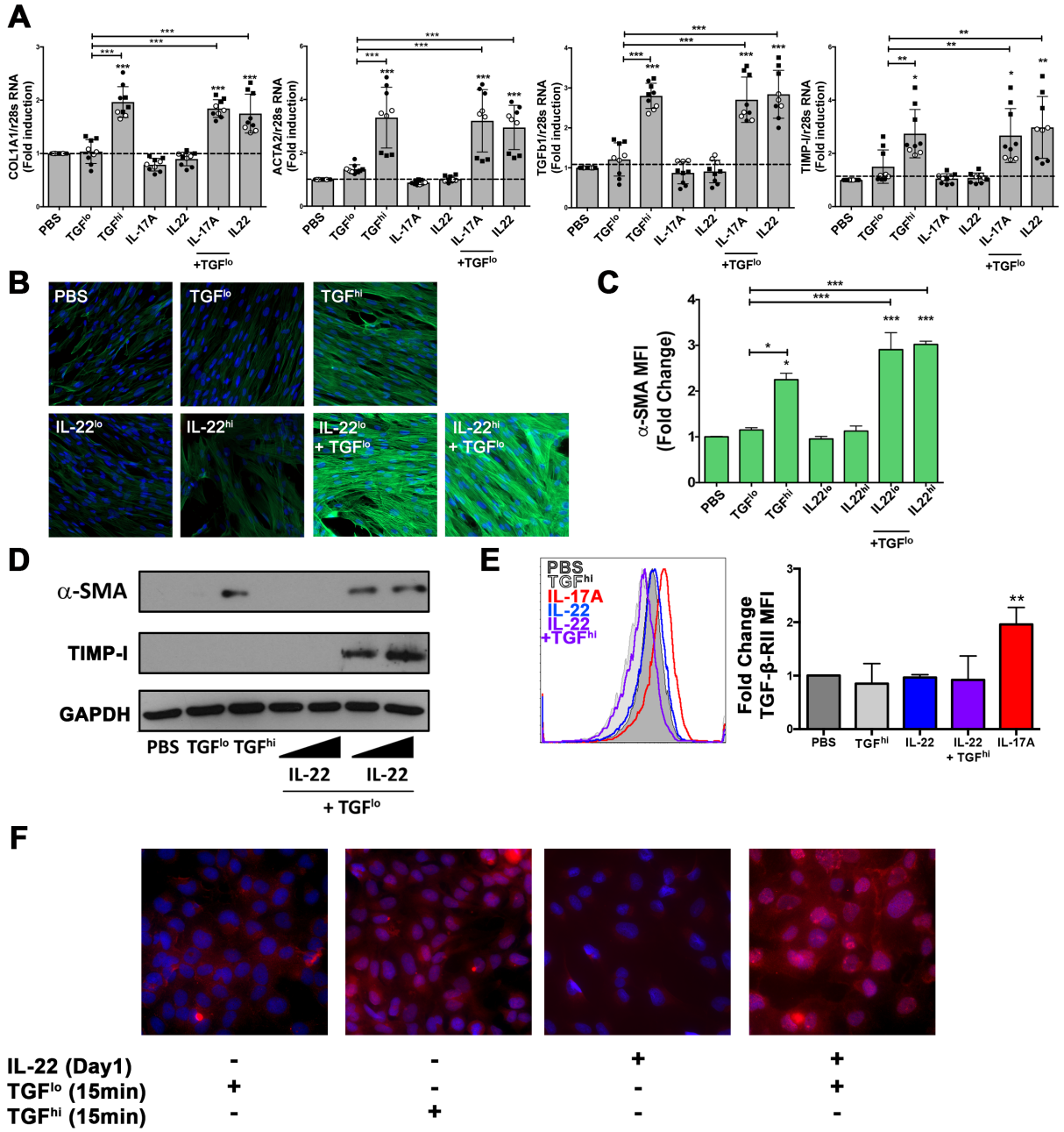


Figure 3. IL-22 enhances activation of HSCs in response to TGF- β .

Primary human hepatic stellates cells were stimulated 48 h with TGF- β^{hi} (2.5 ng/mL, positive control), suboptimal TGF- β^{lo} (0.1 ng/mL), IL-17A (40 ng/mL), IL-22 (40 ng/mL), combination of IL-17 with TGF- β^{lo} , combination of IL-22 with TGF- β^{lo} and vehicle (negative control). **(A)** Pro-fibrotic genes expression of *COL1A1*, *ACTA2*, *TGFBI* and *TIMP1* quantified by qPCR from 3 different donors (each donor is represented by one symbol). Replicates of 3 independent experiments are shown. **(B)** Representative immunofluorescence staining of α -SMA (green) expression after 48 h stimulation. **(C)** Fold change in α -SMA MFI, mean of 3 independent experiments. **(D)** Protein expression of α -SMA and TIMP-I following stimulation with TGF- β^{hi} (2.5 ng/mL, positive control), suboptimal TGF- β^{lo} (0.1 ng/mL), IL-22 $^{\text{lo}}$ (1 ng/mL), IL-22 $^{\text{hi}}$ (40 ng/mL), combination of IL-17 with TGF- β^{lo} , combination of IL-22 with TGF- β^{lo} and vehicle (negative control) by western blot. **(E)** Cell surface expression of TGF- β -RII on primary HSCs after stimulation with IL-22 and combination of IL-22 with TGF- β^{lo} . The bar graph represents fold change in the expression of TGF- β -RII from three independent experiments. **(F)** Representative immunofluorescence staining of phosphorylated SMAD2/3 after 15 min stimulation with TGF- β^{hi} or TGF- β^{lo} in primary HSCs pre-stimulated for 24 h with or without IL-22. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey test).

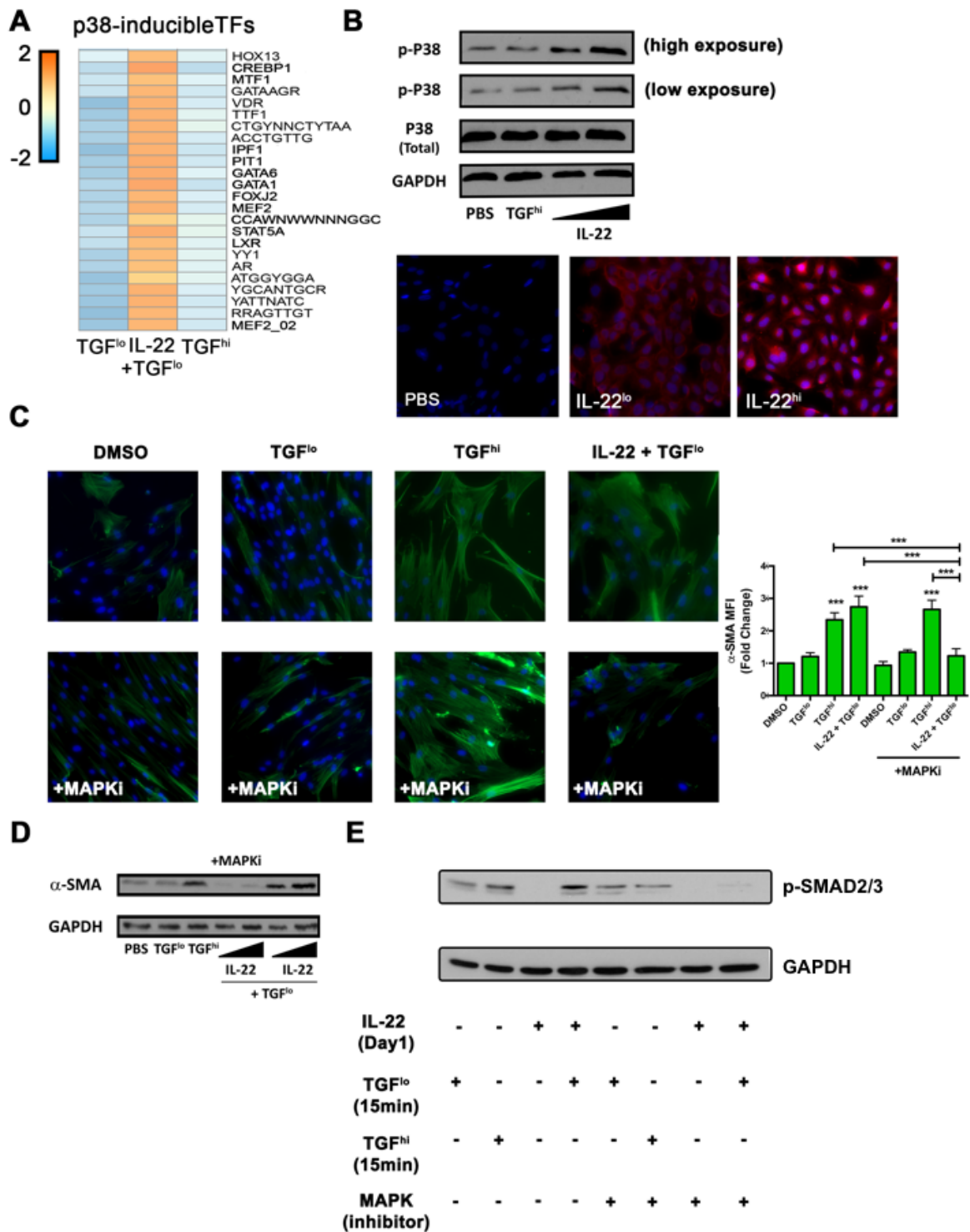


Figure 4. IL-22 activates p38/MAPK pathway to enhance TGF- β signaling in HSCs

(A) Gene set enrichment analysis of transcription factors (TFs) in primary HSCs from 3 different donors stimulated for 48 h with either TGF- β^{lo} , TGF- β^{hi} or IL-22 with TGF- β^{lo} normalized to vehicle treated cells. KEGG database was used ($p < 0.05$, $\text{FDR} < 25\%$, $\text{FC} > 1.3$). **(B)** Representative immunofluorescence staining and western blot of phosphorylated p38 after 15 min stimulation with IL-22. **(C)** Representative immunofluorescence staining of α -SMA (green) expression after 48 h stimulation in presence or absence of SB203538 (10 μM , chemical inhibitor of p38). Representative pictures from 3 independent experiments and 3 independent donors are shown. Fold change in α -SMA MFI, mean of 3 independent experiments. **(D)** α -SMA expression after 48h stimulation in presence or absence of SB203538 quantified by western blot. **(E)** Phosphorylation p-SMAD2/3 after 15 min stimulation with either TGF- β^{lo} or TGF- β^{hi} following pre-stimulation with or without IL-22 in presence or absence of SB203538 quantified by western blot. Western blots are representative of 3 independent experiments.

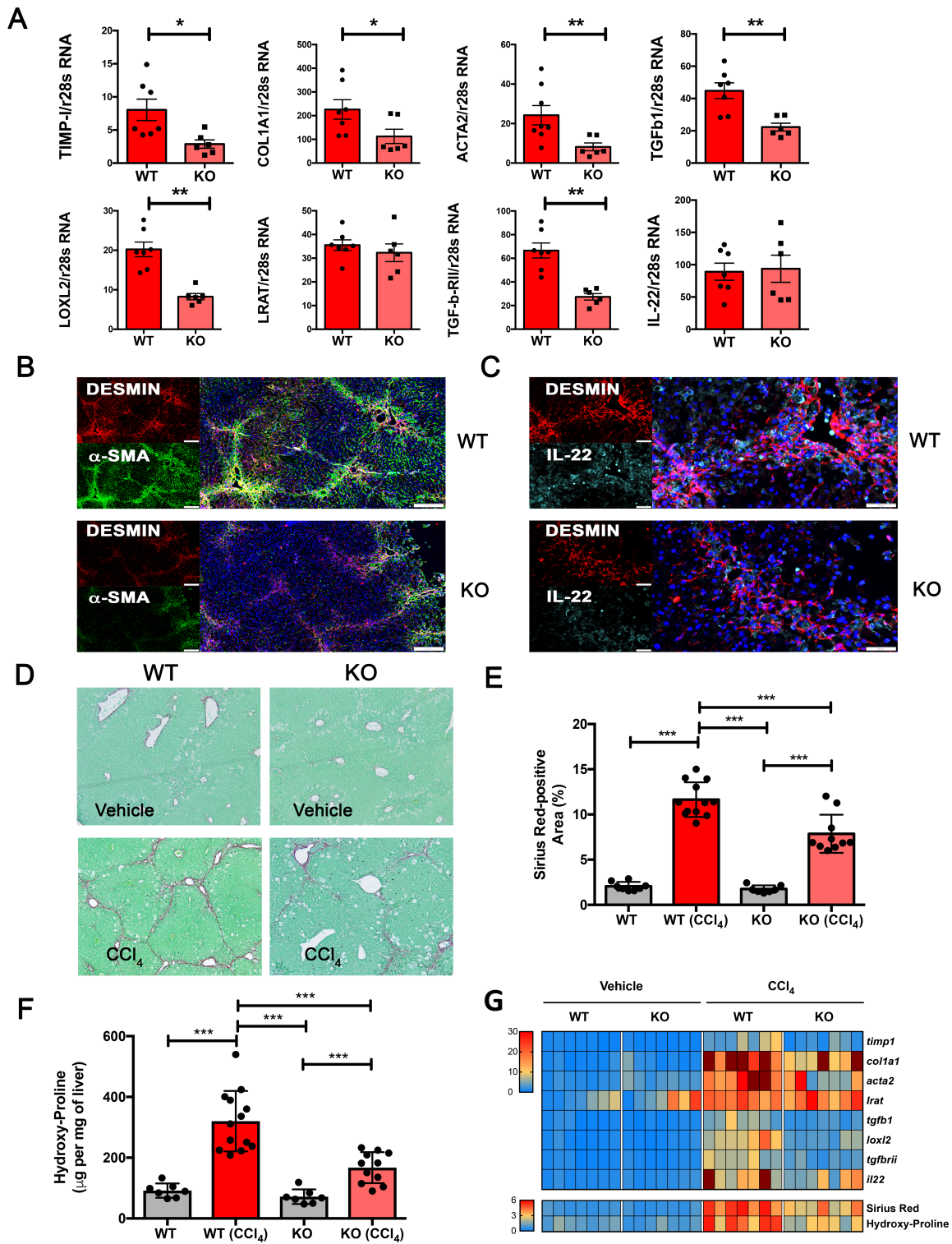


Figure 5. IL-22 enhances liver fibrosis during chronic liver injury.

(A) Representative pro-fibrotic gene expression of *timpl*, *colla1*, *acta2*, *tgfb1*, *loxl2*, *lrat*, *tgfbrii* and *il22* normalized to ribosomal 28s expression in the liver of WT littermates (n=7, dark red) and IL-22RA1 knockout (n=6, light red) after 12 wks treatment with CCl₄. (B) Representative immunofluorescence staining of α-SMA (green) and desmin (red) of WT littermates (upper panel) and IL-22RA1 knockout (lower panel) following chronic CCl₄ injury. (C) Representative immunofluorescence staining of IL-22 (cyan) and desmin (red) of WT littermates (upper panel) and IL-22RA1 knockout (lower panel) following chronic CCl₄ injury (200X magnification). (D) Collagen deposition was evaluated by picro Sirius red staining. (E) Quantification of Sirius staining after 12 wks treatment (n=37, 8 vehicle WT, 12 CCl₄, 7 vehicle KO, 10 CCl₄) with CCl₄ (100X magnification). (F) Hydroxy-proline content of the liver. (G) Heatmap of fold-change in expression of pro-fibrotic genes, Sirius red staining and hydroxy-proline content. Each column represents one animal. Error bars, mean ± s.e.m. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (ANOVA followed by a post-hoc Tukey and Kruskal–Wallis tests were used for multiple and dual comparisons, respectively).

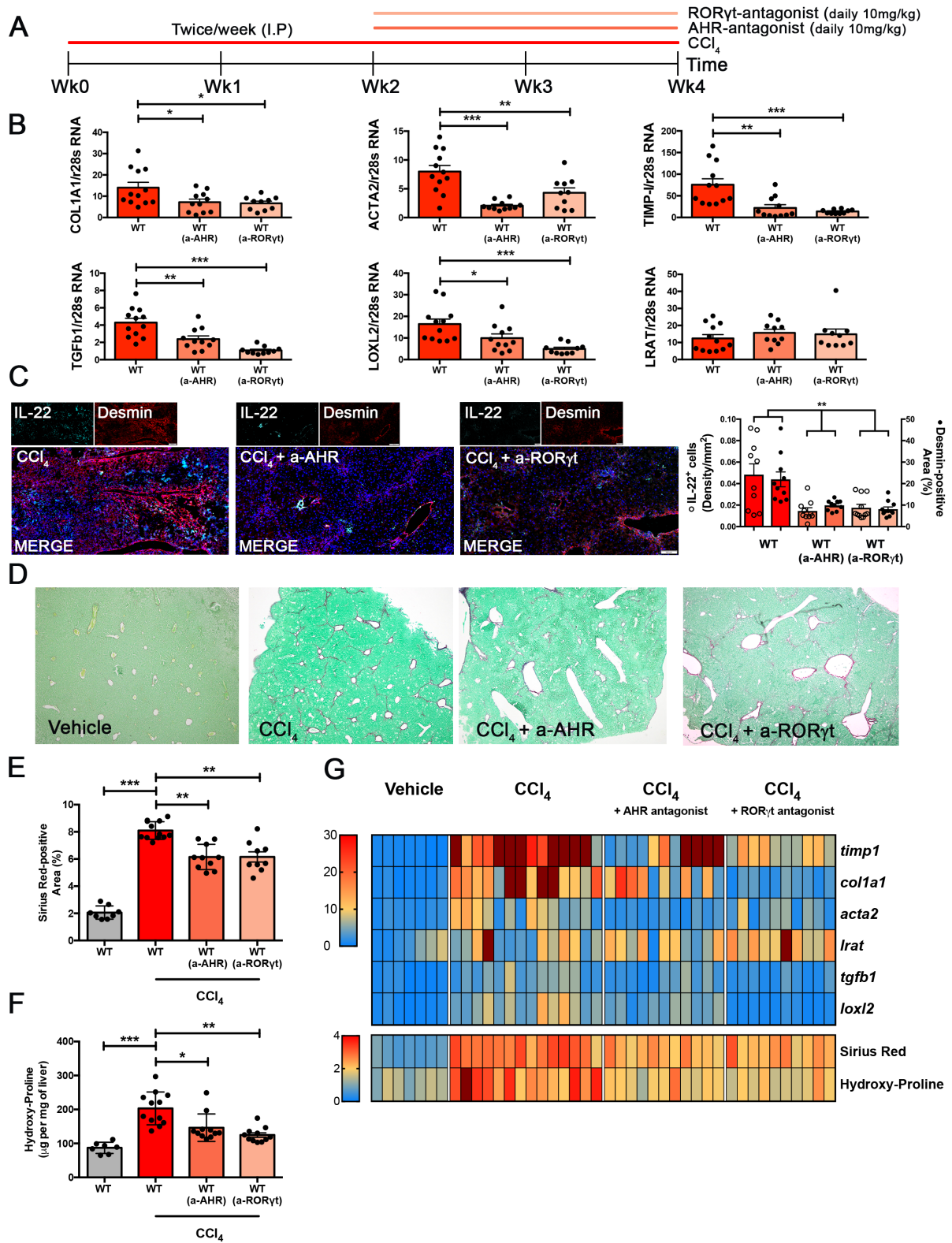


Figure 6. Inhibition of IL-22 producing cells with AHR- or ROR γ t- antagonists reduces liver fibrosis.

(A) Experimental timeline of therapeutic intervention during CCl₄ injury with AHR-antagonist (salmon red) or ROR γ t-antagonist (light red) (B) Representative pro-fibrotic gene expression of *timp1*, *colla1*, *acta2*, *tgfb1*, *loxl2* and *lrat* normalized to ribosomal 28s expression in the liver of WT (n=12, dark red) and WT treated with AHR-antagonist (10mg/kg daily for 2 wks, n=11, salmon red) or ROR γ t-antagonist (10mg/kg daily for 2 wks, n=10, light red) after 4 wks treatment with CCl₄. (C) Representative immunofluorescence staining of IL-22 (cyan) and desmin (red) of WT (right panel), WT treated with AHR-antagonist (middle panel) or ROR γ t-antagonist following chronic CCl₄ injury (200X magnification). IL-22+ cells density (cell/mm², open symbols) and desmin-positive area (closed symbols) were quantified in whole liver sections. (D) Collagen deposition was evaluated by picro Sirius red staining (100X magnification). (E) Quantification of Sirius staining after 4 wks treatment (n=37, 6 vehicle WT, 12 CCl₄ WT, 11 CCl₄ WT treated with AHR-antagonist and 10 CCl₄ WT treated with ROR γ t-antagonist) with CCl₄. (F) Hydroxy-proline content of the liver. (G) Summary heatmap showing fold-change in expression of pro-fibrotic genes, Sirius red staining and hydroxyl-proline content. Each column represents one animal. Error bars, mean \pm s.e.m. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 (ANOVA followed by a post-hoc Tukey and Kruskal–Wallis tests were used for multiple and dual comparisons, respectively).

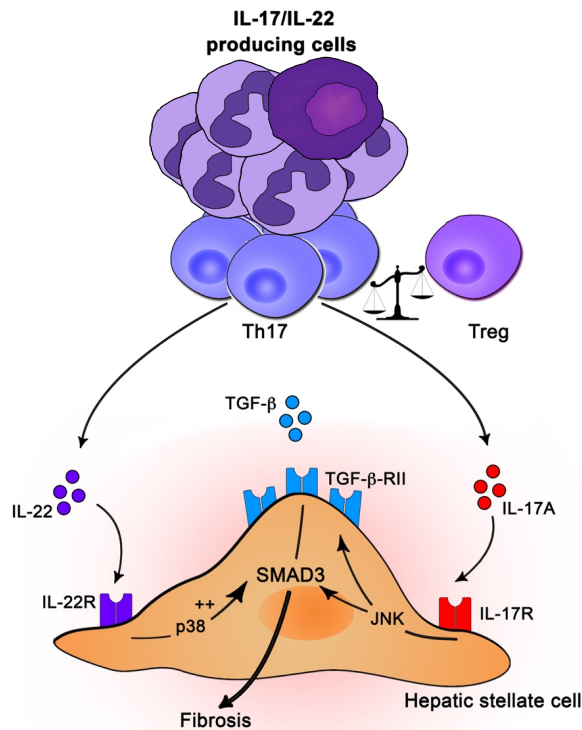
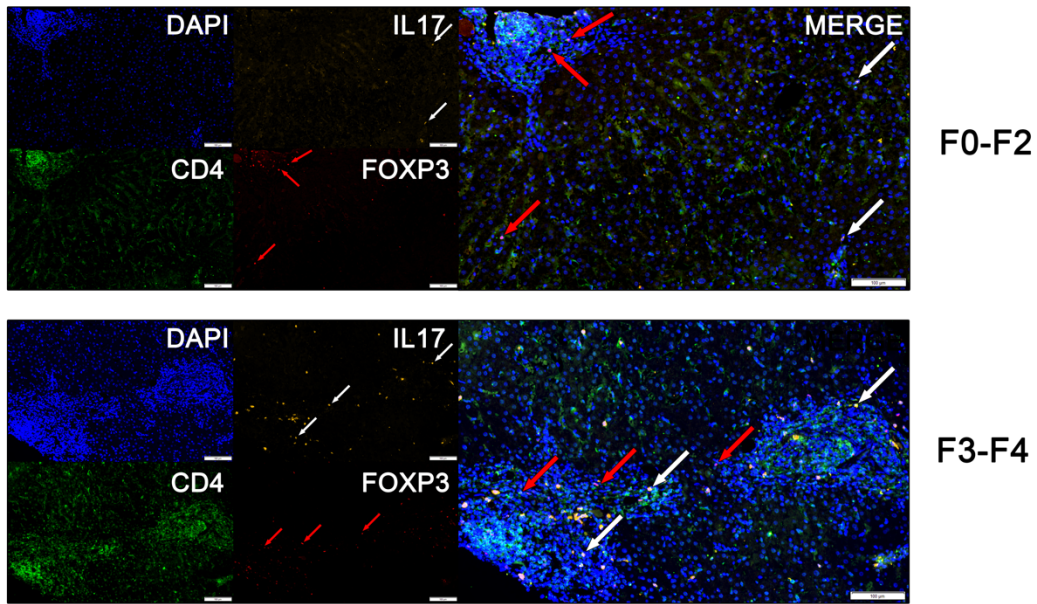


Figure 7. Model of the role of type III mediated liver fibrosis.

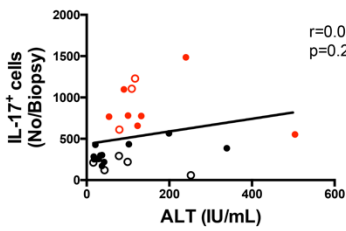
Liver fibrosis progression is associated with dysregulated Th17/Treg ratio leading to increased production of type III cytokines, IL-17A and IL-22. IL-17A and IL-22 are mainly produced by innate cells with a neutrophilic morphology. Both cytokines enhance TGF- β responses in HSCs. IL-17A increases TGF- β receptor in HSCs in JNK-dependent manner. IL-22 activates the p38/MAPK pathway increasing phosphorylation of SMAD-3 and therefore HSCs activation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

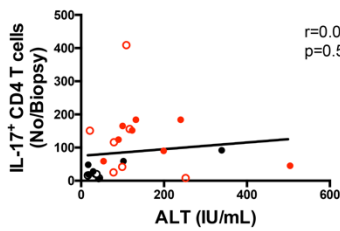
A



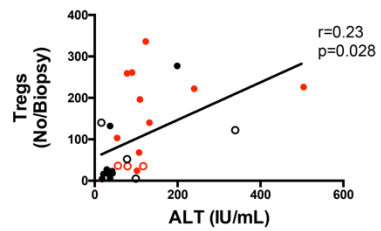
B



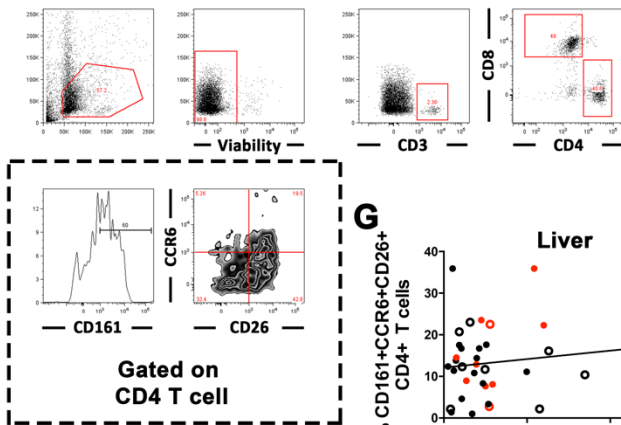
C



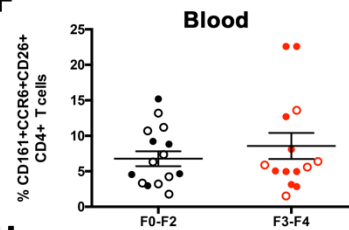
D



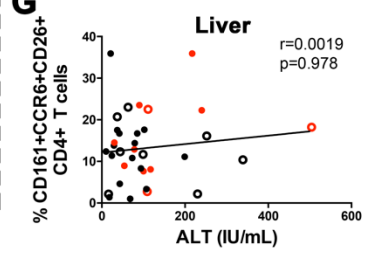
E



F



G



H

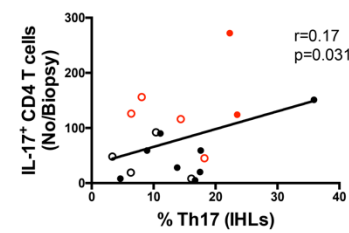


Figure S1. Identification of IL-17 producing, Th17 and Treg cells from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) liver biopsies and by flow cytometry in fresh liver biopsies.

(A) Detection of IL-17-producing cells (white arrows) and Tregs (red arrows) by immunofluorescence staining of IL-17A (Yellow), FOXP3 (red) and CD4 (green) on paraffin-embedded liver biopsies, representative images from F0-F2 and F3-F4 VH are shown. Each channel is shown separately on the left. **(B-D)** Correlation between the number of IL-17 producing **(B)**, Th17 cells **(C)**, Tregs **(D)** and serum ALT as a marker of hepatic inflammation. **(E)** Gating strategy for identification of Th17 cells based on expression of CD161, CD26 and CCR66 on CD4 T cells. **(F)** Frequency of Th17 cells in the blood of patients with different degrees of fibrosis from viral-hepatitis (VH) and non-viral hepatitis (NVH). **(G)** Correlation between intrahepatic frequency of Th17 cells and serum ALT as a marker of liver inflammation (Spearman's rank). **(H)** Correlation between number of Th17 cells quantified by IF staining and frequency of Th17 cells measured by flow cytometry. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Kruskal–Wallis test)

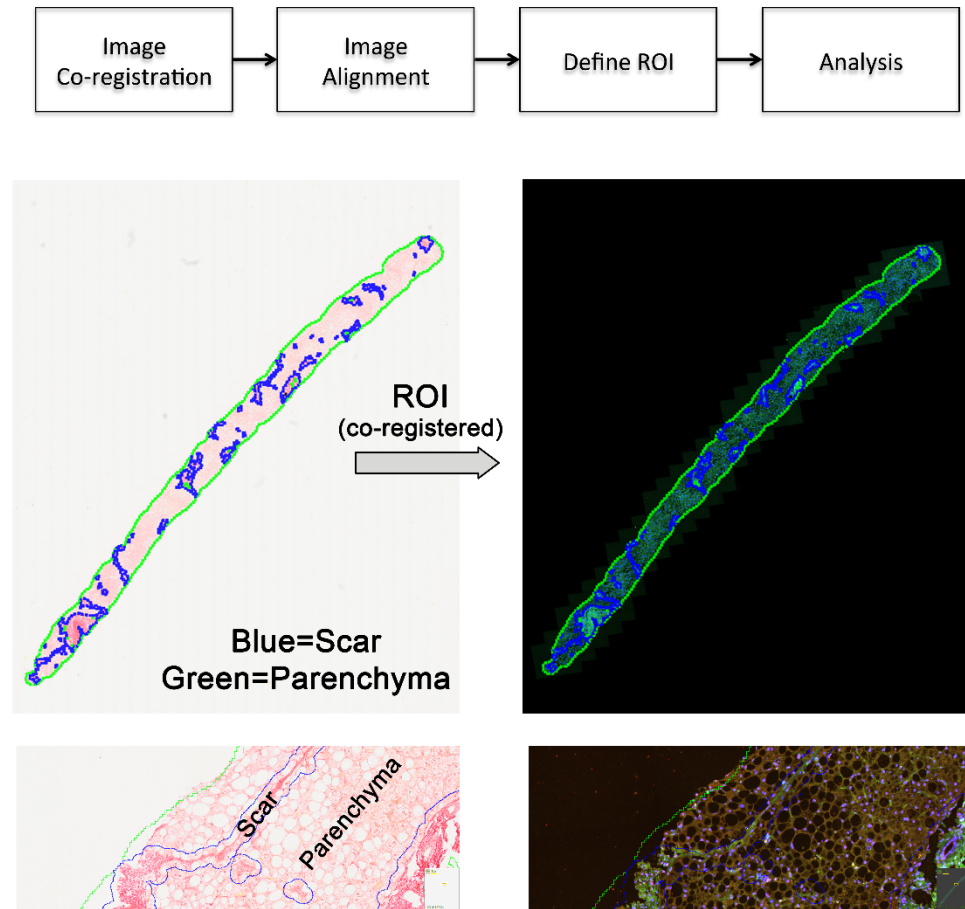


Figure S2. Image processing and definition of region of interest.

FFPE liver specimens were stained with picro Sirius red and by immunofluorescence to detect IL-17A, FOXP3 and CD4. Both stainings were scanned, tissue alignment was performed using tissue array add-on on Visiormorph. Images (Sirius red and immunofluorescence) were then co-registered. The scar (dark red area) was identified automatically using Bayesian analysis of the green channel to determine region of interest (blue). This region of interest was then automatically transferred to the immunofluorescence image. We then performed automated counting of IL-17 producing, Th17 and Tregs using thresholding and post-processing according to the area and size as described in Material and Methods.

TOP MODULATED PATHWAYS (low vs high fibrosis)

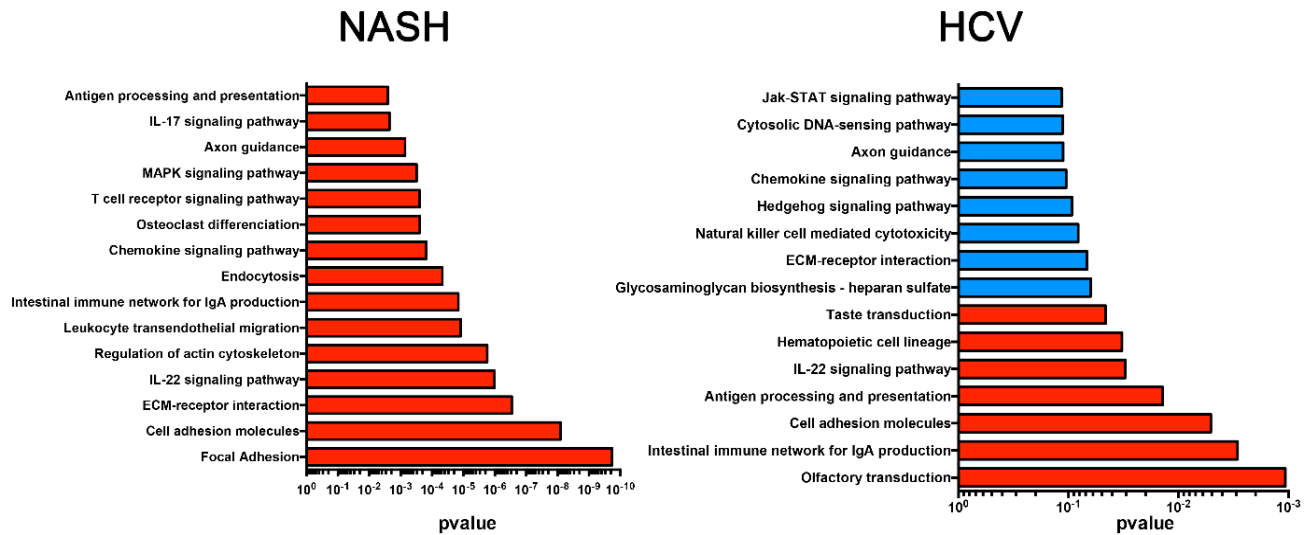
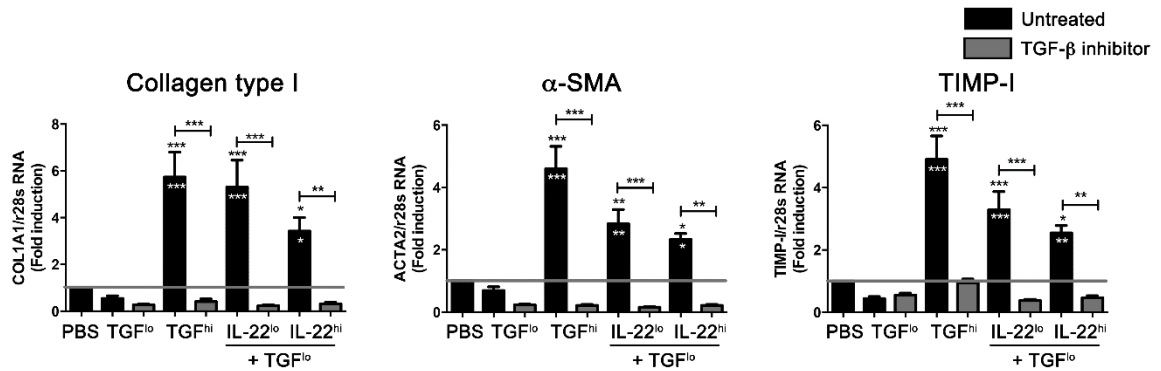


Figure S3. Top 15 regulated pathways associated with fibrosis in NASH and HCV.

Gene-set enrichment analysis (GSEA) of publicly available microarrays data from a NASH (ref 51) and an HCV (ref 52) study. Top 15 upregulated pathways associated with fibrosis are shown. KEGG and GENE-GO database were used. All pathways exhibited over 1.3-fold change ($p < 0.05$, $FDR < 25\%$, $FC > 1.3$). Blue denotes pathways that did not reach statistical significance ($p > 0.05$).

A



B

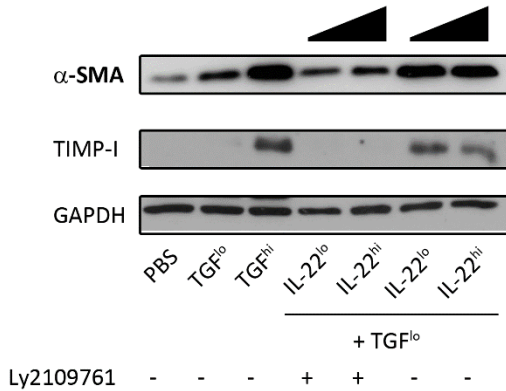


Figure S4. IL-22 enhances TGF-β responses in primary human HSCs independent of TGF-β receptor expression.

LX2 cells were stimulated 48 h with TGF-β^{hi} (2.5 ng/mL, positive control), suboptimal TGF-β^{lo} (0.1 ng/mL), IL-22^{lo} (1 ng/mL) IL-22^{hi} (40 ng/mL), combination of IL-22 with TGF-β^{lo} and vehicle (negative control) in presence or absence of TGF-β inhibitor Ly2109761. **(A)** Pro-fibrotic genes expression of *COL1A1*, *ACTA2*, and *TIMP1* quantified by qPCR. Replicates of 3 independent experiments are shown. **(B)** Protein expression of α-SMA and TIMP-1 by LX2 after stimulation with IL-22 and combination of IL-22 with TGF-β^{lo} in presence or absence of TGF-β inhibitor Ly2109761. Error bars, mean ± s.e.m. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (ANOVA followed by a post-hoc Tukey).

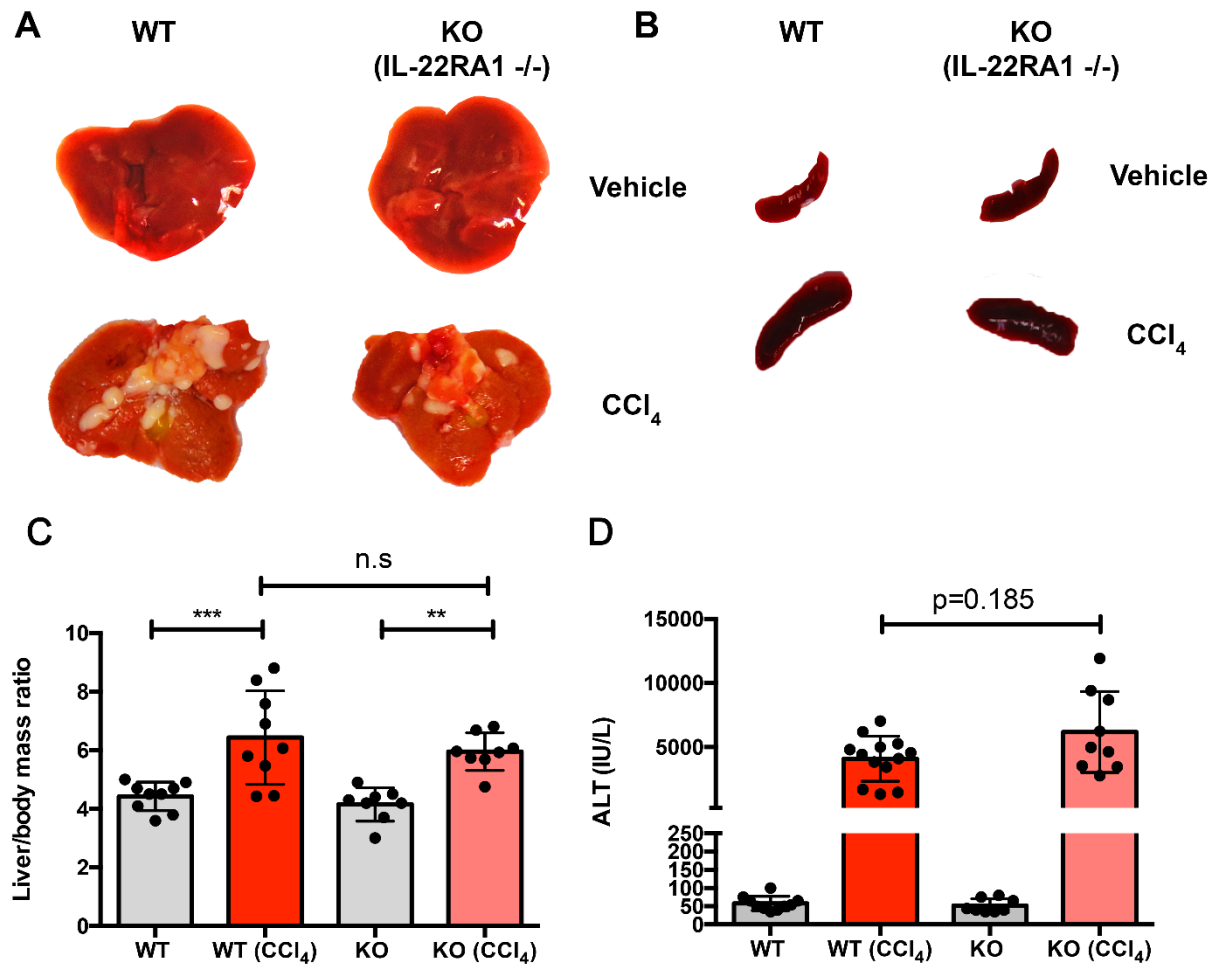


Figure S5. IL-22 signaling is not required for control of hepatic inflammation during chronic liver injury.

6-8 weeks WT littermates (n=18) and IL-22RA1 knockout (n=16) were treated for 12 wks with CCl₄, n=17, (2 *i.p.* injection/week, 0.2 mL/kg in corn oil) or vehicle, n=17. **(A-B)** Representative pictures of liver **(A)** and spleen **(B)** of WT and IL-22RA1 knockouts following treatment. **(C)** Liver body mass ratio and **(D)** serum ALT levels of WT littermates and IL-22RA1 knockout following treatment. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey).

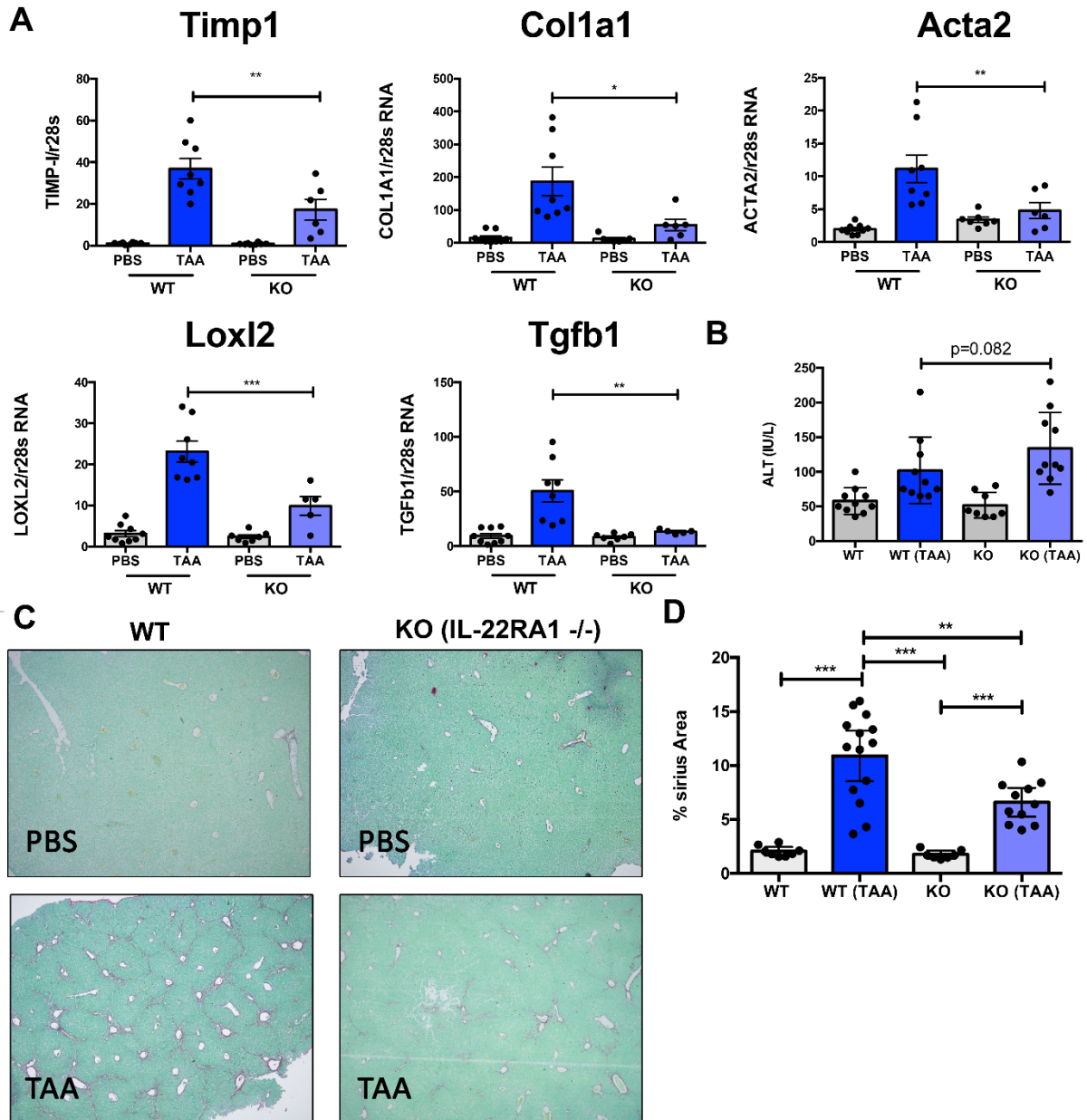


Figure S6. IL-22 enhances liver fibrosis during chronic thioacetamide (TAA) hepatic injury.

(A) Representative pro-fibrotic gene expression of *timp1*, *colla1*, *acta2*, *tgfb1* and *lox12* normalized to ribosomal 28s expression in the liver of WT littermates (n=7, dark blue) and IL-22RA1 knockout (n=6, light blue) after 12 wks treatment with TAA. (B) Serum ALT levels of WT littermates and IL-22RA1 knockout following treatment with TAA. (C) Collagen deposition was evaluated by picro Sirius red staining (100X magnification), (D) quantification of Sirius staining after 12 wks treatment with TAA. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey).

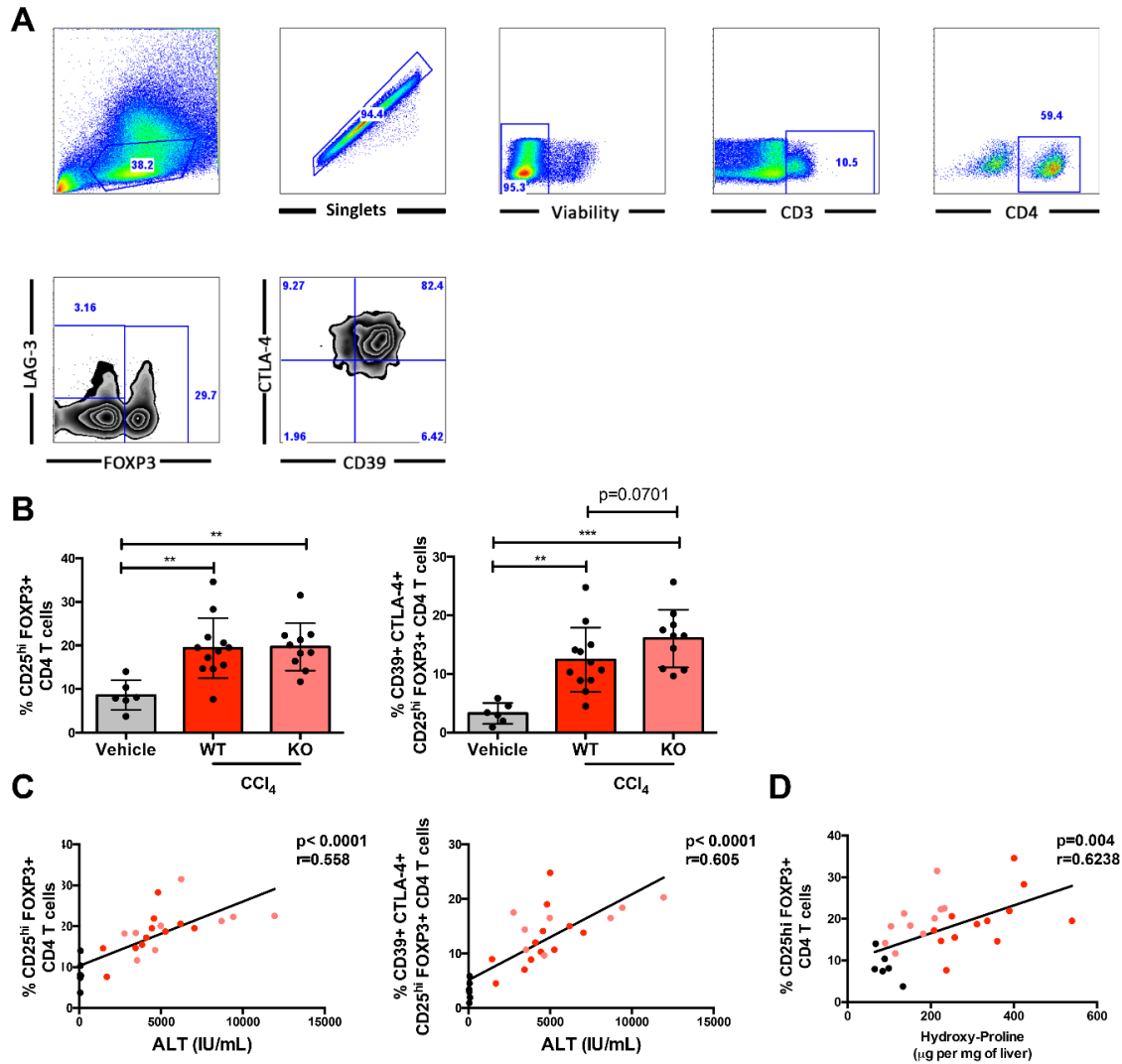


Figure S7. Chronic liver injury induces activation of regulatory T cells in both WT and IL-22RA1 knockout.

(A) Representative FACS plot of intrahepatic lymphocytes after chronic CCL4 injury. Tregs are identified by expression of CD25 and FOXP3, activated Tregs express CTLA-4 and CD39 where as Tr1 cells express low level of FOXP3 and LAG-3. (B) Frequency of total Tregs (right), activated Tregs (left) after chronic CCL4 injury. (C) Correlation between the frequencies of total Tregs (right), activated Tregs (left) and serum ALT (Spearman's rank). (D) Correlation between the frequencies of total Tregs and hydroxy-proline liver content (Spearman's rank). Vehicle treated mice are represented as black dots, WT and KO treated with CCL₄ are

represented as red dots and light dots, respectively. Error bars, mean \pm s.e.m. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (ANOVA followed by a post-hoc Tukey).

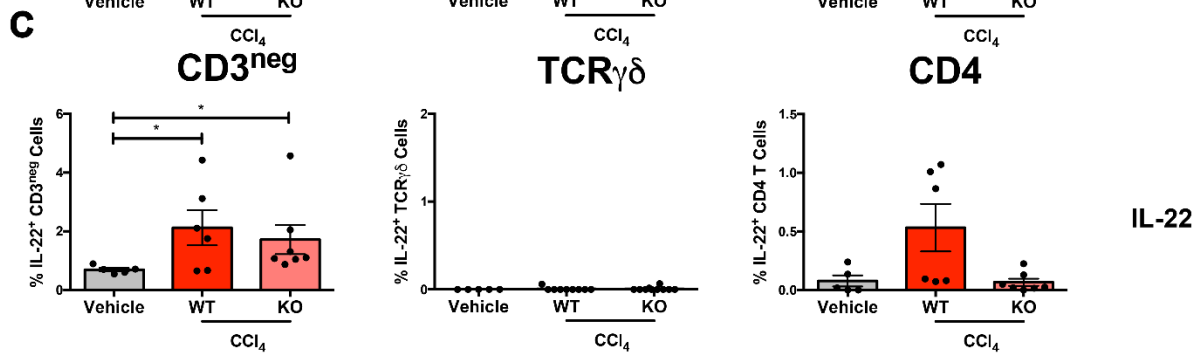
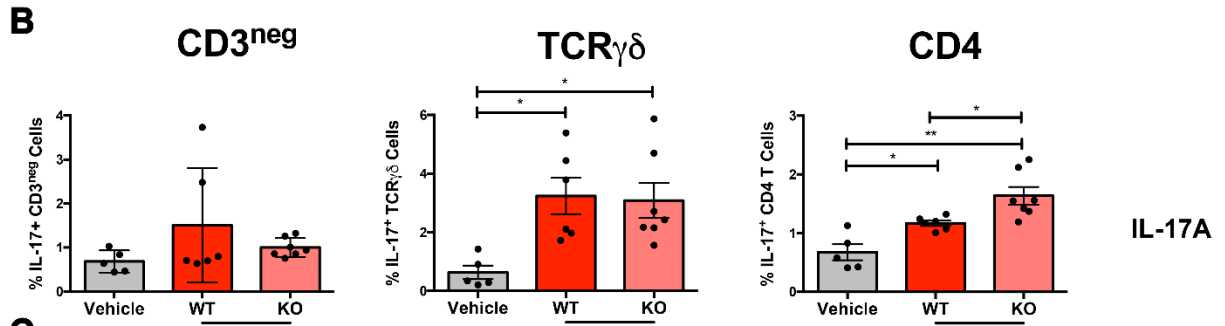
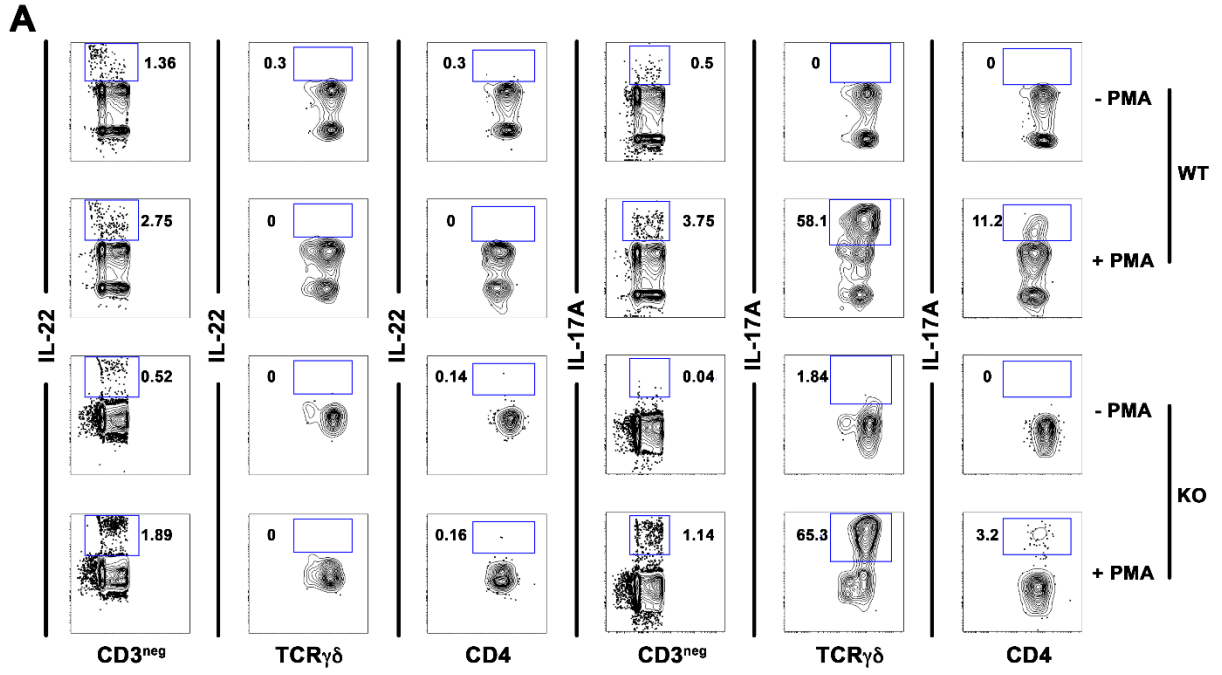


Figure S8. Phenotypic characterization of intrahepatic IL-17 and IL-22 producing cells during chronic liver injury.

(A) Representative FACS plot showing production of IL-22 and IL-17A by CD3^{neg}, TCR $\gamma\delta$ and CD4 T cells extracted from the liver of WT littermates (top panel) and IL-22RA1 knockout (bottom panel) after CCl₄ injury. **(B)** Frequency of intrahepatic IL-17A and **(C)** IL-22 producing CD3^{neg}, TCR $\gamma\delta$ (out of CD3⁺ T cells) and CD4 T cells after chronic CCl₄ injury. Error bars, mean \pm s.e.m. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 (ANOVA followed by a post-hoc Tukey).

Table S1. Clinical characteristics and demographics of patients and experiments performed with each sample

Patient	Group	Gender	Age	ALT (IU/mL)	Fibrosis score	FACS (Liver)	FACS (Blood)	IF Panel 1	LegendPlex
LB001	NVH	M	22	339	F0				
LB002	VH	M	53	43	F2				
LB004	NVH/SVR	M	52	252	F0				
LB005	VH	M	42	199	F3				
LB006	NVH	M	63	230	F0				
LB008	NVH	F	59	63	F2				
LB009	VH	F	61	90	F4				
LB010	NVH	F	53	17	F0				
LB011	NVH	F	38	18	F0				
LB012	VH	M	69	54	F3				
LB013	NVH	F	56	56	F4				
LB014	VH	M	59	42	F1				
LB015	NVH	M	51	56	F1				
LB016	NVH	F	65	50	F4				
LB017	NVH	M	33	35	F0				
LB018	VH	M	62	28	F2				
LB019	VH	F	54	102	F2				
LB020	NVH	F	66	118	F1				
LB021	VH	F	52	78	F3				
LB022	VH	F	64	38	F4				
LB024	VH	M	60	100	F4				
LB025	VH	M	35	164	F3				
LB026	NVH	F	65	37	F4				
LB027	NVH	M	76	18	F1				

LB028	NVH	F	31	123	F4				
LB029	NVH	F	49	504	F3				
LB030	VH	M	51	240	F4				
LB031	VH	M	53	217	F4				
LB032	NVH	M	49	111	F3				
LB033	VH	M	54	21	F2				
LB034	VH	F	31	29	F2				
LB035	VH	M	52	132	F4				
LB041	VH	M	37	N/D	F3				
LB042	NVH	M	55	109	F3				
LB043	NVH	M	42	109	F2				
LB044	VH	M	59	16	F4				
LB045	NVH	F	49	30	F2				
LB046	NVH	M	54	46	F3				
LB047	NVH	M	66	100	F0				
LB048	NVH	F	29	78	F1				
LB049	VH	F	58	107	F4				
LB050	NVH	F	52	117	F4				
LB051	NVH	M	62	53	F2				
LB052	NVH	F	32	99	F2				
LB053	NVH	F	49	44	F0				
LB054	NVH	M	41	249	F3				
LB055	NVH	M	34	180	F1				
LB056	NVH	M	40	85	F2				
LB058	NVH	M	57	18	F4				
LB059	NVH	M	52	66	F0				
LB060	NVH	F	68	49	F3				
LB061	NVH	M	31	161	F2				

LB063	NVH	F	42	94	F4				
LB064	NVH	M	72	10	F3				
LB066	NVH	F	54	68	F2				
LB068	VH	M	50	73	F2				
LB069	NVH	F	35	24	F3				
LB071	NVH	F	73	86	F4				
LB072	NVH	F	57	83	F3				
LB073	NVH	F	33	13	F3				
LB074	NVH	M	38	46	F2				
LB075	NVH	F	52	50	F2				
Total n= 62	VH n=20 NVH n=42	M n=34 F n=28				n=34	n=29	n=28	n=30

VH=Viral-hepatitis, NVH=non-viral hepatitis, SVR=sustain virological response

Grey: no sample available for this assay

Black: excluded (bad quality of sample)

Blue: analyzed sample

IV. Chapitre 4 : Manuscript 2

L-17A ENHANCES THE EXPRESSION OF PROFIBROTIC GENES THROUGH UPREGULATION OF THE TGF-B RECEPTOR ON HEPATIC STELLATE CELLS IN A JNK-DEPENDENT MANNER

(Journal of Immunology, 2014)

Author's contribution to the manuscript "IL-17A Enhances the Expression of Pro-fibrotic Genes through Upregulation of the TGF- β Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-dependent Manner"

Author contributions: Naglaa Shoukry (N.H.S.), Thomas Fabre (T.F.) and Scott L. Friedman (S.L.F.) conceived the study. T.F., N.H.S. and S.L.F designed the experiments. T.F. performed all experiments. Hassen Kared (H.K.) shared in the optimization of flow cytometry experiments and generation of preliminary data. T.F. analyzed the data. S.L.F provided primary human HSCs. T.F., S.L.F. and N.H.S. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript for intellectual content and approved the final version.

IL-17A Enhances the Expression of Pro-fibrotic Genes through Upregulation of the TGF- β Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-dependent Manner

Running Title: IL-17A enhances the fibrogenic effect of TGF- β on HSCs

Thomas Fabre^{* ‡}, Hassen Kared^{*}, Scott L. Friedman[†] and Naglaa H. Shoukry^{* §}

* Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada.

† Division of Liver Diseases, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY, USA.

‡ Département de microbiologie, infectiologie et immunologie and § Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Footnotes

¹This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (HEO-115696) to NHS and The National Institutes of Health (NIH) (DK56621 and AA020709) to SLF. TF is the recipient of fellowships from the Fondation Gabriel Marquis, the Université de Montréal and the National CIHR Research Training Program on Hepatitis C (NCRTP-Hep C) and CIHR. NHS is the recipient of a Chercheur Boursier salary award from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S).

² Address correspondence and reprint requests to:

Dr. Naglaa H. Shoukry
Centre de Recherche du CHUM
Tour Viger, Local R09.414
900 rue St-Denis
Montréal, QC H2X 0A9
CANADA
Tel: (514) 890-8000 ext 35235

Fax: (514) 412-7936

e-mail: Naglaa.shoukry@umontreal.ca

³ **Abbreviations used in this article:** α -SMA: alpha-smooth muscle actin; ACTA2: gene coding for alpha-smooth muscle actin; COL1A1: gene coding for collagen type I; ECM: extracellular matrix; HBV: Hepatitis B virus; HSCs: Hepatic stellate cells, MMPs: matrix metalloproteinases, PDGF: platelet-derived growth factor; TIMPs: tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, Tregs: regulatory T cells.

Abstract

Activation of hepatic stellate cells (HSCs) is a key event in the initiation of liver fibrosis, characterized by enhanced extracellular matrix (ECM) production and altered degradation. Activation of HSCs can be modulated by cytokines produced by immune cells. Recent reports have implicated the pro-inflammatory cytokine IL-17A in liver fibrosis progression. We hypothesized that IL-17A may enhance activation of HSC and induction of the fibrogenic signals in these cells. The human HSC line LX2 and primary human HSCs were stimulated with increasing doses of IL-17A and compared to TGF- β and PBS-treated cells as positive and negative controls, respectively. IL-17A alone did not induce activation of HSC. However, IL-17A sensitized HSCs to the action of suboptimal doses of TGF- β as confirmed by strong induction of alpha-smooth muscle actin (α -SMA), collagen type I (COL1A1) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase I (TIMP-I) gene expression and protein production. IL-17A specifically upregulated the cell surface expression of TGF- β -RII following stimulation. Pretreatment of HSCs with IL-17A enhanced signaling through the TGF- β -RII as observed by increased phosphorylation of SMAD2/3 in response to stimulation with suboptimal doses of TGF- β . This enhanced TGF- β response of HSCs induced by IL-17A was JNK-dependent. Our results suggest a novel pro-fibrotic function for IL-17A by enhancing the response of HSCs to TGF- β through activation of the JNK pathway. IL-17A acts through upregulation and stabilization of the TGF- β -RII leading to increased SMAD2/3 signaling. These findings represent a novel example of cooperative signaling between an immune cytokine and a fibrogenic receptor. (246 words)

Introduction

The activation of hepatic stellate cells (HSCs) is a key event in liver fibrosis (16). HSCs are activated by inflammatory signals, such as apoptotic bodies, reactive oxygen species (ROS) and cytokines released in the milieu, including transforming growth factor beta (TGF- β) which is considered the major pro-fibrotic cytokine (10, 34). Activated HSCs (aHSCs) undergo myoblastic transformation and upregulate alpha smooth muscle actin (α -SMA) expression. They produce increased amounts of extracellular matrix (ECM) components such as collagen type I

and fibronectin (10). aHSCs also secrete matrix metalloproteinases (MMPs) that can degrade ECM (30) as well as tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMPs) (26). It is the imbalance between these two pathways that leads to the accumulation of collagen type I in the interstitial space of the liver and fibrosis.

TGF- β induces the activation of HSCs through the SMAD2/3 signaling pathway (12, 17). Phosphorylation of these SMADs leads to transcription of pro-fibrotic molecules and activation of other transcription factors associated with liver fibrosis progression. In the liver, TGF- β is mainly produced by activated macrophages, regulatory T cells (Tregs) and aHSCs in response to pro-inflammatory signals. Therefore, regulation of TGF- β metabolism and signaling pathways plays an important role in modulating liver fibrosis progression.

Liver fibrosis can also be modulated by innate and adaptive immunity directly through cell-cell interaction or indirectly *via* the secretion of cytokines (2). Individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV) progress more rapidly to advanced stages of liver fibrosis and this progression correlates with the decline in CD4 T cell counts suggesting that CD4 T cells and the cytokines they produce may regulate activation of HSC. Indeed, Th1 cytokines like IFN- γ are anti-fibrotic whereas the Th2 cytokines IL-4 and IL-13 lead to direct HSC activation and enhance fibrosis by inducing TGF- β and platelet-derived growth factor (PDGF) secretion by macrophages (1, 2, 7). Furthermore, Tregs can induce the senescence of HSCs through IL-10 secretion and, therefore, are considered anti-fibrotic (25, 39, 40). However, the implication of other CD4 helper T cell populations is not well understood.

Th17 cells, a subpopulation of CD4 helper T cells, are important in mucosal immunity and defence against bacterial, viral and fungal pathogens. They develop from naïve CD4 T cells in response to the inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TGF- β and require IL-23 to become fully mature effectors (5, 19). Th17 cells secrete pro-inflammatory cytokines such as IL-17A, IL-17F and TNF- α as well as the anti-inflammatory cytokine IL-22. IL-17 and IL-22 producing Th17 cells are enriched in the liver as compared to peripheral blood (3, 9). IL-17-producing cells were linked to liver fibrosis progression in different liver pathologies including alcoholic hepatitis and hepatitis B virus (HBV) infection (20, 38). IL-17A induces chemokine secretion

by HSCs and hepatocytes, which include IL-8 and growth regulated protein alpha (GRO- α) that are important in the recruitment of pro-fibrotic macrophages, monocytes and neutrophils (20). Furthermore, signals induced by the IL-17 receptor complex IL-17RA/IL-17RC in different cell types, including HSCs, lead to activation of the intracellular factors NF κ B, JNK, MAPK and STAT3, which are all linked to inflammation and liver fibrosis progression (11, 18, 24, 31, 32). IL-17A also enhances liver fibrosis through activation of macrophages leading to production of pro-fibrotic cytokines such as IL-6, TNF- α , TGF- β and PDGF (2, 37). Using IL-17RA^{-/-} knockout mice, it was demonstrated *in vivo* that specific depletion of the IL-17RA on macrophages results in reduced liver fibrosis (37).

In this study, we have developed an *in vitro* fibrosis assay based on the quantification of pro-fibrotic markers α -SMA, collagen type I and TIMP-I produced by the hepatic stellate cell line (LX2) or primary human HSCs. This model was used to assess the molecular mechanisms and the direct fibrotic functions of IL-17A on HSCs. Using a combination of qRT-PCR, western blot, picro-Sirius red staining and flow cytometry, we have demonstrated that IL-17A has pro-fibrotic properties. This cytokine enhances the response of HSCs to the major pro-fibrotic cytokine TGF- β by upregulating the expression of the TGF- β -RII on the surface of HSCs in a JNK-dependent manner.

Materials and Methods

Antibodies

For flow cytometry, directly conjugated antibodies against TGF- β -RII-PE (R&D Systems, Minneapolis, MN) and CD217 (IL-17RA)-APC (clone 424LTS) (eBioscience, San Diego, CA) were used. For western blot, antibodies against the following molecules were used: TIMP-I (clone 2E7.1) (ABCAM, Cambridge, MA), MMP-2 (clone 6E3F8) (ABCAM, Toronto, ON), α -SMA (clone 1A4) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), SMAD3 (clone C69H7) (Cell signaling Technology, Danvers, MA), Phospho-SMAD2/3 (clone C25A9) (Cell signaling Technology) and GAPDH (clone 6C5) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA.).

Cell culture

The human HSC line LX2 and primary human HSCs were used as previously described (25). LX2 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) (Wisent Inc, St-Bruno, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (HyClone, Nepean, ON) and GlutaMAXTM (Life Technologies, Burlington, ON). For all experiments, LX2 cells were seeded at 2×10^4 cells/well in a 48-well plate, 2×10^5 cells/well in a 6-well plate or 1×10^5 cells/well in a 12-well plate. When cells reached 70% confluence, they were serum-starved in DMEM supplemented with GlutaMAXTM without FBS for 48 h prior to a 48 h stimulation in serum-free conditions.

Cytokines

Recombinant human IL-17A and TGF- β were obtained from R&D systems Inc.

Quantitative real-time RT-PCR

After stimulation, total RNA from the LX2 cells was extracted using the *realtime ready cell lysis kit* (Roche). cDNAs were generated with the *transcriptor universal cDNA* (Roche) kit with DNase I treatment, then diluted in ultrapure water (Roche) at a ratio of 1:5 and amplified using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master kit on a LightCycler[®] 480 (Roche). Relative expression of the pro-fibrotic genes ACTA2, COL1A1, TIMP-I and TGFβ1 were measured and normalized to ribosomal 28s rRNA expression. Standard curves were generated for each gene, to determine the reaction efficiency. We used the advanced relative quantification method from Roche, according to this formula: efficacy of target gene^{-ΔCp} / efficacy of housekeeping gene^{-ΔCp}. Primer sequences are listed in Table 1. TGFβ1 primers were purchased from Qiagen ([Hs_TGFB1_1_SG QuantiTect Primer Assay](#))

Western blotting

After stimulation, cells were lysed with RIPA Buffer (NaCl, Nonidet N-40 (NP40), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Tris-HCL buffer pH=8) in presence of protease and phosphatase inhibitors (Roche). For detection of α-SMA, MMP-2 and TIMP-I, 20μg of total proteins, quantified using a Bradford assay, were loaded on a 20% polyacrylamide gel, and then transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). For detection of SMAD2/3 and phospho-SMAD2/3, only 10μg of total proteins were used. Blots were incubated with primary antibody overnight at 4°C and then with secondary HRP-conjugated antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) at RT for 1h. Blots were developed with the ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). GAPDH was used as a loading control.

Picro-Sirius red staining and immunofluorescence

5x10⁵ LX2 cells were cultured in an 8 chamber slide (BD Biosciences, San José, CA), to 70% confluence. Cells were then serum-starved for 48 h followed by another 48 h stimulation in serum-free conditions. Collagen type I production was measured by picro-Sirius red staining. Where cells were fixed in an acetone bath at -20°C for 15 min. Slides were incubated for 1h in

picro-Sirius red (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO), washed 2 times in 0.05% glacial acetic acid. Sirius red quantification was performed on 3 different areas per condition using Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA). For immunofluorescence, cells were fixed in a 20% acetone, 80% methanol bath at -20°C for 15 min. Slides were blocked in PBS 1% BSA for 1h then incubated 1h with anti-phospho-SMAD2/3 (clone C25A9) followed by a 1h incubation with goat anti-rabbit-Alexa-488 (Life Technologies). Slides were then mounted with ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Life Technologies). Images acquisition and analysis was performed on a Zeiss Axio Imager M2 using Zen software (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON).

Flow cytometry analysis

LX2 cells were detached using Versene (Life technologies), washed twice in Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) buffer (PBS 1X, 1% FBS, 0.02% sodium azide) and incubated for 30 min incubation with the antibodies. Cells were then washed in FACS buffer and fixed with fixation buffer (PBS 1X, 1% Formaldehyde). Data acquisition was performed on a BD-LSRII equipped with blue (488nm), red (633nm) and violet (405nm) lasers using FACSDIVA software (version 5.0.3) (BD Biosciences). FACS analysis was performed on FlowJo software (version 9.4.11) for Mac (Tree Star, Ashland, OR).

Statistical analysis

All data were analysed using GraphPad Prisms 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) and differences between the means for each condition were evaluated by a one-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test.

Results

IL-17A synergizes with TGF- β to induce hepatic stellate cell activation

To evaluate the effect of IL-17A on HSCs, we stimulated LX2 cells for 48h with a low dose of 1 ng/mL and a high non-physiological dose of 40 ng/mL of IL-17A (referred to hereafter as IL-17A^{lo} and IL-17A^{hi}, respectively). Cells stimulated with TGF- β or PBS were used as positive and negative controls, respectively. Using a range from 0.1 to 10 ng/mL, we determined that TGF- β induced a plateau of activation at 2.5 ng/mL (referred to as TGF- β ^{hi}) (data not shown). We also tried different times of stimulation (4 h and 24 h) but we have observed significant changes only at 48 h of stimulation (Data not shown). TGF- β ^{hi} induced a 5-fold increase in the expression of COL1A1 (collagen type I), ACTA2 (α -SMA) and TIMP-I genes as compared to PBS-treated cells (n=3, p<0.0001) (Figure 1A). Increased production of α -SMA and TIMP-I proteins was also observed by western blot (Figure 1B). Similarly, picro-Sirius red staining showed a 4-fold increase in collagen type I production in the TGF- β ^{hi}-treated as compared to the PBS-treated LX2 cells (n=3, p<0.05) (Figure 1D and F). We also used a suboptimal dose of TGF- β (0.5 ng/mL), referred to as TGF- β ^{lo}, that induces intermediate activation of HSC with a 2-fold increase in COL1A1 (n=3, p<0.001) and TIMP-I (n=3, p<0.05) mRNA. This dose also induced low levels of α -SMA protein as measured by western blot, and weak picro-Sirius red staining. IL-17A alone, at both low and high doses, was insufficient to activate LX2 cells. No significant increase in pro-fibrotic markers was observed as compared to PBS-treated cells at neither the mRNA (Figure 1A) nor the protein level (Figure 1B, D and F). IL-17A at both doses induced strong expression of TGF- β 1 gene (Supplementary Figure S1), as previously described (24, 35). Similar results were observed with shorter stimulation time (Data not shown). However, we observed strong activation of LX2 cells, similar to TGF- β ^{hi}, when IL-17A was combined with a suboptimal TGF- β ^{lo} dose. A 5-fold increase in COL1A1 (n=3, p<0.0001), ACTA2 (n=3, p<0.0001) and TIMP-I (n=3, p<0.0001) expression was measured by qRT-PCR when compared to PBS-treated cells. Furthermore, an increase of over 2-fold (n=3, p<0.0001, represented by white asterisks) was observed when compared to TGF- β ^{lo} alone (Figure 1A). These transcription profiles were validated at the protein level. A strong production

of α -SMA and TIMP-I was observed by western blot in LX2 cells treated with IL-17A and TGF- β^{10} (Figure 1B). Finally, collagen type I production was also higher (n=3, p<0.05) when compared to both TGF- β^{10} - and PBS-treated LX2 cells (Figure 1D and F). Altogether these results suggest that IL-17A alone is not sufficient to prime LX2 cell activation. However, this cytokine can act in synergy with TGF- β to induce the fibrogenic process.

IL-17A pro-fibrotic function is validated in primary human hepatic stellate cells

Next, we validated our results using primary human HSCs. Similar to previous reports, TIMP-I and MMP-2 expression were higher by primary HSCs than LX2 cells (36). IL-17A at both doses did not induce α -SMA, collagen type I, MMP-2 or TIMP-I. However, the addition of IL-17A to suboptimal TGF- β^{10} dose led to strong induction of α -SMA and TIMP-I (Figure 1C) observed by western blot, as compared to PBS- or TGF- β^{10} - treated HSCs. picro-Sirius red staining demonstrated a similar effect on collagen type I production by primary HSCs (Figure 1E). However, these cells were more sensitive to TGF- β^{10} than LX2 cells, as we observed a 3-fold increase in picro-Sirius red stain with TGF- β^{10} alone. The addition of IL-17A to TGF- β^{10} still induced a 5-fold increase in picro-Sirius red stain (Figure 1F) and was significantly higher than TGF- β^{10} alone (p<0.05). Thus, our observations underscore again a synergetic effect between IL-17A and TGF- β , which validated our results obtained with the LX2 cell line.

Blockade of TGF- β receptor I and II-associated kinase abrogates the enhanced activation of HSCs by IL-17A and TGF- β

Next, we sought to determine if the IL-17A pro-fibrotic effect is mediated through increased response of HSCs to TGF- β . We used Ly2109761, a specific inhibitor of kinases associated to both the TGF- β -RI and TGF- β -RII subunits (23). This reagent interferes with TGF- β signaling by decreasing the phosphorylation of SMAD2/3 and has no effect on IL-17A signaling (Supplementary Figure S2). We determined the optimal concentration of Ly2109761 to be 100 μ M (data not shown). The addition of Ly2019761 abrogated the transcription of COL1A1, ACTA2 and TIMP-I (n=3, p<0.0001), which is normally observed with the combination of IL-17A with TGF- β^{10} stimulation (Figure 2A). Furthermore, COL1A1, ACTA2 and TIMP-I

transcription was lower in the presence of the inhibitor than in PBS-treated cells. Inhibition of pro-fibrotic gene expression induced by Ly2109761 was higher than 95% (data not shown). These results were validated at the protein level by western blot. Upregulation of TIMP-I and α -SMA induced by IL-17A at both doses in combination with TGF- β^{lo} was lost by the addition of Ly2109761 (Figure 2B). Altogether, these results prove that TGF- β signaling is required for the enhancement of HSC activation observed in LX2 cells stimulated with IL-17A and suboptimal doses of TGF- β .

IL-17A induces the upregulation of TGF- β -RII expression on the surface of LX2 cells

We then explored the mechanisms by which IL-17A enhances response to TGF- β . First, we evaluated the cell surface expression of TGF- β -RII and IL-17RA upon cytokine stimulation. Flow cytometry analysis was performed on PBS-, IL-17A- and/or TGF- β -treated cells for 48 h. Summary of 5 independent experiments are presented as average fold change in the mean fluorescence intensity (MFI) between PBS- versus cytokine-stimulated cells. No significant variation in IL-17RA expression was observed (n=5, p=0.243) (Figure 3C) but the cell surface expression of TGF- β -RII was significantly altered (n=5, p=0.0002). TGF- β stimulation induced a decrease in TGF- β -RII cell surface expression which was significant at high but not at low doses (n=5, p<0.05) (Figure 3A and B). This indicates that LX2 cells respond to TGF- β , and through feedback mechanisms, downregulate the cell surface expression of its receptor. IL-17A upregulated the cell surface expression of TGF- β -RII when compared to PBS-treated HSCs (n=5, p<0.01) (Figure 3A and B). LPS-induced upregulation of TGF- β -RII was tested as a positive control and was similar to that of IL-17A (data not shown) (29). We also determined if IL-17A could prevent the downregulation of the TGF- β -RII expression induced by TGF- β . Therefore, we performed LX2 cell stimulation with TGF- β^{hi} and TGF- β^{lo} in combination with IL-17A. After 48 h of stimulation, IL-17A significantly prevented downregulation of the TGF- β -RII induced by both doses of TGF- β (n=5, p<0.05) (Figure 3B). These results indicate that IL-17A can partially prevent TGF- β -RII downregulation induced by TGF- β and might lead to increased or sustained signaling.

IL-17A increases the phosphorylation of SMAD2/3 in response to suboptimal doses of TGF- β

In order to determine if the IL-17A-mediated upregulation of TGF- β -RII could enhance HSCs response to TGF- β , we evaluated if IL-17A could modulate the activation of the SMAD2/3 pathway. LX2 cells were stimulated for 24 h with or without IL-17A at both doses followed by 15 min stimulation with suboptimal TGF- β^{lo} . The phosphorylation of SMAD2/3 at serine 423/425 was evaluated by western blot, and compared to TGF- β^{hi} . No phosphorylation of SMAD2/3 was observed when cells were treated with IL-17A alone. A low, almost undetectable, level of phosphorylation was induced by TGF- β^{lo} as compared to TGF- β^{hi} (Figure 3D, left and right panels). However, similar to TGF- β^{hi} , robust phosphorylation of SMAD2/3 was observed in LX2 cells stimulated with IL-17A at both doses prior to exposure with TGF- β^{lo} (Figure 3D). The level of total SMAD2/3 was increased in LX2 cells treated with IL-17A^{hi}, which was not observed with IL-17A^{lo} (Figure 3D, right panel). We validated our results by confocal microscopy and observed increased phosphorylation of SMAD2/3 in TGF- β^{hi} and IL-17A prestimulated cells. However, the localization of SMAD2/3 was different with higher nuclear localization in IL-17A-stimulated cells (Figure 3E, Supplementary Figure S3A). These data correlate with the synergistic effect observed between IL-17A and TGF- β^{lo} (Figure 1), as well as the upregulation of TGF- β -RII cell surface expression induced by IL-17A (Figure 3A and B).

IL-17A enhances response of LX2 cells to TGF- β in a JNK-dependent manner

The increased nuclear localization of SMAD2/3 when HSCs were stimulated with IL-17A led us to investigate the activation of the JNK pathway. It was previously demonstrated that the activation of JNK enhances phosphorylation and nuclear translocation of SMAD2/3 leading to increased fibrosis (21, 33). We confirmed by western blot that IL-17A alone induces phosphorylation of JNK (Figure 4A). We next proceeded to inhibit the phosphorylation of JNK using the chemical inhibitor, SP600125 which was previously shown to inhibit liver fibrosis (4, 15, 18, 22). We determined the optimal concentration of SP600125 to be 10 μ M (Data not shown). Blockade of the JNK pathway prevented the induction of pro-fibrotic gene expression (Data not shown) as well as protein production in response to IL-17A with suboptimal TGF- β^{lo} (Figure 4B). We also observed no significant variation in the gene expression profiles of

COL1A1, ACTA2 and TIMP-I in LX2 cells stimulated with TGF- β alone in presence or absence of SP600125 (Data not shown). This suggests that SP600125 had no to little direct effect on the response to TGF- β itself. Moreover, inhibition of JNK blocked the upregulation of TGF- β -RII induced by IL-17A (Figure 4C and D). This observation correlated with a loss of increased phosphorylation of SMAD2/3, observed by western blot and immunofluorescence staining, after stimulation with IL-17A and suboptimal TGF- β ^{lo} (Figure 4E and F, Supplementary Figure S3A,S3B). Interestingly, we observed by confocal microscopy, a low level of phosphorylated SMAD2/3 in IL-17A/TGF- β ^{lo} stimulated HSCs, which was exclusively localized to the cytoplasm. This suggests that IL-17A enhanced HSCs response to TGF- β by the activation of the JNK pathway.

Discussion

We have examined the pro-fibrogenic effect of IL-17A on both the LX2 cell line and primary human HSCs. We demonstrate that IL-17A alone was not sufficient to induce α -SMA, collagen type I and TIMP-I production. However, IL-17A enhanced stellate cell responses to TGF- β by increasing cell surface expression of its receptor which led to increased phosphorylation and nuclear translocation of the transcription factors SMAD2/3 in response to suboptimal doses of TGF- β . Furthermore, we demonstrated that this phenotype was dependent on the activation of the JNK pathway by IL-17A.

We also investigated if IL-17A can directly induce pro-fibrotic genes within HSCs. We demonstrated that IL-17 could not induce COL1A1, ACTA2 and TIMP-I gene or protein expression in LX2 cells or primary human HSCs. These results differ from recent reports suggesting that IL-17A can directly enhance the transcription of pro-fibrotic genes in HSCs (24, 32). However, these two studies attributed this function to two different pathways (MAPK or STAT3). These discrepancies could also be explained by differences in the experimental conditions. In these two reports, the authors stimulated HSCs for 2-8 h which in our hands did not show any effect (Data not shown). This is why we chose to stimulate our cells for 48 h based on a previous report showing that efficient IL-17A signaling is observed after a minimum of 24

h (42). Furthermore, we performed all stimulations on serum-starved cells in order to eliminate the presence of TGF- β found in FBS. On the other hand, our results are concordant with other groups that demonstrated that IL-17A did not induce the expression of pro-fibrotic genes but rather the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines involved in the recruitment of macrophages, neutrophils and monocytes (13, 20, 37). Dermal fibroblasts were also reported to produce pro-inflammatory cytokines and chemokines in response to IL-17A without producing pro-fibrotic molecules such as collagen type I (6).

IL17A can also enhance fibrosis indirectly by inducing expression of TGF- β 1 (24, 35). We also observed that IL-17A induces TGF- β 1 expression in a dose-dependent manner on LX2 cells which suggest complementary effect of those two cytokines. In mice, specific knockdown of IL-17RA on macrophages strongly reduced liver fibrosis, whereas modest reduction was observed if knockdown is performed on liver resident cells (37). Indeed, IL-17A can induce the production of the two major pro-fibrotic cytokines PDGF and TGF- β with other inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α by macrophages, neutrophils and monocytes (2, 13, 20). Furthermore, inflammatory cytokines during hepatitis lead to activation of dendritic cells (DCs) and monocytes. Activated DCs and monocytes then secrete key cytokines involved in the differentiation and activation of Th17 cells. Finally, liver inflammation leads not only to cytokine production but also to increased chemokine production by activated DCs, monocytes and hepatocytes, such as CCL20, CCL22 and CCL17, which are involved in the recruitment of Th17 cells to the liver (14). This suggests a possible interaction between IL-17A and TGF- β -producing cells and requires further investigation in in vivo models of fibrosis.

We demonstrated that IL-17A enhances the response of both LX2 cells and primary human HSCs to suboptimal doses of TGF- β . We observed robust production of pro-fibrotic genes after stimulation of HSCs with IL-17A in combination with TGF- β suggesting a synergistic effect between those two cytokines. Blockade of TGF- β -R associated kinase prevented the induction of pro-fibrotic genes during IL-17A/TGF- β ¹⁰ stimulation which indicates that this phenotype is dependent on TGF- β signaling. The flow cytometry analysis of IL-17RA and TGF- β -RII showed that both receptors were expressed by HSCs. Cytokine stimulation did not affect the cell surface expression of IL-17RA. However, after IL-17A

stimulation we observed increased cell surface expression of TGF- β -RII as well as prevention of its downregulation induced by TGF- β . It was also recently demonstrated that IL-17A increases PDGF-R expression in gut smooth muscle cells and may suggest that IL-17A can modulate expression of different growth factor receptor (27). In addition, we showed in IL-17A-stimulated HSCs increase phosphorylation and nuclear translocation of SMAD2/3 in response to suboptimal TGF- β . Thus, IL-17A is a pro-fibrotic cytokine that contributes to the regulation of the fibrogenic process by increasing the TGF- β response at several cellular levels in HSCs. Similar collaborations between two distinct signaling pathways were reported to enhance liver fibrosis and activation of HSCs (28). Altogether, these findings suggest that many interactions between fibrotic pathways are yet to be discovered.

The JNK pathway is one of the key fibrogenic and inflammatory pathways in the liver and can be activated by several cytokines including IL-17A (8, 11, 18, 22). JNK deficient mice exhibit reduced fibrosis after CCL4-treatment and purified HSCs from these mice are less responsive to activation signals (41). JNK plays an important role in regulating response to TGF- β through modulation of the phosphorylation and nuclear translocation of SMAD2/3 (21, 33). Furthermore, TGF- β itself induces late activation of JNK leading to a second round of activation of SMAD2/3 which correlates with increase fibrosis (33). We observed activation of JNK and increase nuclear translocation of SMAD2/3 in IL-17A-stimulated HSCs after only 15 min stimulation with TGF- β suggesting that IL-17A was responsible for this phenotype. Blocking JNK with a chemical inhibitor abrogated induction of pro-fibrotic genes, upregulation of the TGF- β -RII and increased phosphorylation of SMAD2/3 after IL-17A with suboptimal TGF- β stimulation. Thus, IL-17A enhanced the response of HSCs to TGF- β in a JNK-dependent manner that may lead to increased fibrosis.

In conclusion, we have demonstrated that IL-17A is a pro-fibrotic cytokine with no direct fibrogenic effect on HSCs. However, IL-17A enhances the response of HSCs to TGF- β leading to increased production of collagen type I, α -SMA and TIMP-I. IL-17A may also enhance liver fibrosis indirectly via other mechanisms. First, it induces the recruitment of pro-inflammatory macrophages by increasing chemokine secretion by HSCs (20). IL-17A then activates these newly recruited macrophages to produce pro-fibrotic cytokines including TGF-

β (24, 37). IL-17A also induces TGF- β by fibrotic cells including HSCs (24, 35). Finally, IL-17A enhances HSCs response to TGF- β by upregulating its receptor expression at the cell surface, in a JNK dependant manner, leading to increased fibrosis. Further studies should determine the interactions and cellular pathways involved in the cross-talk between TGF- β -producing cells, HSCs and IL-17A-producing cells, such as Th17, NK and NKT cells, during chronic hepatitis. Finally, functionnal characterization of intrahepatic versus peripheral blood Th17 during liver injury and inflammation should be studied in order to validate our *in vitro* data.

References

1. **Baroni, G. S., L. D'Ambrosio, P. Curto, A. Casini, R. Mancini, A. M. Jezequel, and A. Benedetti.** 1996. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* **23**:1189-1199.
2. **Barron, L., and T. A. Wynn.** 2011. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **300**:G723-728.
3. **Bensch, B., B. Seigel, T. Flecken, J. Wolanski, H. E. Blum, and R. Thimme.** 2012. Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**:5438-5447.
4. **Bennett, B. L., D. T. Sasaki, B. W. Murray, E. C. O'Leary, S. T. Sakata, W. Xu, J. C. Leisten, A. Motiwala, S. Pierce, Y. Satoh, S. S. Bhagwat, A. M. Manning, and D. W. Anderson.** 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:13681-13686.
5. **Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo.** 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**:1051-1057.
6. **Brembilla, N., E. Montanari, M. E. Truchetet, E. Raschi, P. Meroni, and C. Chizzolini.** 2013. Th17 cells favor inflammatory responses while inhibiting type I collagen deposition by dermal fibroblasts: differential effects in healthy and systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis research & therapy* **15**:R151.
7. **Chiaramonte, M. G., D. D. Donaldson, A. W. Cheever, and T. A. Wynn.** 1999. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation* **104**:777-785.
8. **Das, M., G. Sabio, F. Jiang, M. Rincon, R. A. Flavell, and R. J. Davis.** 2009. Induction of hepatitis by JNK-mediated expression of TNF-alpha. *Cell* **136**:249-260.

9. **Foster, R. G., L. Golden-Mason, A. Rutebemberwa, and H. R. Rosen.** 2012. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Digestive diseases and sciences* **57**:381-389.
10. **Friedman, S. L.** 2008. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**:1655-1669.
11. **Gaffen, S. L.** 2009. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology* **9**:556-567.
12. **Greene, R. M., P. Nugent, P. Mukhopadhyay, D. R. Warner, and M. M. Pisano.** 2003. Intracellular dynamics of Smad-mediated TGFbeta signaling. *Journal of cellular physiology* **197**:261-271.
13. **Guillot, A., N. Hamdaoui, A. Bizy, K. Zoltani, R. Souktani, E. S. Zafrani, A. Mallat, S. Lotersztajn, and F. Lafdil.** 2013. Cannabinoid receptor 2 counteracts interleukin-17-induced immune and fibrogenic responses in mouse liver. *Hepatology*.
14. **Hammerich, L., F. Heymann, and F. Tacke.** 2011. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clinical & developmental immunology* **2011**:345803.
15. **Heo, Y. S., S. K. Kim, C. I. Seo, Y. K. Kim, B. J. Sung, H. S. Lee, J. I. Lee, S. Y. Park, J. H. Kim, K. Y. Hwang, Y. L. Hyun, Y. H. Jeon, S. Ro, J. M. Cho, T. G. Lee, and C. H. Yang.** 2004. Structural basis for the selective inhibition of JNK1 by the scaffolding protein JIP1 and SP600125. *The EMBO journal* **23**:2185-2195.
16. **Hernandez-Gea, V., and S. L. Friedman.** 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* **6**:425-456.
17. **Inagaki, Y., and I. Okazaki.** 2007. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. *Gut* **56**:284-292.

18. **Kluwe, J., J. P. Pradere, G. Y. Gwak, A. Mencin, S. De Minicis, C. H. Osterreicher, J. Colmenero, R. Bataller, and R. F. Schwabe.** 2010. Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology* **138**:347-359.
19. **Korn, T., M. Oukka, V. Kuchroo, and E. Bettelli.** 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Seminars in immunology* **19**:362-371.
20. **Lemmers, A., C. Moreno, T. Gustot, R. Marechal, D. Degre, P. Demetter, P. de Nadai, A. Geerts, E. Quertinmont, V. Vercruyse, O. Le Moine, and J. Deviere.** 2009. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* **49**:646-657.
21. **Liu, Q., Y. Zhang, H. Mao, W. Chen, N. Luo, Q. Zhou, W. Chen, and X. Yu.** 2012. A crosstalk between the Smad and JNK signaling in the TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in rat peritoneal mesothelial cells. *PloS one* **7**:e32009.
22. **Marra, F., W. Delogu, I. Petrai, S. Pastacaldi, A. Bonacchi, E. Efsen, S. Aleffi, C. Bertolani, M. Pinzani, and P. Gentilini.** 2004. Differential requirement of members of the MAPK family for CCL2 expression by hepatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **287**:G18-26.
23. **Melisi, D., S. Ishiyama, G. M. Sclabas, J. B. Fleming, Q. Xia, G. Tortora, J. L. Abbruzzese, and P. J. Chiao.** 2008. LY2109761, a novel transforming growth factor beta receptor type I and type II dual inhibitor, as a therapeutic approach to suppressing pancreatic cancer metastasis. *Molecular cancer therapeutics* **7**:829-840.
24. **Meng, F., K. Wang, T. Aoyama, S. I. Grivennikov, Y. Paik, D. Scholten, M. Cong, K. Iwaisako, X. Liu, M. Zhang, C. H. Osterreicher, F. Stickel, K. Ley, D. A. Brenner, and T. Kisseleva.** 2012. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* **143**:765-776 e761-763.
25. **Mentink-Kane, M. M., A. W. Cheever, M. S. Wilson, S. K. Madala, L. M. Beers, T. R. Ramalingam, and T. A. Wynn.** 2011. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology* **141**:2200-2209.

26. **Murphy, G.** 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology* **12**:233.
27. **Nair, D. G., K. G. Miller, S. R. Lourenssen, and M. G. Blennerhassett.** 2014. Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-Rbeta. *Journal of cellular and molecular medicine* **18**:444-454.
28. **Rozenfeld, R., A. Gupta, K. Gagnidze, M. P. Lim, I. Gomes, D. Lee-Ramos, N. Nieto, and L. A. Devi.** 2011. AT1R-CB(1)R heteromerization reveals a new mechanism for the pathogenic properties of angiotensin II. *The EMBO journal* **30**:2350-2363.
29. **Seki, E., S. De Minicis, C. H. Osterreicher, J. Kluwe, Y. Osawa, D. A. Brenner, and R. F. Schwabe.** 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine* **13**:1324-1332.
30. **Siefert, S. A., and R. Sarkar.** 2012. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular* **20**:210-216.
31. **Sparna, T., J. Retey, K. Schmich, U. Albrecht, K. Naumann, N. Gretz, H. P. Fischer, J. G. Bode, and I. Merfort.** 2010. Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF-alpha/IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes. *BMC genomics* **11**:226.
32. **Tan, Z., X. Qian, R. Jiang, Q. Liu, Y. Wang, C. Chen, X. Wang, B. Ryffel, and B. Sun.** 2013. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**:1835-1844.
33. **Wang, X. M., Y. Zhang, H. P. Kim, Z. Zhou, C. A. Feghali-Bostwick, F. Liu, E. Ifedigbo, X. Xu, T. D. Oury, N. Kaminski, and A. M. Choi.** 2006. Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of experimental medicine* **203**:2895-2906.
34. **Weng, H. L., Y. Liu, J. L. Chen, T. Huang, L. J. Xu, P. Godoy, J. H. Hu, C. Zhou, F. Stickel, A. Marx, R. M. Bohle, V. Zimmer, F. Lammert, S. Mueller, M. Gigou, D. Samuel, P. R. Mertens, M. V. Singer, H. K. Seitz, and S. Dooley.** 2009. The etiology of liver

damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology* **50**:230-243.

35. **Wilson, M. S., S. K. Madala, T. R. Ramalingam, B. R. Gochuico, I. O. Rosas, A. W. Cheever, and T. A. Wynn.** 2010. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine* **207**:535-552.

36. **Xu, L., A. Y. Hui, E. Albanis, M. J. Arthur, S. M. O'Byrne, W. S. Blaner, P. Mukherjee, S. L. Friedman, and F. J. Eng.** 2005. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **54**:142-151.

37. **Yan, S., L. Wang, N. Liu, Y. Wang, and Y. Chu.** 2012. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunology and cell biology* **90**:421-428.

38. **Zhang, J. Y., Z. Zhang, F. Lin, Z. S. Zou, R. N. Xu, L. Jin, J. L. Fu, F. Shi, M. Shi, H. F. Wang, and F. S. Wang.** 2010. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **51**:81-91.

39. **Zhang, L., X. Wang, W. Zheng, and M. Shi.** 2006. The effects of interleukin-10 on the expression of Fas and FasL in rat hepatic stellate cells. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* **2**:611-616.

40. **Zhang, L. J., W. D. Zheng, M. N. Shi, and X. Z. Wang.** 2006. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**:1918-1923.

41. **Zhao, G., M. Hatting, Y. A. Nevzorova, J. Peng, W. Hu, M. V. Boekschoten, T. Roskams, M. Muller, N. Gassler, C. Liedtke, R. J. Davis, F. J. Cubero, and C. Trautwein.** 2013. Jnk1 in murine hepatic stellate cells is a crucial mediator of liver fibrogenesis. *Gut*.

42. **Zhao, L., Y. Tang, Z. You, Q. Wang, S. Liang, X. Han, D. Qiu, J. Wei, Y. Liu, L. Shen, X. Chen, Y. Peng, Z. Li, and X. Ma.** 2011. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PloS one* **6**:e18909.

Table 1. Primer sequences for qRT-PCR.

Gene	Primer	Accession Number	Sequence	Amplicon Size
r28S	q-28S-Fwd	NR_003287.2	CGAGATCCCCTGTCCCTA	158bp
	q-28S-Rvs		GGGGCCTCCCCTTATTCTA	
COL1A1	q-COL1A1-Fwd	NM_000088	TCTGCGACAACGGCAAGGTGT	147bp
	q-COL1A1-Rvs		CGACGCCGGTGGTTTCTTGGT	
ACTA2	q-ACTA2-Fwd	NM_001613.2	CCAAGGCCAACC GGGAGAA AATGA	97bp
	q-ACTA2-Rvs		GCATAGAGAGACAGCACCGCCTGG	
TIMP-I	q-TIMP-I-Fwd	NM_003254.2	AATCCGACCTCGTCATCAGG	123bp
	q-TIMP-I-Rvs		ATCCCCTAAGGCTTGGAACC	

Figures

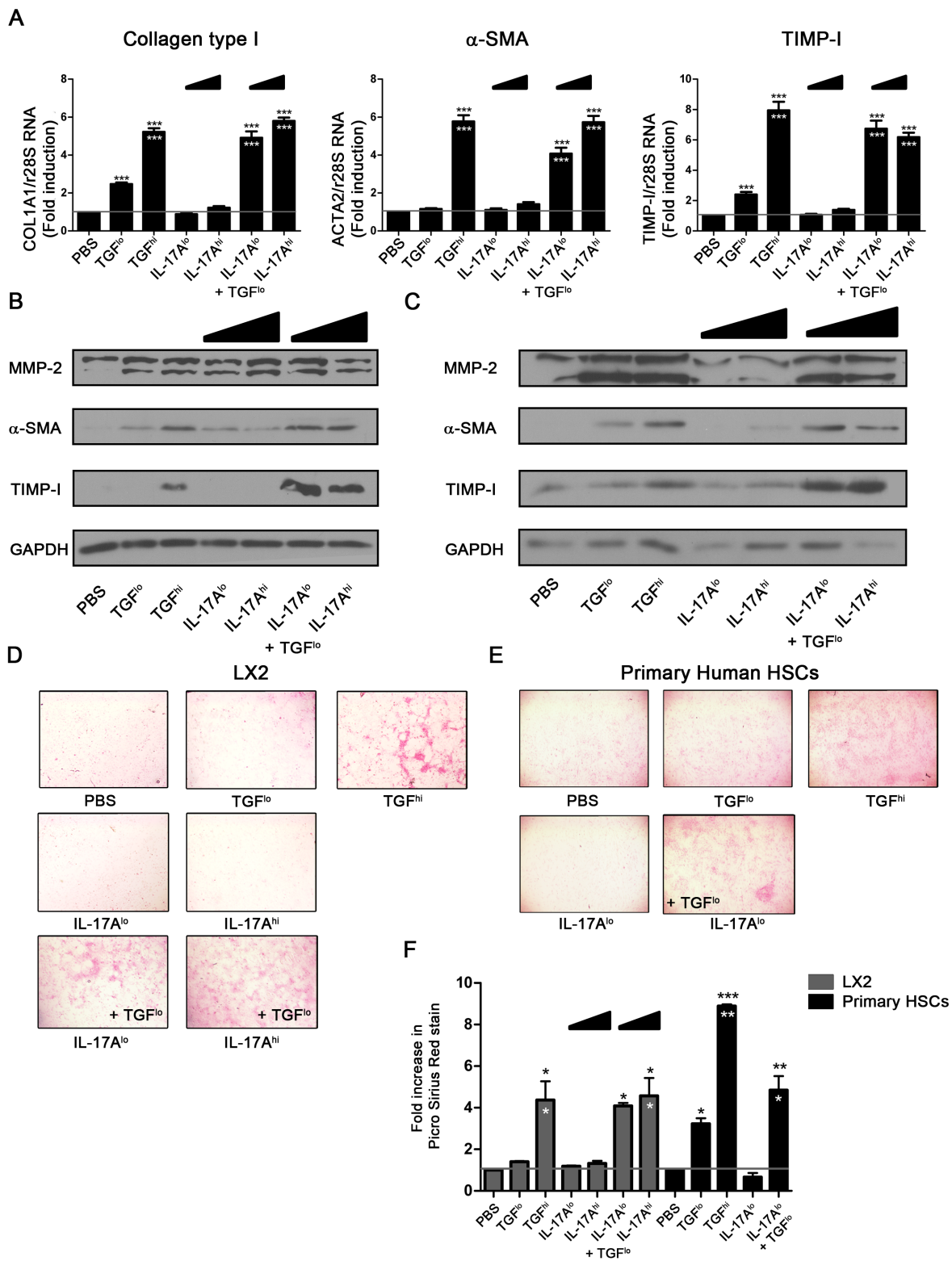
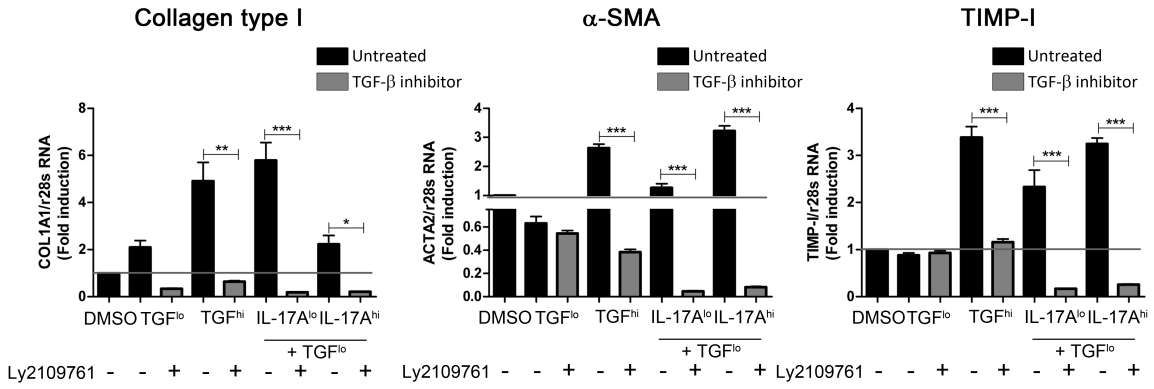


Figure 1: IL-17A enhances the fibrogenic process in LX2 and primary human hepatic stellate cells in response to TGF- β

(A) Relative expression of the pro-fibrotic genes: COL1A1, ACTA2 and TIMP-I by LX2 cells after 48 h stimulation with IL-17A \pm TGF- β was determined by quantitative PCR, and results are shown as fold change compared PBS- versus cytokines-treated LX2 cells. Black stars represent a significant increase compared to PBS-treated cells whereas white stars represent a significant increase compared to cells treated with TGF- β at low dose. Protein expression of α -SMA, TIMP-I and MMP-2 after 48 h stimulation with IL-17A \pm TGF- β was evaluated in LX2 (B) and primary human HSCs (C) by western blot. Collagen type I secretion was measured by Picro-Sirius red staining of LX2 (D) and primary human HSCs (E) after stimulation with IL-17A \pm TGF- β , and relative quantification of Picro-Sirius red staining was performed (F). Figure is representative of 3 independent experiments. One-way ANOVA was used followed by a Tukey post-test, *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

A



B

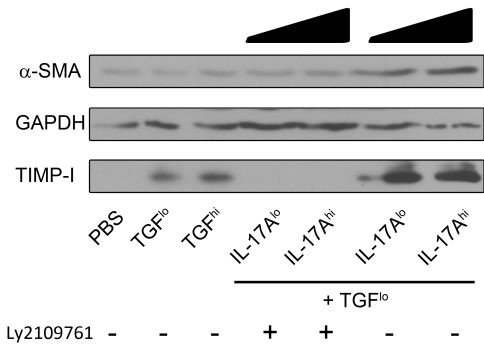


Figure 2: Blockade of TGF- β receptors associated kinase prevents increase response to TGF- β induced by IL-17A

Relative expression of the pro-fibrotic genes: COL1A1, ACTA2 and TIMP-I by LX2 cells after stimulation with IL-17A \pm TGF- β , in presence or absence of the TGF- β receptors kinase inhibitors Ly2109761, was determined by quantitative RT-PCR, and results are shown as fold change compared PBS- versus cytokines-treated LX2 cells (A). Black bar charts represent conditions without Ly2109761 whereas grey bar charts represent conditions with Ly2109761. Ly2109761 prevents TIMP-I and α -SMA increased production induced by IL-17A + TGF- β^{lo} , as shown by western blot (B). One-way ANOVA was used followed by a Tukey post-test, *, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

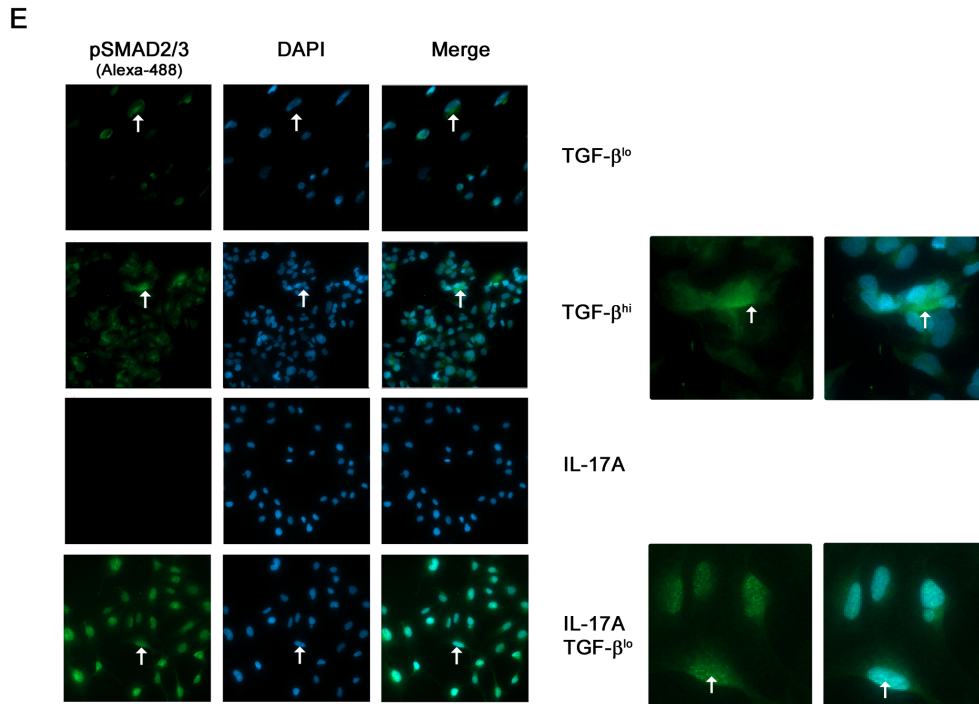
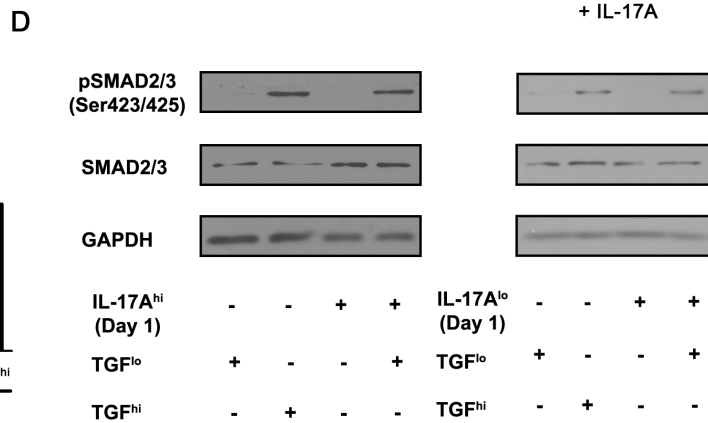
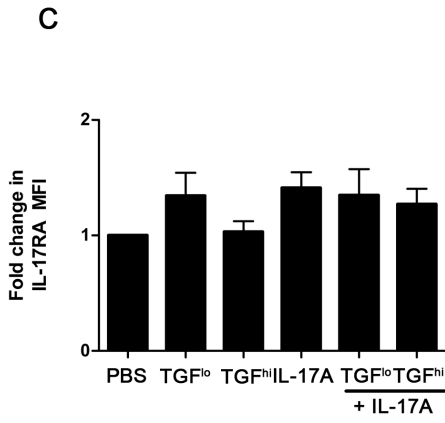
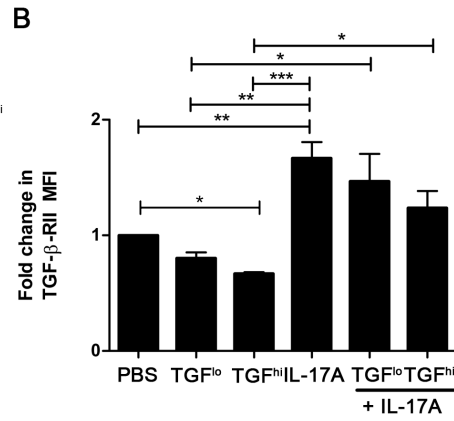
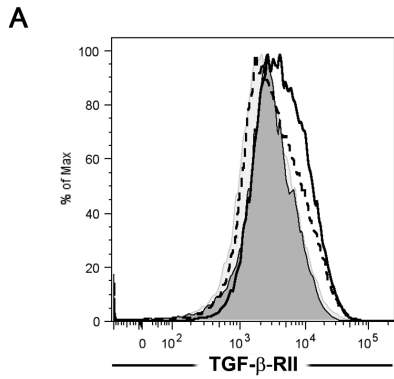


Figure 3: IL-17A increases TGF- β receptor cell surface expression and signaling on hepatic stellate cells

Cell surface expression of IL-17RA and TGF- β -RII was measured by flow cytometry after a 48 h stimulation with IL-17A and/or TGF- β . Representative histogram of TGF- β -RII cell surface expression induced by IL-17A and/or TGF- β stimulation (A). TGF- β -RII cell surface expression induced by IL-17A and/or TGF- β stimulation. Results are display as fold increase of MFI (n=5). (B). IL-17RA cell surface expression following IL-17A and/or TGF- β stimulation (C). Phosphorylation of SMAD2/3 at serine 423/425 was evaluated by western blot after a 15 min stimulation with TGF- β (D). Two colors immunofluorescence confocal microscopy was used to observed phosphorylated SMAD2/3 (green, Alexa-488) and nucleus (Blue, DAPI) (E). Close up images are displayed for TGF- β^{hi} and IL-17A + TGF- β^{lo} . Panel D and E are representative of 3 independent experiments. One-way ANOVA was used followed by a Tukey post-test, *, p<0.05 **, p<0.01, *** p<0.001.

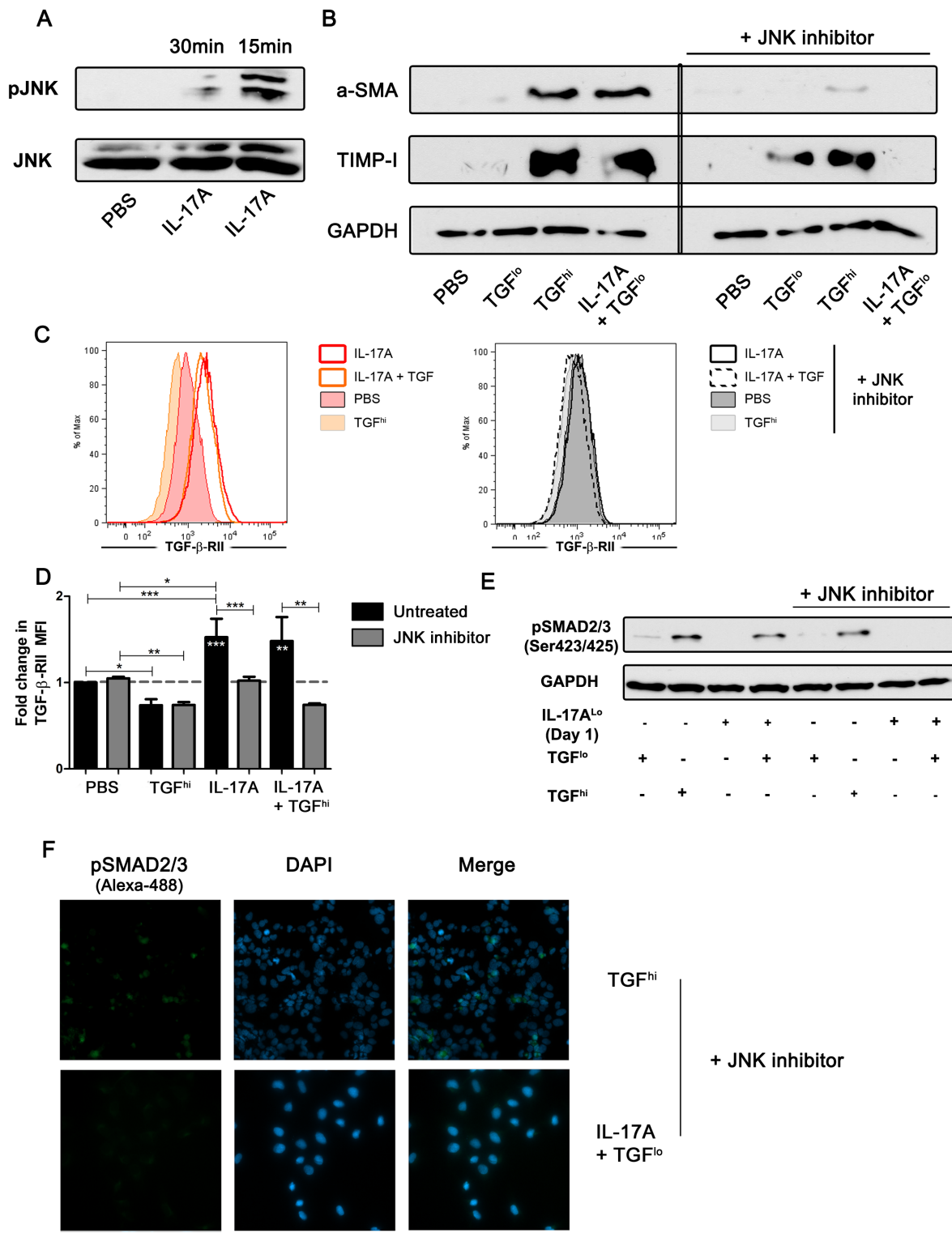
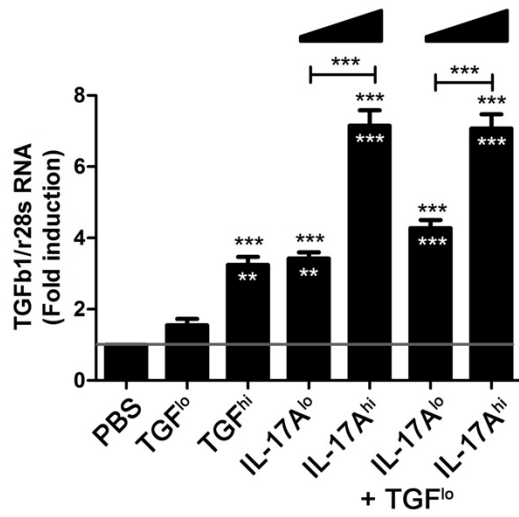


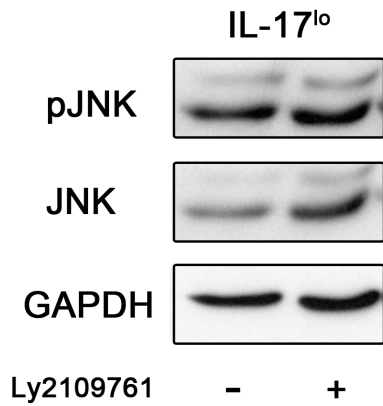
Figure 4: IL-17A enhances TGF- β response of hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner

Phosphorylation of JNK was evaluated by western blot after 15-30 min stimulation with IL-17A (A). Protein expression of α -SMA and TIMP-I after 48 h stimulation with TGF- β , TGF- β + IL17A in presence or absence of the JNK inhibitor, SP600125, was evaluated by western blot (B). Cell surface expression of TGF- β -RII was measured by flow cytometry after 48 h stimulation with IL-17A and/or TGF- β in the absence (left panel C) or presence of JNK inhibitor (right panel C). Representative histogram of TGF- β -RII cell surface expression (n=3) after IL-17A and/or TGF- β stimulation (C). Results are display as fold increase of MFI (n=3) (D). Phosphorylation of SMAD2/3 at serine 423/425 was evaluated by western blot after 15 min stimulation with TGF- β in presence of JNK inhibitor (E). Two colors immunofluorescence confocal microscopy was used to observe phosphorylated SMAD2/3 (green, Alexa-488) and nucleus (Blue, DAPI) (F).



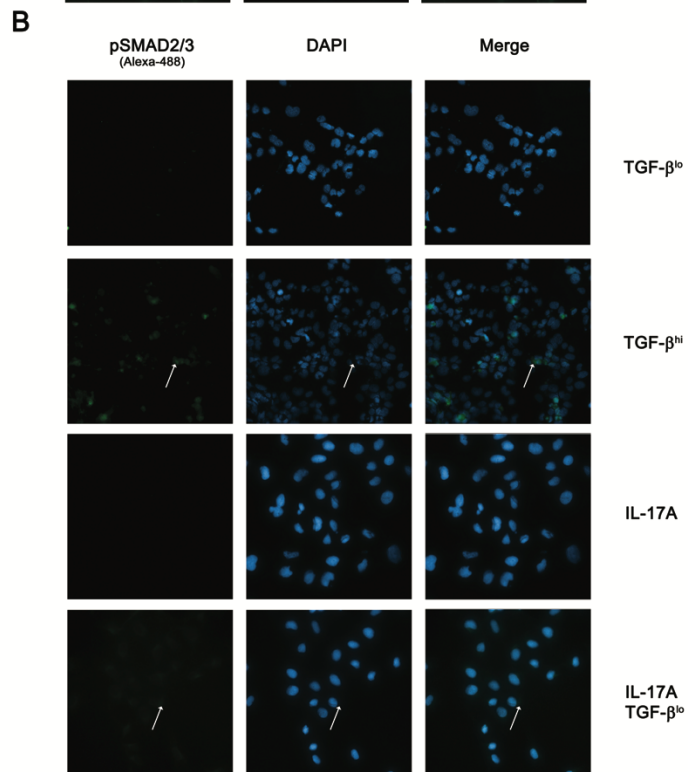
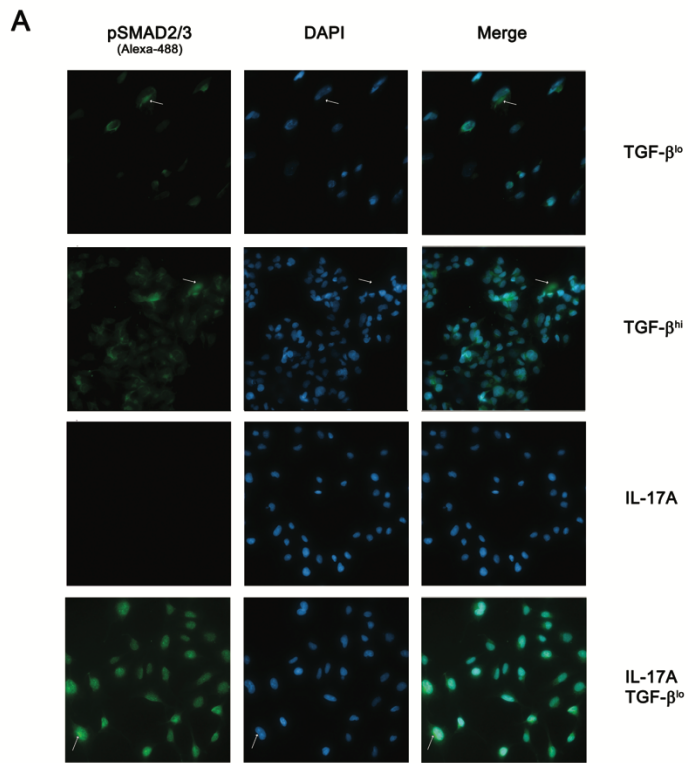
Supplementary figure 1. IL-17A induces TGF-β expression in hepatic stellate cells

Relative expression of TGFβ1 by LX2 cells after 48 h stimulation with IL-17A ± TGF-β was determined by quantitative PCR, and results are shown as fold change compared PBS- versus cytokines-treated LX2 cells.



Supplementary Figure 2. LY2109761 does not affect IL-17A signaling

Phosphorylation of JNK was evaluated by western blot after 15 min stimulation with in IL-17A in presence or absence of TGF- β inhibitor (Ly2109761).



Supplementary Figure 3. IL-17A enhances phosphorylation and nuclear translocation of SMAD2/3 in response to sub-optimal TGF- β stimulation in a JNK-dependent manner

(A) Two colors immunofluorescence confocal microscopy was used to observe phosphorylated SMAD2/3 (green, Alexa-488) and nucleus (Blue, DAPI). (B) LX2 cells were treated with JNK inhibitor and two colors immunofluorescence confocal microscopy was used to observe phosphorylated SMAD2/3 (green, Alexa-488) and nucleus (Blue, DAPI)

Chapitre 5 : Manuscrit 3

TYPE 2 IMMUNITY IS PROTECTIVE IN METABOLIC DISEASE BUT EXACERBATES NAFLD COLLABORATIVELY WITH TGF-BETA

(Science Translational Medicine, 2017)

Author's contribution to the manuscript "Type II immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD collaboratively with TGF- β "

Author contributions: Thomas A. Wynn (T.A.W.), Kevin Hart (K.M.H.), Thomas Fabre (**T.F.**), and Naglaa Shoukry (N.H.S.) conceived the study. **T.F.** conceived the human study and contributed to the design of complementary mouse experiments. K.M.H., T.A.W., **T.F.**, N.H.S., and Thirumalai R. Ramalingam (T.R.R.) designed the experiments. K.M.H., **T.F.** (**performed all human experiments including cytokine profiling, immunohistochemistry and analysis of human biopsies specimen**), Richard L. Gieseck III (R.L.G.), Lee A. Borthwick (L.A.B.), Kevin M. Vannella (K.M.V.), Joshua S. Scirba (J.C.S.), Thomas H. Acciani (T.H.A.), Rafael de Queiroz Prado (R.Q.P.), Robert W. Thompson (R.W.T.), Sandra White (S.W.), performed the experiments (mouse). K.M.H., and **T.F.** analyzed the mouse and human data, respectively. **T.F.** and Marc Bilodeau (M.B.) recruited patients. M.B. and Geneviève Soucy (G.S.) performed the clinical assessments. K.M.H., **T.F.**, N.H.S., and T.A.W., wrote the paper. All authors reviewed the manuscript for intellectual content and approved the final version.

Type II immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD collaboratively with TGF- β

Kevin M. Hart¹, Thomas Fabre^{2,3}, Joshua S. Scieurba¹, Richard L. Gieseck III¹, Lee A. Borthwick⁴, Kevin M. Vannella¹, Thomas H. Acciani¹, Rafael de Queiroz Prado¹, Robert W. Thompson¹, Sandra White¹, Genevieve Soucy^{2,5}, Marc Bilodeau^{2,6}, Thirumalai R. Ramalingam¹, Joseph R. Arron⁷, Naglaa H. Shoukry^{2,6}, and Thomas A. Wynn^{1*}

¹Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America

²Centre de Recherche du Centre Hospitalier l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

³Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁴Tissue Fibrosis and Repair Group, Institute of Cellular Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, UK

⁵Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁶Département de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

⁷Genentech, Inc. South San Francisco, CA, USA

*Corresponding Author

Overline: Fibrosis

One Sentence Summary: Development of NASH fibrosis is accompanied by accumulation of hepatic eosinophils and driven by TGF- β and profibrotic type 2 inflammation.

Abstract

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is now the most common progressive liver disease in developed countries and is the second leading indication for liver transplantation due to the extensive fibrosis it causes. NAFLD progression is thought to be tied to chronic low-level type-1 inflammation originating in the adipose tissue during obesity, however the specific immunological mechanisms regulating progression of NAFLD-associated fibrosis in the liver are unclear. To investigate the immunopathogenesis of NAFLD more completely, we investigated adipose dysfunction, steatohepatitis (NASH), and fibrosis in mice that develop polarized type-1 or type-2 immune responses. Unexpectedly, obese IL-10/IL-4 deficient mice (type-1 polarized) were highly resistant to NASH. This protection was associated with an increased hepatic IFN- γ signature. Conversely, IFN- γ deficient mice progressed rapidly to NASH with evidence of fibrosis dependent on TGF- β and IL-13 signaling. Unlike increasing type-1 inflammation and the marked loss of eosinophils seen in expanding adipose tissue, progression of NASH was associated with increasing eosinophilic type-2 liver inflammation in mice and human patient biopsies. Finally, simultaneous inhibition of TGF- β and IL-13 signaling attenuated the fibrotic machinery more completely than TGF- β alone in NAFLD-associated fibrosis. Thus, although type-2 immunity maintains healthy metabolic signaling in adipose tissues, it exacerbates the progression of NAFLD collaboratively with TGF- β in the liver.

INTRODUCTION

Treating the individual sequelae of the metabolic syndrome associated with obesity and type II diabetes represents one way to alleviate the overall burden of disease. For example, the hepatic manifestation of metabolic syndrome, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), is now the most common form of chronic liver disease, is growing in prevalence, and will soon be the most common cause of liver transplantation in the United States (1-3). This is highlighted by a recent estimate that NAFLD affects 64 million people in the US, with annual direct medical costs projected at 103 billion dollars (4). Although a great deal of research has focused on obesity, metabolic alterations in disease, adipose tissue dysregulation, and the pathophysiology of NAFLD, the molecular and immunological mechanisms that facilitate the progression of NAFLD to non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and cirrhosis remain much less clear (5). As severe cirrhosis is the ultimate reason patients require liver transplant and the presence of fibrosis has been identified as the best predictor of clinical outcome and mortality (6, 7), a better understanding of the mechanisms that drive fibrogenesis in NAFLD could reveal novel treatment strategies and have a major impact on morbidity and mortality. However, progress in this area has been stymied by the absence of preclinical models that reliably reproduce inflammatory and fibrotic components seen in human disease (8, 9).

It is clear that the initiation and progression of NAFLD along its spectrum of severity is intricately associated with the inflammatory processes that are driven by chronic obesity. The initiation of dyslipidemia and lipogenesis in the liver is tied to insulin resistance and underlying adipose tissue inflammation. How the dysregulated immune response in the adipose tissue affects whole organism metabolism during homeostasis and obesity has been the topic of intense study. The emerging model suggests that homeostatic type-2 immunity in adipose tissues driven by IL-5, IL-4, and IL-13 production from innate type-2 lymphocytes (ILC2s), resident eosinophils, regulatory T cells and alternatively activated macrophages maintains healthy metabolic signaling (10-15). During obesity, this set point is skewed towards type-1 inflammation with increasing production of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, and IFN- γ , resulting in loss of local and then systemic insulin sensitivity and establishment of the chronic low-level type-1 inflammation that is the hallmark of the metabolic syndrome. Thus, prevailing models

hold that the inflammation contributing to NASH, cirrhosis, and eventual liver failure is an extension of dysregulated adipose tissue inflammation (16).

In the present study, we investigated whether the type-1 inflammatory response in obese mice directly contributes to the development NAFLD. Using a variety of transgenic mice that develop highly polarized type-1 and type-2 immune responses, we examined whether the progression of high fat diet induced NASH and fibrosis is influenced by changes in type-2 immunity. Surprisingly, our studies reveal a disconnect in how obesity and the loss of type-2 effector function in adipose tissues impacts the progression of inflammation, NASH, and fibrosis in the liver. Indeed, in contrast to its protective role in metabolism, adipose tissue homeostasis, and obesity, we show that the type-2 cytokine IL-13 collaborates with TGF- β to drive liver fibrogenesis in HFD-induced obesity.

Results

NASH and fibrosis develop late in mice fed a high fat diet

NASH and the accompanying development of hepatic fibrosis are complications linked to chronic obesity. To establish a timeline for the development of NASH and to determine the time point at which obese mice develop NASH with fibrosis, we subjected animals to a high fat diet (HFD) for 15 and 40 weeks and then examined them for the hallmark features of steatohepatitis. Mice on HFD for 15 weeks gained appreciable weight and developed hepatomegaly (Fig. 1A). Despite being steatotic, there was no detectable inflammation, hepatocyte damage at this early time point, as assessed by liver leukocyte numbers (Fig. 1B), serum aminotransferase level (Fig. 1C). Oil red O staining was modest at this time point compared with 40 weeks (Fig. 1D). We also did not detect staining for ballooning hepatocytes (Fig. 1E), or fibrosis by picrosirius red staining of liver sections (Fig. 1F, top panel). Nevertheless, after 40 weeks, mice on HFD displayed increases in leukocyte infiltration of the liver (Fig. 1B), with histological evidence of marked lobular inflammation (Fig. 1E, inset). Additionally, increases in aminotransferases in serum (Fig. 1C) suggested that chronic HFD led to substantial hepatocellular damage. This was characterized by hepatocellular macrosteatosis (Fig. 1D) and ballooning degeneration, identified through immunohistochemical and immunofluorescent staining for ubiquitin and hepatic loss of keratin 8/18 staining (Fig. 1E and supplemental Fig. 1A). There was also significant pericellular

zone 3 accumulation of collagen in the livers of mice fed a HFD (Fig. 1F, lower panel), and increased expression (supplemental Fig. 1B) and immunofluorescent staining for smooth muscle actin (supplemental Fig. 1C), which are defining features of NASH. This timeline is in agreement with previously published work which reports NASH phenotypes present in wild-type mice on a HFD by 34 weeks (17). As predicted, the NASH phenotype was accompanied by increases in adipose inflammation measured by histological immune infiltration (Fig. 1G), presence of crown-like structures (Fig. 1G, arrowheads) and increased TNF- α expression (Fig. 1H). Furthermore, the increased inflammation in adipose tissues was accompanied by a loss of eosinophils as has been previously reported (Fig. 1I) (15). The increased inflammation in adipose tissue did result in increased TGF- β expression and induction of a number of collagens and metalloproteinases, however we did not detect development of substantial fibrosis by picrosirius red staining of adipose tissue at either time point (Supplemental Fig. 2). These studies demonstrate that obese mice are susceptible to the sequelae of NAFLD, but only when chronically exposed to a HFD. These data also support the model that progression of NAFLD in obesity is associated with a loss of type-2 homeostatic set points and expansion of inflammation in adipose tissues.

Type I immunity drives metabolic disease but regulates progression of NAFLD

To determine whether the dysregulated pro-inflammatory immune response in adipose tissues of obese mice contributes to the development and progression of NAFLD, we investigated whether primary drivers of type-2 immunity protect against NAFLD. We utilized IL-4^{-/-} and double IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice, which were previously shown to develop increasingly polarized type-1 inflammation following sterile or infectious challenge (18, 19). Our goal with the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice was to assess extreme type-1 inflammatory skewing rather than the specific contribution of IL-10 to NAFLD, which remains unclear despite being previously studied (20-25). The single IL-10^{-/-} mice, in contrast to the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice, develop more of a mixed Th1/Th2 response when challenged with various inflammatory stimuli, which may in part explain the contradictory results regarding IL-10 in NAFLD (18, 19). Indeed, we observed consistently low and unchanging levels of IL-10 with disease in mice and in human microarray data (Supplemental Fig. 3). Thus, we hypothesized that the IL-4^{-/-} and IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} genetically deficient mice would display a progressive worsening of metabolic homeostasis, obesity,

adipose tissue dysregulation, and increased progression towards NASH and fibrosis because of their highly-polarized type-1 inflammatory response.

When challenged with a HFD for 15 weeks, IL-4^{-/-} mice developed similar obesity as wild type mice measured by body composition (Fig. 2A) and serum leptin levels (Fig. 2B). However, the IL-4^{-/-} mice displayed slightly worse hepatomegaly (Fig. 2C), despite having similar liver triglycerides (Fig. 2D). Unexpectedly, IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice were significantly protected from hepatomegaly, increased serum aminotransferases, and their liver triglyceride content and steatosis was markedly reduced relative to WT and IL-4^{-/-} mice (Fig. 2C, D and E). This was surprising because the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice were similarly susceptible to obesity compared to wild type mice as measured by body composition and serum leptin levels (Fig. 2A and B). This protection from the features of NAFLD despite normal susceptibility to obesity was sustained as long as 40 weeks on the HFD in the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice (Supplemental Fig. 4). Perigonadal adipose tissues were also analyzed for evidence of dysregulated pro-inflammatory mediator expression. All three groups showed marked increases in *tnf* and *ccl2*, as well as readily observable increases in histological adipose immune infiltration and abundant presence of crown-like structures when fed a HFD (Fig. 2F and G.). The switch towards type-1 inflammation in adipose tissues was also accompanied by a substantial reduction in the number of adipose tissue eosinophils (Fig. 2H). Compared to wild type mice, both genetically deficient animals displayed similar or increased inflammation in the adipose tissue, but the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice were resistant to steatosis and NASH when placed on a HFD as measured by hepatic triglyceride levels, serum aminotransferase levels, and histological evaluations. Together, these findings suggest that there are disconnects between the mechanisms driving inflammation and metabolic dysregulation in adipose tissues and the mechanisms driving development of NAFLD.

Obese IFN- γ ^{-/-} mice develop accelerated NAFLD with fibrosis

To elucidate the mechanism for the reduced development of NAFLD in IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice, we performed RNA-seq analysis on whole liver tissue isolated from WT, IL-4^{-/-}, and IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice on a normal or HFD for 15 weeks. Ingenuity pathway analysis of significantly altered genes between the genotypes on normal or high fat diet (ANOVA) identified interferon-gamma (*ifng*) as the most activated pathway amongst predicted upstream regulatory pathways at

baseline in the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} livers ($p=2.65 \times 10^{-31}$). This pathway was down regulated slightly in wild type animals on HFD (zscore= -1.362). In IL-4^{-/-} mice, the IFN- γ pathway was down regulated whether the mice were on a normal diet (zscore= -3.805) or HFD (zscore= -2.64). In contrast, the IFN- γ pathway was the highest predicted upregulated pathway in IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice on normal diet (zscore= 7.678), and was only slightly reduced when the mice were fed the HFD (zscore= -1.069) (Fig. 3A.). The IFN- γ signature in IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} mice was further validated when we searched for genes that, according to their annotation, are positively linked with IFN- γ activity (Fig. 3A, heatmap). These data suggest that elevated baseline hepatic levels of IFN- γ that are highly activated in the IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-}, but not in IL-4^{-/-} mice, may be protective against NAFLD.

Since the IFN- γ pathway was such a strong predictor of resistance or susceptibility to NAFLD in the IL-4 and IL-10/IL-4 genetically deficient mice, we investigated if IFN- γ plays an important regulatory role in the progression of NAFLD. IFN- γ ^{-/-} mice on HFD for 15 weeks had similar increases in body weight and fat mass as wild type mice (Fig. 3B). However, the IFN- γ ^{-/-} mice displayed dramatically increased hepatomegaly, and significantly increased steatosis compared to wild type animals when assessed by liver triglyceride content and oil red O staining (Fig. 3B and C). In additional studies, we found increased NAFLD in IL-12^{-/-} and IL10^{-/-}/IL-12^{-/-} mice compared to WT mice, but no differences in NAFLD between IL-12^{-/-} and IL-10^{-/-}/12^{-/-} mice, suggesting that increased presence of type-1 regulatory mechanisms driven by IL-12 and IFN-gamma are ultimately responsible for the differences we observed in the IL-10^{-/-}/4^{-/-} mice rather than a specific effect of IL-10 (Supplemental Fig. 5). We also observed areas of NASH-like fibrotic deposition in the IFN- γ ^{-/-} mice by picrosirius red staining, which were undetectable in wild type livers at the early 15-week time point (Fig. 3C, bottom panels). Additionally, the IFN- γ ^{-/-} mice had evidence of increased liver damage as measured by serum ALT (Fig. 3D). The early detection of fibrosis in IFN- γ ^{-/-} mice was also accompanied by increased expression of collagen 3a1, alpha smooth muscle actin and extracellular matrix-associated protein periostin, which is produced by activated myofibroblasts in response to TGF- β 1 and IL-13 stimulation (Fig. 3D) (26, 27). Given that progression to fibrosis was accelerated in obese IFN- γ ^{-/-} mice, we also examined whether TGF- β 1 activity was altered. Indeed, expression of TGF- β 1 was significantly increased in the livers of IFN- γ ^{-/-} mice, as were TIMP-1 and MMP-2, which are

both regulated by activated TGF- β 1 (Fig. 3E) (28, 29). Furthermore, we observed localization of nuclear phosphorylated-Smad3 in a greater frequency and variety of cell types present in the livers of HFD challenged IFN- γ ^{-/-} mice (Fig. 3F).

Next, we analyzed adipose tissues for markers of inflammation and detected increased *tnf* and *ccl2* expression in the obese IFN- γ ^{-/-} mice and a substantial decrease in the number of tissue eosinophils (Supplemental Fig. 6A). Nevertheless, despite these changes, we failed to detect any significant increase in gross histological inflammation in the adipose tissues of IFN- γ ^{-/-}, which contrasts with the findings obtained in the adipose tissues of obese IL-4^{-/-} mice (Supplemental Fig. 6B). The worsening NASH-associated fibrosis is likely explained in part by the increased TGF- β 1 signature in the livers of IFN- γ ^{-/-} mice relative to wild-type or IL-4^{-/-} mice, as well as the increased expression of TGF- β 1 in adipose tissues (Supplemental Fig. 6C).

NASH-driven fibrosis is partly TGF- β -dependent

Although TGF- β activity has been documented in the livers of NAFLD/NASH patients and in animal models of NAFLD/NASH, and proposed as a therapeutic target, detailed experimental manipulation of the pathway to determine its importance in NASH-associated fibrosis and immune activation has not been performed (30-33). Thus, to determine the role for TGF- β signaling in chronic HFD-induced NASH, and to validate its potential as a therapeutic target in NASH, we placed WT mice on a HFD for 40 weeks and TGF- β activity was inhibited therapeutically during the final four weeks of the study. Compared to animals receiving control antibody injections, the animals treated with a pan TGF- β blocking antibody did not display significant differences in body composition, hepatomegaly, or steatosis as measured by liver triglycerides (Fig. 4A and B). When we analyzed histological fibrosis using picrosirius red staining, there was a modest yet significant decrease in characteristic NASH fibrosis quantified as fibrotic fraction in the mice receiving anti-TGF- β therapy after just 4 weeks (Fig. 4B). This was also associated with a decrease in expression of pro-collagen3a1 and pro-collagen1a1. However, TGF- β antibody blockade did not affect periostin or pro-collagen6a1 mRNA expression (Fig. 4C.). Periostin has been proposed as a biomarker of type-2 inflammation in asthma (34), and we have similarly identified pro-collagen6a1 as a marker of IL-13-dependent inflammation and fibrosis (35). Thus, we hypothesized that type-2 inflammation was likely

contributing to the persistent expression of these pro-fibrotic biomarkers in the anti-TGF- β treated mice. Therefore, to investigate whether TGF- β blockade was having any impact on immune homeostasis, we analyzed the cytokine response in re-stimulated CD4⁺ T cells isolated from the liver. Production of IFN- γ was largely unaffected by the chronic HFD or by antibody treatment. However, production of IL-4 by T cells was markedly increased in the mice treated with anti-TGF- β mAb (Fig 4D). We also noted a modest increase in IL-13 production in the control Ab treated mice fed a HFD (Fig. 4E.). We also observed increased expression of *chi3l3*, an inducible marker of type-2 immunity, in the HFD group, which was further augmented by anti-TGF- β therapy (Fig. 4E). Collectively, these data revealed the presence of low level type-2 cytokine-associated inflammation in livers of mice with progressive NAFLD, which was further exacerbated by TGF- β blockade. Therefore, emergence of compensatory pro-fibrotic type-2-cytokine response could impair the efficacy of TGF- β pathway inhibitors in NAFLD-associated fibrosis.

Accelerated NASH-driven fibrogenesis in obese IFN- γ ^{-/-} mice is characterized by eosinophilic inflammation during TGF- β blockade

We repeated the TGF- β blockade studies in both wild type and IFN- γ ^{-/-} mice on a HFD for 20 weeks to test if the highly susceptible IFN- γ ^{-/-} mice would serve as a more rapid model of NASH and to further investigate the potential involvement of type-2 immunity in the progression of NAFLD. Once again IFN- γ ^{-/-} mice developed severe hepatomegaly by 20 weeks, which contrasted with WT mice that displayed little evidence of advanced NAFLD at this time point. Despite variability in histological fibrosis at this time point assessed by picrosirius red staining (Fig. 5A), we detected significant increases in pro-collagen3a1 and pro-collagen6a1 mRNA expression in the IFN- γ ^{-/-} mice and modest increases in periostin expression in mice treated with anti-TGF- β mAbs, confirming the machinery driving fibrosis was substantially increased (Fig. 5B). Since IFN- γ is known to cross-regulate type-2 inflammation, we hypothesized that the increases in periostin and pro-collagen6a1 expression could be due to a further dysregulation of cytokine responses in the livers of these mice, which was validated by increases in IL-13 mRNA expression observed in both wild-type and IFN- γ ^{-/-} mice following TGF- β blockade (Fig. 5C.).

To determine the functional impact of the enhanced type-2 response on the liver microenvironment, we examined *ccl11* expression and quantified tissue eosinophils, which have been shown to promote inflammation and fibrosis. Both were increased in the livers of IFN- $\gamma^{-/-}$ mice and further exacerbated by TGF- β blockade (Fig. 5C and D), but we were surprised to find a similar but less dramatic increase in eosinophils in WT mice as well, despite the fact that *ccl11* expression was not increased in this group. This increase in eosinophils with TGF- β blockade was recapitulated in 40 week treated wild type mice (Supplemental Fig. 7A). The presence of tissue eosinophils was confirmed through histological analysis of Giemsa stained liver sections (Fig. 5E) and immunofluorescent imaging of siglec-F⁺ leukocytes in liver tissue (Fig. 5F). Few if any eosinophils were observed in WT or IFN- $\gamma^{-/-}$ mice fed a normal diet, with occasional eosinophils found in microgranulomas. In contrast, eosinophils were scattered throughout the liver sinusoids in the HFD mice. They were also localized in areas of marked lobular inflammation and macrosteatosis where fibrosis is observed. To further validate these observations and to confirm if increases in the presence of type-2 inflammation are associated with the worsening NASH phenotype, we also assessed livers from WT animals on a chronic 40-week HFD for *ccl11* expression and presence of eosinophils (Supplemental Fig. 7B), and detected significant increases in both measures.

Since IFN- γ negatively regulates both TGF- β and type 2 immunity, we wanted to verify that the marked protection observed in the livers of IL-10^{-/-}/4^{-/-} mice was not accompanied by any induction of a profibrotic type-2 response. Confirming the evidence of hepatic protection in these mice, there was almost no induction of *tgfb1* or evidence of increased TGF- β or IL-13 activity measured by *timp1* and *postn* expression or accumulation of eosinophils at 40 weeks on HFD. In contrast, all of these measures were increased in WT mice (Supplemental Fig. 8). This demonstrates that the increased IFN- γ signaling in the livers of the IL-10^{-/-}/4^{-/-} mice is associated with protection and that activation of TGF- β or type-2 inflammation requires an additional stimulus such as steatosis or hepatic damage. We also examined the livers for the presence of tissue neutrophils and expression of neutrophil elastase, which we would have predicted to increase, based on models of type-1 inflammation serving as the major driver of NASH pathogenesis. Although we observed modest increases in expression of neutrophil elastase, particularly during TGF- β blockade, we found no significant changes in the frequencies of

tissue neutrophils associated with HFD alone, TGF- β blockade, absence of IFN- γ or chronic HFD (Supplemental Fig. 7C and D). As such, these observations are in stark contrast to the shifts in immune balance and loss of resident eosinophils seen in obese adipose tissue, indicating a significant divergence in the pathogenic mechanisms driving disease in each organ.

Finally, because of the increases in IL-13 production, upregulation of IL-13 responsive genes, and increased presence of eosinophils, which both respond and contribute to IL-13 signaling, we investigated the combined roles of IL-13 and TGF- β in the progression of NASH-associated fibrosis. Returning to the 40-week model of NASH, we treated weight-matched animals therapeutically during the final four weeks with control, anti-TGF- β or combined anti-TGF- β and anti-IL-13. Although the treatment regimen was too short to detect meaningful changes in disease, it was clear the antibodies were blocking fibrogenesis as we observed significant decreases in expression of both *col3a1* and *col6a1* with the dual blockade (Fig. 5G). This confirmed our hypothesis that *col6a1* expression was being driven by IL-13 signaling since it was unaffected by the single TGF- β blockade. These observations demonstrate that TGF- β and IL-13 cooperatively drive fibrogenic pathways in the murine NASH liver.

AMLN diet induced NASH recapitulates IFN-gamma regulation and type-2 inflammation even with modest adipose inflammation.

To determine the broad applicability of our findings in NASH, we repeated our analyses with WT and IFN- γ ^{-/-} knockout animals after 15 weeks on the AMLN diet (40% fat, 20% fructose and 2% cholesterol) (32, 43). This more severe model of NASH recapitulated our main findings, with IFN- γ ^{-/-} mice displaying similar increases in body weight (Fig. 6A), but having significantly increased hepatomegaly (Fig. 6A), expression of fibrotic markers (Fig. 6B), evidence of fibrosis (Fig. 6C), and hepatic damage (Fig. 6D). Furthermore, we found dramatic increases in induction of type-2 inflammation in both WT and IFN- γ ^{-/-} knockout animals measured by frequencies of IL-13 producing CD4 T cells and tissue expression of periostin (Fig. 6E), with significant increases in both measures in IFN- γ ^{-/-} mice. This was associated with increases in eosinophils and not neutrophils in the livers of IFN- γ ^{-/-} mice (Fig. 6F). As suggested by the reduced weights of mice on the AMLN diet, reductions of eosinophils and increases in expression of TNF- α in the adipose tissue was less marked than what was observed with mice

on a HFD (Fig. 6G), suggesting the induction of type-2 inflammation and fibrosis can occur somewhat independently from immune alterations in the adipose tissue.

Human NASH is characterized by type-2 eosinophilic inflammation

To confirm if our NASH models were accurately recapitulating human disease and to determine if our findings would be relevant to patients and potential therapeutics, we performed an analysis of NASH biopsies and publicly available microarrays from NASH patients. Firstly, to determine if there is a component of type-2 inflammation present in NASH patients, we assessed cytokine production from isolated and expanded intrahepatic lymphocytes after anti-CD3/CD28 re-stimulation. Compared to lymphocytes isolated from healthy controls, NASH associated lymphocytes produced increased amounts of IL-4, IL-5, and IL-13 (Fig. 7A). Furthermore, when stratified by pathologist assigned METAVIR fibrosis scores, we observed increased type-2 cytokine production with worsening fibrosis, with significant increases observed in IL-5 and IL-4 between lower (F0-2) and higher (F3-4) fibrosis scores (Fig. 7B.). Secondly, we determined that eosinophils were present in NASH patient livers by histological analysis and observed eosinophils present in similar patterns as seen in the murine livers in every NASH biopsy analyzed (n=26) (Fig. 7C and Supplemental Figure 11).

To further support eosinophils as an indicator of type-2 inflammation and potential contributor in progressive NASH, we performed an analysis of publicly available microarray data from healthy, steatotic and NASH livers for genes with significant differential expression (36). Of the transcripts with significantly altered expression by steatosis or NASH, we identified 37 genes either annotated as or implicated in eosinophil function (37). Hierarchical clustering by samples and principal component analysis using this gene set clearly separates the NASH from the healthy control and steatotic biopsies (Fig. 7D.). Finally, we assessed potential mechanisms of eosinophil accumulation in the human microarray data. Although we did not detect significant changes in expression of the eotaxin genes in NASH microarrays, the eosinophil-associated chemoattractant genes CCL5, CCL23 and PTGDS were all significantly upregulated in NASH patients (Supplemental Fig. 9) (37-43). These data indicate a previously unappreciated role for aspects of the type-2 response as a component of the inflammatory milieu contributing to NASH

in patient livers and suggest that chronic HFD, AMLN diet, and the inflammatory pathway modifications we explore here reliably replicate this aspect of progression of NAFLD.

Discussion

Research on the inflammation associated with NAFLD progression to NASH and cirrhosis has almost universally focused on components of the pro-inflammatory type-1 response including IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 and TLR activation (16, 44). In the present study, we observed type-2 inflammatory components in both mouse and human NASH, suggesting a previously unappreciated role for type-2 inflammation in the progression of NASH to fibrosis, as IL-13 is a well-known contributor to progressive end stage fibrosis in diseases of diverse etiology. The data presented here illustrate a much more mixed inflammatory milieu in the fatty liver than current models suggest, which could have significant implications for therapeutics that are based on altering the character of the inflammatory response in patients with NASH. Even though eosinophils and other type-2 associated inflammatory cells play a protective role in adipose tissues, the findings here demonstrate that dysregulated type-2 inflammation contributes to the progression of steatosis and fibrosis in the liver (Supplemental Figure 11).

We initiated these studies to better understand the protective and pathogenic roles of type-1 and type-2 inflammation in the pathogenesis of NAFLD as recent studies have suggested that type-2 immunity plays a protective role in metabolic syndrome. Although we confirmed an important counter-regulatory role for type-2 cytokines in adipose tissue inflammation (11, 12, 14, 15), our studies in IL-10^{-/-}/IL-4^{-/-} and IFN- γ -deficient animals revealed an unexpected protective role for some components of type-1 inflammation in NAFLD progression. Mechanistically, we show that targets of this IFN- γ regulation include the cytokines TGF- β and type-2 associated IL-13, which were dysregulated in the absence of IFN- γ . TGF- β has also previously been observed in NAFLD and this pathway has been proposed as a possible therapeutic target for NASH associated fibrosis (33, 45).

To directly address the contribution of TGF- β to NAFLD-associated fibrosis, we performed a series of studies in which TGF- β activity was blocked therapeutically. Although a previous study characterized hepatocyte specific deletion of *Tgfr2* in choline deficient diet induced NASH (45), our studies represent experimental intervention of TGF- β focusing on two critical targets of TGF- β signaling, fibroblasts and immune cells, without the caveat of eliminating potentially important TGF- β signaling during liver development. We found that TGF- β blockade alleviated profibrotic signaling pathways without having any detectable impact on average body weight, liver weight, or steatosis. However, in wild type mice, we detected no changes in *col6a1* and the matrix protein periostin, which have both been linked with IL-13-dependent inflammation and fibrosis (34, 35, 46). We also observed marked increases in *il4* and *chi3l3* expression following TGF- β blockade, but little to no change in markers of type-1 inflammation, suggesting that TGF- β signaling regulates the emergence of type-2 inflammation in the fatty liver. These observations were even more striking in the highly susceptible IFN- $\gamma^{-/-}$ mice, in which TGF- β blockade led to marked increase in *col6a1*, *col3a1*, *postn*, *il13*, and *ccl11* expression. We also observed increases in the number of eosinophils in the livers of the anti-TGF- β treated IFN- $\gamma^{-/-}$ mice. Thus, although we showed TGF- β serves as a mediator of fibrosis in NASH, these studies also uncovered an important collaborative role for type-2 immunity and IL-13 specifically in the progression of NASH and fibrosis.

The explanation for these findings remain unclear, although we hypothesize that activation of TGF- β and IL-13 signaling in the liver likely represents a feedback loop to repair hepatic damage induced by pro-inflammatory type-1 cytokines, lipid TLR ligands, dyslipidemia, and bacterial byproduct translocation during obesity-associated dysbiosis. Persistent activation or dysregulation of these repair pathways can lead to the development of pathological fibrosis. This is supported by our detection of increased intrahepatic lymphocyte production of IL-4, IL-13, IL-5 and eosinophil accumulation in NASH patients. Indeed, eosinophils and type-2 cytokines have been implicated in both tissue repair and regeneration in models of acute liver injury (47, 48), and also in the development of fibrosis (35, 49, 50). Thus, given the hepatic injury and hepatomegaly associated with NAFLD and our observation of eosinophils in areas of macrosteatosis and fibrosis, we hypothesize that eosinophils, which are major producers of type-2 cytokines, including IL-13 (51, 52), may initially support liver repair

and regeneration to maintain liver function, and at more chronic stages may contribute to the development of fibrosis. The increasing pressure to repair the liver as obesity and metabolic syndrome become chronic may also explain the rapid loss of eosinophils from adipose tissues. Thus, worsening NAFLD could provide a feed-forward loop to further exacerbate adipose tissue dysregulation. Finally, our ability to stratify human NASH patients from normal and steatotic patients based on eosinophil related gene expression and identification of eosinophils in 100% of NASH patient biopsy histologic sections analyzed suggest that the presence of eosinophils or eosinophil-derived mediators in liver biopsies may serve as a useful indicator of advancing NASH and presence of type-2 inflammation more generally.

To directly test the contribution of type-2 associated inflammation to the activation of fibrogenic pathways in NASH, we blocked the key profibrotic cytokine IL-13 with a neutralizing monoclonal antibody in combination with anti-TGF β and found that IL-13 but not TGF β is critically required for the activation of *col6a1* expression in the liver. Thus, IL-13 and TGF β appear to activate distinct pro-fibrotic mechanisms during the progression of NAFLD, suggesting that dual targeting of both core pathways may be needed to ameliorate the fibrotic progression of established fatty liver disease. Dual targeting may be particularly important since we observed the most dramatic increase in type-2 immunity when TGF- β was inhibited.

There are potential limitations to this study that may serve as future avenues of research or offer alternative interpretations of the data. With our use of global cytokine knockout animals, we focused on the liver and adipose tissue because these mice displayed similar susceptibility to obesity. However, we cannot exclude the possibility that the immune alterations were not having additional systemic effects, such as altering nutrient absorption in the intestine, modifying the microbiome, or modulating hormonal and nervous system signaling. Additionally, the number of NASH patient biopsies we assessed for intrahepatic lymphocyte cytokine production (n=14), the presence of eosinophils (n=26), and microarray analysis (n=16) was relatively small making it uncertain whether type-2 inflammation serves as a universal driver of NASH or whether it only characterizes a particular subset of patients. However, given the similarities between the mouse and human data, and the fact that the biopsies, histological analyses, and microarray data were gathered from independent research groups, there is

substantial evidence supporting a critical role for type 2 immunity in the progression of NAFLD. Finally, although we were able to detect eosinophils in all NASH biopsies and identified transcriptional changes that were consistent with eosinophilic inflammation, we have not yet directly quantified eosinophils in human NASH or correlated their numbers with disease severity, which will be an important goal of future research.

In summary, we have identified a mixed inflammatory setting specific to the fatty liver containing a previously unappreciated component of type-2 immune activation marked by IL-13 and eosinophils, which collaborates with TGF- β through overlapping and independent mechanisms to drive fibrosis. We found evidence of this type-2 immune activation and eosinophil accumulation in both mouse and human NASH. These studies represent a paradigm shift in inflammatory characterization of steatohepatitis and have important implications for potential therapeutic interventions aimed at NASH and the metabolic syndrome.

Materials and Methods

Study Design.

Our primary objective was to investigate the immunological contribution to NASH progression and fibrosis. To do this, we disrupted major regulatory cytokines or experimentally blocked relevant signaling molecules in diet-induced mouse models of progressive NAFLD/NASH. No statistical methods were used to predetermine sample size. Group sample size was chosen using records of variance in past experiments, and variance is similar between groups being statistically compared. All experiments were independently replicated two or more times. Samples or data points were excluded only in the case of a technical equipment or human error that caused a sample to be poorly controlled. Mice or samples were randomly assigned to experimental groups or processing orders. Group allocation was blinded for all mouse work when possible (such as administration of antibodies, sample quantification and analysis, and pathology scoring). The ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)

guidelines in the EQUATOR (Enhancing the Quality and Transparency of Health Research) Network library were followed for this report.

Primary data are located in Table S1.

Mice

The National Institute of Allergy and Infectious Diseases Division of Intramural Research Animal Care and Use Program, as part of the National Institutes of Health Intramural Research Program, approved all of the experimental procedures (protocol “LPD 16E”). The Program complies with all applicable provisions of the Animal Welfare Act (http://www.aphis.usda.gov/animal_welfare/downloads/awa/awa.pdf) and other federal statutes and regulations relating to animals. 6-8-week-old C57BL/6 male mice or knockout strains on C57BL/6 background were obtained from within the same barrier facility at Taconic Farms Inc. and thus were exposed to equivalent bacteria for microflora colonization. Mice were put on either a diet of 60% calories from lard fat diet from Harlan (TD.06414) or the AMLN diet with 40% fat, 20% fructose and 2% cholesterol from Research Diets (D09100301). For therapies, 250 micrograms each of anti-TGF- β (BioXCell Clone: 1D11.16.8 Catalog#: BE0057), IL-13 (Genentech Clone 262A-5-1) or control antibody (BioXCell Clone: MOPC-21 Catalog#: BE0083) were injected intraperitoneally twice weekly. Mouse body composition was assessed using ¹H NMR spectroscopy (EchoMRI 3-in-1, Echo Medical Systems LTD, Houston, TX) with generous assistance of Oksana Gavrilova and the Mouse Metabolism Core at NIDDK. Mice were terminally anesthetized with sodium pentobarbital. All animals were housed under specific pathogen-free conditions at the National Institutes of Health in an American Association for the Accreditation of Laboratory Animal Care-approved facility.

Immunofluorescent and Immunohistological Staining

Liver tissue was snap frozen immediately after perfusion using a CoolRack M96-ID freezing block on dry ice. Tissue was sectioned at 8 μ m using a cryostat and maintained at -80C until needed. Slides were removed from -80C and immediately fixed for 15 minutes using 10% neutral buffered formalin. Sections were permeabilized for 20 minutes using 0.2% Triton-X 100 PBS (PBST). Sections were then blocked with 2% BSA PBST for 30 minutes. Sections were

washed 3 times with PBST for 5 minutes each. Primary antibodies were diluted in PBST 2% BSA and incubated with sections for 2 hours at RT. Sections were rinsed three times with PBST for five minutes each. Secondary antibodies were diluted in PBST 2% BSA and incubated with sections for 1 hour at RT. Sections were rinsed once with PBST for five minutes. Sections were then stained with 300nM DAPI in PBST for 3 minutes. Sections were rinsed three times with PBST for five minutes each and then mounted for imaging using Fluoromount G (Southern Biotech). Primary antibodies Siglec-F (E50-2440), phospho-Smad3 (EP823Y), ubiquitin (EPR8590-448), keratin8/18 (TROMA-1), smooth muscle actin. Secondary antibodies Goat anti-Rabbit TRITC –A24536; Goat anti-Rat Alexa488 –A11006, Chicken anti-rabbit Alexa488-A-21441; Chicken anti-rat Alexa647-A-21472. For Immunohistological staining for ubiquitin and keratin 8/18, frozen slides were thawed and treated as above, additional blocking of endogenous enzymes was performed (Dako enzyme block). Keratin8/18 was visualized by secondary staining with Goat anti-rat HRP (ab97057) developed with DAB substrate kit (ab64238). This was followed by ubiquitin staining visualized with Mach3 Rabbit HRP (M3R531) developed with Vina Green Chromagen (BRR807A).

Fibrosis Quantification

Picosirius red stained cross sections of three liver lobes from each mouse were imaged under polarized light. Fibrotic area was calculated by measuring total area of liver with presence of NASH specific collagen deposition quantified using Fiji image analysis software (ImageJ) and reported as fibrotic fraction.

Hepatic Triglyceride Measurement

Relative liver lipid was assessed by measuring glycerol content of hydrolyzed liver tissue as a surrogate of triglyceride accumulation (53-55). Briefly, glycerol was isolated from 50-100 mg of liver saponified by addition of ethanolic KOH (2 parts EtOH: 1 part 30% KOH) overnight at 55C followed by addition of 1:1 water and EtOH. 1M MgCl₂ was added to precipitate fatty acids and samples were spun down. Cleared supernatants were assayed for glycerol content with colorimetric Free Glycerol Reagent (Sigma F6428) relative to a glycerol standard curve (Sigma G7793) and liver triglyceride content was calculated.

Human NASH Cytokine Quantification

Following informed consent, fresh human liver biopsy specimens were obtained from patients undergoing diagnostic liver biopsies at the Hepatology clinic of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM). This study was approved by the institutional ethics committee (protocol SL09.228) and all experiments were performed in accordance with the declaration of Helsinki. Intrahepatic lymphocytes (IHL) were isolated by enzymatic digestion with collagenase type 2 (100 IU/mL) (Worthington) of the liver biopsy followed by mechanical dissociation through a 70 µm filter. IHLs were expanded for 15 days in 24-well plates with 2×10^6 autologous irradiated (3000 rads) peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) as feeder cells in presence of 50 IU/mL of IL-2 (R&D systems) and 1 µg/mL of anti-CD3 (cloneUCHT1) (BD Biosciences, San Diego, CA). Expanded IHLs (2×10^6 /mL) were re-stimulated for 3 days with anti-CD3/CD28 (1 µg/mL). Cytokine production was quantified, from supernatants collected at day 3 diluted 1:2, by Legend plex analysis for Human Th cytokines (Biolegend, San Diego, CA) following the manufacturer's instructions. Legend plex data were acquired on a standard LSRII instrument (BD biosciences) using FACS DIVA software version 8 and analyzed using LegendPlex software version 7 (Biolegend, San Diego, CA).

Murine Gene Expression Analyses

Liver and perigonadal adipose tissue was homogenized in TRIzol Reagent (Life Technologies; Grand Island, NY) with a Precellys 24 (Bertin Technologies; Montigny-le-Bretonneux, France). Total RNA was extracted with chloroform using a MagMax-96 Total RNA Isolation Kit (Qiagen), and reverse transcribed to cDNA using SuperScript II Reverse Transcriptase (Life Technologies). Gene expression was quantified using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) by RT-PCR on an ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Gene expression is described relative to RPLP2 mRNA levels in naïve liver and perigonadal adipose tissue. Gene (NCBI GenBank Accession codes): Rplp2(NM_026020): forward 5'-ACGTCGCCTCTTACCTGCT-3', reverse 5'-GACCTTGTTGAGCCGATCAT-3'; Il13(NM_008355) forward 5'-CCTCTGACCCTTAAGGAGCTTAT-3', reverse 5'-CGTTGCACAGGGGAGTCT-3'; ccl11(NM_011330) forward 5'-GAATCACCAACAACAGATGCAC-3', reverse 5'-ATCCTGGACCCACTTCTTCTT-3'; tnf (NM_013693) forward 5'-

GCCTCTTCTCATTCCCTGCTTGT-3', reverse 5'-GGCCATTTGGGAACTTCTCAT-3';
 ccl2(NM_009915) forward 5'-AGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA-3', reverse 5'-
 ATGTCTGGACCCATTCTTCT-3'; postn(NM_015784) forward 5'-
 CTGGTATCAAGGTGCTATCTGC-3', reverse 5'-AATGCCCAGCGTGCCATAA3';
 colla1(NM_007742) forward 5'-AACTGGACTGTCCCAACCCC-3', reverse 5'-
 TCCCTCGACTCCTACATCTTCTG-3'; col3a1(NM_009930) forward 5'-
 AACCTGGTTTCTTCTCACCTTC-3', reverse 5'-ACTCATAGGACTGACCAAGGTGG-
 3'; col6a1(NM_009933) forward 5'-CGCCCTTCCCACTGACAA-3', reverse 5'-
 GCGTTCCTTTAAGACAGTTGAG-3'; mmp2(NM_008610) forward 5'-
 CAAGTTCCTCCGCGATGTC-3', reverse 5'-TTCTGGTCAAGGTCACCTGTC-3';
 timp1(NM_011593) forward 5'-GCAACTCGGACCTGGTCATAA-3', reverse 5'-
 CGGCCCGTGATGAGAACT-3'; tgfb1(NM_011577) forward 5'-
 TGGAGCAACATGTGGAAGTC-3', reverse 5'-GTCAGCAGCCGGTTACCA-3';
 chi3l3(NM_009892) forward 5'-CATGAGCAAGACTTGCGTGAC-3', reverse 5'-
 GGTCCAAACTTCCATCCTCCA-3'; elane(NM_015779) forward 5'-
 TGGAGGTCATTTCTGTGGTG-3', reverse 5'-CTGCACTGACCGGAAATTTAG-3'.

Murine RNA-Seq, NanoString, and Human NASH Microarray Analysis

RNA isolated as described above was submitted to the NIAID Research Technologies Branch who performed RNA-seq. Illumina NextSeq500 reads were aligned to the mouse mm10 genome with TopHat2 and mapped to the mouse RefSeq transcriptome (2015-0804) with the EM algorithm in Partek Flow (Build 4.0.15.0702). The nCounter analysis system (NanoString Tech.) was utilized for gene expression analysis from RNA isolated from adipose tissue. RNA-seq data have been uploaded to the Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number GSE95428. Previously published and publicly available human microarrays from clinically defined normal, steatotic and NASH patient's livers were obtained from the ArrayExpress database (accession E-MEXP-3291). Subsequent analyses were performed using TM4 MeV microarray software suite. Welch's t-tests were used to generate volcano plots ($p < 0.05$) from which list subsets were generated by using fold-difference cutoffs. Additional ANOVA tests were carried out between

groups. Fold change values were uploaded to Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) to determine potential upstream regulators.

Data Availability

Accession codes for murine gene expression analysis provided above with primers. Mouse RNA-seq and human NASH microarray accession numbers provided above.

Statistical Analysis

Prism (Version 6&7; GraphPad) was used for statistical analysis and graphing. Mann-Whitney or t-test was used to determine significant differences. Data sets were compared with a two-tailed t-test, and differences were considered significant if P values were <0.05. Where shown error bars represent standard deviation.

Supplementary Materials

Materials and Methods

Fig S1. Chronic HFD induced NASH is associated with hepatic ballooning and activation of fibroblasts.

Fig S2. Analysis of adipose tissue fibrotic pathways and collagen deposition.

Fig S3. IL-10 in mouse and human NASH.

Fig S4. NAFLD/NASH in 40 week HFD challenged wild type, IL-4 and IL-10/4 knockout mice.

Fig S5. Comparison of IL-10 versus IL-12 deletion in NAFLD progression.

Fig S6. Adipose tissue inflammation in IFN- γ knockouts on a HFD.

Fig S7. Presence of cellular mediators of inflammation in NAFLD/NASH.

Fig S8. IL-10/4 knockout animals have long term protection from HFD-induced NASH.

Fig S9. Collagen and eosinophil associated chemoattractant expression alterations in patient biopsies.

Fig S10. Representative histological eosinophils in NASH patient biopsies.

Fig S11. Inflammatory pathways in NASH progression.

Table S1. Primary data

References and notes

1. M. R. Charlton, J. M. Burns, R. A. Pedersen, K. D. Watt, J. K. Heimbach, R. A. Dierkhising, Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology* **141**, 1249-1253 (2011).
2. M. Shaker, A. Tabbaa, M. Albeldawi, N. Alkhoury, Liver transplantation for nonalcoholic fatty liver disease: new challenges and new opportunities. *World journal of gastroenterology* **20**, 5320-5330 (2014).
3. Z. M. Younossi, M. Stepanova, M. Afendy, Y. Fang, Y. Younossi, H. Mir, M. Srishord, Changes in the prevalence of the most common causes of chronic liver diseases in the United States from 1988 to 2008. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* **9**, 524-530 e521; quiz e560 (2011).
4. Z. M. Younossi, D. Blissett, R. Blissett, L. Henry, M. Stepanova, Y. Younossi, A. Racila, S. Hunt, R. Beckerman, The Economic and Clinical Burden of Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) in the United States and Europe. *Hepatology*, (2016).
5. S. A. Townsend, P. N. Newsome, Non-alcoholic fatty liver disease in 2016. *British medical bulletin*, (2016).
6. P. Angulo, D. E. Kleiner, S. Dam-Larsen, L. A. Adams, E. S. Bjornsson, P. Charatcharoenwitthaya, P. R. Mills, J. C. Keach, H. D. Lafferty, A. Stahler, S. Haflidadottir, F. Bendtsen, Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **149**, 389-397 e310 (2015).
7. M. Ekstedt, H. Hagstrom, P. Nasr, M. Fredrikson, P. Stal, S. Kechagias, R. Hultcrantz, Fibrosis stage is the strongest predictor for disease-specific mortality in NAFLD after up to 33 years of follow-up. *Hepatology* **61**, 1547-1554 (2015).
8. S. H. Ibrahim, P. Hirsova, H. Malhi, G. J. Gores, Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive diseases and sciences* **61**, 1325-1336 (2016).

9. S. C. Sanches, L. N. Ramalho, M. J. Augusto, D. M. da Silva, F. S. Ramalho, Nonalcoholic Steatohepatitis: A Search for Factual Animal Models. *BioMed research international* **2015**, 574832 (2015).
10. C. N. Lumeng, J. L. Bodzin, A. R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of clinical investigation* **117**, 175-184 (2007).
11. A. B. Molofsky, J. C. Nussbaum, H. E. Liang, S. J. Van Dyken, L. E. Cheng, A. Mohapatra, A. Chawla, R. M. Locksley, Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of experimental medicine* **210**, 535-549 (2013).
12. J. I. Odegaard, R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. Red Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante, A. Chawla, Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447**, 1116-1120 (2007).
13. J. I. Odegaard, R. R. Ricardo-Gonzalez, A. Red Eagle, D. Vats, C. R. Morel, M. H. Goforth, V. Subramanian, L. Mukundan, A. W. Ferrante, A. Chawla, Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPARdelta ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell metabolism* **7**, 496-507 (2008).
14. R. R. Ricardo-Gonzalez, A. Red Eagle, J. I. Odegaard, H. Jouihan, C. R. Morel, J. E. Heredia, L. Mukundan, D. Wu, R. M. Locksley, A. Chawla, IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22617-22622 (2010).
15. D. Wu, A. B. Molofsky, H. E. Liang, R. R. Ricardo-Gonzalez, H. A. Jouihan, J. K. Bando, A. Chawla, R. M. Locksley, Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* **332**, 243-247 (2011).
16. M. Arrese, D. Cabrera, A. M. Kalergis, A. E. Feldstein, Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive diseases and sciences* **61**, 1294-1303 (2016).
17. M. Ito, J. Suzuki, S. Tsujioka, M. Sasaki, A. Gomori, T. Shirakura, H. Hirose, M. Ito, A. Ishihara, H. Iwaasa, A. Kanatani, Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* **37**, 50-57 (2007).

18. K. F. Hoffmann, A. W. Cheever, T. A. Wynn, IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *Journal of immunology* **164**, 6406-6416 (2000).
19. K. F. Hoffmann, S. L. James, A. W. Cheever, T. A. Wynn, Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. *Journal of immunology* **163**, 927-938 (1999).
20. G. Paredes-Turrubiarte, A. Gonzalez-Chavez, R. Perez-Tamayo, B. Y. Salazar-Vazquez, V. S. Hernandez, N. Garibay-Nieto, J. M. Fragoso, G. Escobedo, Severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with high systemic levels of tumor necrosis factor alpha and low serum interleukin 10 in morbidly obese patients. *Clin Exp Med* **16**, 193-202 (2016).
21. D. E. Cintra, J. R. Pauli, E. P. Araujo, J. C. Moraes, C. T. de Souza, M. Milanski, J. Morari, A. Gambero, M. J. Saad, L. A. Velloso, Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *Journal of hepatology* **48**, 628-637 (2008).
22. M. A. den Boer, P. J. Voshol, J. P. Schroder-van der Elst, E. Korshennikova, D. M. Ouwens, F. Kuipers, L. M. Havekes, J. A. Romijn, Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* **147**, 4553-4558 (2006).
23. V. Calcaterra, M. De Amici, C. Klersy, C. Torre, V. Brizzi, F. Scaglia, M. Albanesi, R. Albertini, B. Allais, D. Larizza, Adiponectin, IL-10 and metabolic syndrome in obese children and adolescents. *Acta Biomed* **80**, 117-123 (2009).
24. A. M. Miller, H. Wang, A. Bertola, O. Park, N. Horiguchi, S. H. Ki, S. Yin, F. Lafdil, B. Gao, Inflammation-associated interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 activation ameliorates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in interleukin-10-deficient mice. *Hepatology* **54**, 846-856 (2011).
25. W. E. Zahran, K. A. Salah El-Dien, P. G. Kamel, A. S. El-Sawaby, Efficacy of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-10 Analysis in the Follow-up of Nonalcoholic Fatty Liver Disease Progression. *Indian J Clin Biochem* **28**, 141-146 (2013).

26. W. Wen, E. Chau, L. Jackson-Boeters, C. Elliott, T. D. Daley, D. W. Hamilton, TGF- β 1 and FAK regulate periostin expression in PDL fibroblasts. *Journal of dental research* **89**, 1439-1443 (2010).
27. M. Masuoka, H. Shiraishi, S. Ohta, S. Suzuki, K. Arima, S. Aoki, S. Toda, N. Inagaki, Y. Kurihara, S. Hayashida, S. Takeuchi, K. Koike, J. Ono, H. Noshiro, M. Furue, S. J. Conway, Y. Narisawa, K. Izuhara, Periostin promotes chronic allergic inflammation in response to Th2 cytokines. *The Journal of clinical investigation* **122**, 2590-2600 (2012).
28. M. C. Hall, D. A. Young, J. G. Waters, A. D. Rowan, A. Chantry, D. R. Edwards, I. M. Clark, The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *The Journal of biological chemistry* **278**, 10304-10313 (2003).
29. H. J. Kwak, M. J. Park, H. Cho, C. M. Park, S. I. Moon, H. C. Lee, I. C. Park, M. S. Kim, C. H. Rhee, S. I. Hong, Transforming growth factor-beta1 induces tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression via activation of extracellular signal-regulated kinase and Sp1 in human fibrosarcoma cells. *Molecular cancer research : MCR* **4**, 209-220 (2006).
30. H. Yadav, C. Quijano, A. K. Kamaraju, O. Gavrilova, R. Malek, W. Chen, P. Zerfas, D. Zhigang, E. C. Wright, C. Stuelten, P. Sun, S. Lonning, M. Skarulis, A. E. Sumner, T. Finkel, S. G. Rane, Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling. *Cell metabolism* **14**, 67-79 (2011).
31. C. K. Tan, N. Leuenberger, M. J. Tan, Y. W. Yan, Y. Chen, R. Kambadur, W. Wahli, N. S. Tan, Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet. *Diabetes* **60**, 464-476 (2011).
32. A. Cayon, J. Crespo, M. Mayorga, A. Guerra, F. Pons-Romero, Increased expression of Ob-Rb and its relationship with the overexpression of TGF-beta1 and the stage of fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int* **26**, 1065-1071 (2006).
33. P. Starkel, C. Sempoux, I. Leclercq, M. Herin, C. Deby, J. P. Desager, Y. Horsmans, Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *Journal of hepatology* **39**, 538-546 (2003).

34. G. Jia, R. W. Erickson, D. F. Choy, S. Mosesova, L. C. Wu, O. D. Solberg, A. Shikotra, R. Carter, S. Audusseau, Q. Hamid, P. Bradding, J. V. Fahy, P. G. Woodruff, J. M. Harris, J. R. Arron, G. Bronchoscopic Exploratory Research Study of Biomarkers in Corticosteroid-refractory Asthma Study, Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. *The Journal of allergy and clinical immunology* **130**, 647-654 e610 (2012).
35. R. L. Gieseck, 3rd, T. R. Ramalingam, K. M. Hart, K. M. Vannella, D. A. Cantu, W. Y. Lu, S. Ferreira-Gonzalez, S. J. Forbes, L. Vallier, T. A. Wynn, Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis. *Immunity* **45**, 145-158 (2016).
36. A. D. Lake, P. Novak, C. D. Fisher, J. P. Jackson, R. N. Hardwick, D. D. Billheimer, W. T. Klimecki, N. J. Cherrington, Analysis of global and absorption, distribution, metabolism, and elimination gene expression in the progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 1954-1960 (2011).
37. H. F. Rosenberg, K. D. Dyer, P. S. Foster, Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **13**, 9-22 (2013).
38. J. Venge, M. Lampinen, L. Hakansson, S. Rak, P. Venge, Identification of IL-5 and RANTES as the major eosinophil chemoattractants in the asthmatic lung. *The Journal of allergy and clinical immunology* **97**, 1110-1115 (1996).
39. D. L. Emery, T. D. Djokic, P. D. Graf, J. A. Nadel, Prostaglandin D2 causes accumulation of eosinophils in the lumen of the dog trachea. *J Appl Physiol (1985)* **67**, 959-962 (1989).
40. H. Fujishima, K. Fukagawa, N. Okada, Y. Takano, H. Hirai, K. Nagata, R. Hashida, K. Matsumoto, H. Saito, Chemotactic responses of peripheral blood eosinophils to prostaglandin D2 in atopic keratoconjunctivitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* **111**, 126-131 e124 (2013).
41. S. Zhang, X. Wu, S. Yu, Prostaglandin D2 receptor D-type prostanoid receptor 2 mediates eosinophil trafficking into the esophagus. *Dis Esophagus* **27**, 601-606 (2014).
42. A. Rot, M. Krieger, T. Brunner, S. C. Bischoff, T. J. Schall, C. A. Dahinden, RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of

- normal human eosinophil granulocytes. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1489-1495 (1992).
43. J. A. Poposki, A. Uzzaman, D. R. Nagarkar, R. T. Chustz, A. T. Peters, L. A. Suh, R. Carter, J. Norton, K. E. Harris, L. C. Grammer, B. K. Tan, R. K. Chandra, D. B. Conley, R. C. Kern, R. P. Schleimer, A. Kato, Increased expression of the chemokine CCL23 in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *The Journal of allergy and clinical immunology* **128**, 73-81 e74 (2011).
44. T. Hardy, F. Oakley, Q. M. Anstee, C. P. Day, Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Pathogenesis and Disease Spectrum. *Annual review of pathology* **11**, 451-496 (2016).
45. L. Yang, Y. S. Roh, J. Song, B. Zhang, C. Liu, R. Loomba, E. Seki, Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* **59**, 483-495 (2014).
46. J. Corren, R. F. Lemanske, N. A. Hanania, P. E. Korenblat, M. V. Parsey, J. R. Arron, J. M. Harris, H. Scheerens, L. C. Wu, Z. Su, S. Mosesova, M. D. Eisner, S. P. Bohlen, J. G. Matthews, Lebrikizumab treatment in adults with asthma. *The New England journal of medicine* **365**, 1088-1098 (2011).
47. Y. P. Goh, N. C. Henderson, J. E. Heredia, A. Red Eagle, J. I. Odegaard, N. Lehwald, K. D. Nguyen, D. Sheppard, L. Mukundan, R. M. Locksley, A. Chawla, Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 9914-9919 (2013).
48. E. Bjornsson, E. Kalaitzakis, R. Olsson, The impact of eosinophilia and hepatic necrosis on prognosis in patients with drug-induced liver injury. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **25**, 1411-1421 (2007).
49. W. R. Proctor, M. Chakraborty, L. S. Chea, J. C. Morrison, J. D. Berkson, K. Semple, M. Bourdi, L. R. Pohl, Eosinophils mediate the pathogenesis of halothane-induced liver injury in mice. *Hepatology* **57**, 2026-2036 (2013).
50. R. M. Reiman, R. W. Thompson, C. G. Feng, D. Hari, R. Knight, A. W. Cheever, H. F. Rosenberg, T. A. Wynn, Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity* **74**, 1471-1479 (2006).

51. P. Schmid-Grendelmeier, F. Altnauer, B. Fischer, C. Bizer, A. Straumann, G. Menz, K. Blaser, B. Wuthrich, H. U. Simon, Eosinophils express functional IL-13 in eosinophilic inflammatory diseases. *Journal of immunology* **169**, 1021-1027 (2002).
52. P. Cui, S. Sharmin, Y. Okumura, H. Yamada, M. Yano, D. Mizuno, H. Kido, Endothelin-1 peptides and IL-5 synergistically increase the expression of IL-13 in eosinophils. *Biochemical and biophysical research communications* **315**, 782-787 (2004).
53. H. Jouihan, Measurement of Liver Triglyceride Content. *Bio-protocol* **2(13): e223**, (2012).
54. P. G. Laustsen, M. D. Michael, B. E. Crute, S. E. Cohen, K. Ueki, R. N. Kulkarni, S. R. Keller, G. E. Lienhard, C. R. Kahn, Lipoatrophic diabetes in Irs1(-/-)/Irs3(-/-) double knockout mice. *Genes Dev* **16**, 3213-3222 (2002).
55. S. G. Klotzsch, J. R. McNamara, Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clin Chem* **36**, 1605-1613 (1990).

Acknowledgments: The authors wish to thank the flow cytometry core of the CRCHUM and Oksana Gavrilova and the Mouse Metabolism Core at NIDDK for technical help.

Funding: Grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (HEO-115696), and Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI). TF is supported by doctoral fellowships from CIHR and the Canadian Network on Hepatitis C (CanHepC). NHS is supported by a Chercheur Boursier salary award from the FRQS. This work was also supported by the Intramural Research Program, NIAID/NIH.

Author contributions: T.A.W., K.M.H., T.F., and N.H.S. conceived the study; K.M.H., T.A.W., T.F., N.H.S., and T.R.R. designed the experiments; K.M.H., T.F., R.L.G., L.A.B., K.M.V., J.C.S., T.H.A., R.Q.P., R.W.T., S.W., performed the experiments; K.M.H., and T.F. analyzed the data; T.F. and M.B. recruited patients. M.B. and G.S. performed the clinical assessments; K.M.H., T.F., N.H.S., and T.A.W., wrote the paper. All authors reviewed the manuscript for intellectual content and approved the final version.

Competing interests: J.R.A. is an employee of Genentech Inc. The other authors declare no competing interests.

Data and materials availability: RNA-seq data have been uploaded to the Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with the accession number GSE95428. Previously published and publicly available human microarrays were obtained from the ArrayExpress database (accession E-MEXP-3291).

Figures

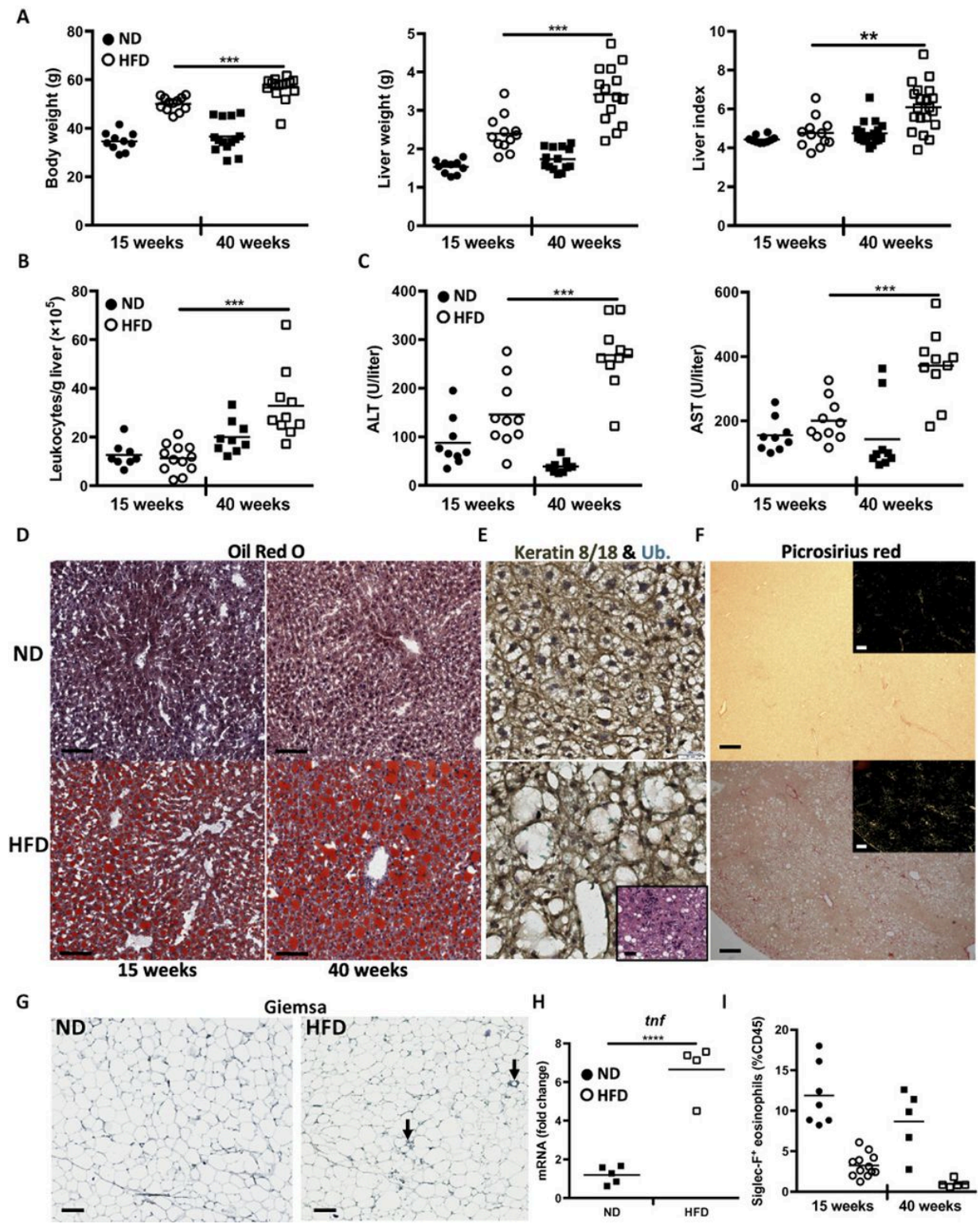


Figure 1. NASH and fibrosis develop late in mice fed a high fat diet.

Mice were maintained on normal diet (filled symbols) or a 60% kcal from fat diet (open symbols, HFD) for 15 (circles) or 40 weeks (squares). Body weights and liver weight and liver index (% of body weight) (A.) were collected ($n=10-20$). Characteristics of NASH were measured including isolated liver leukocyte counts (B.) ($n=9-12$), serum ALT and AST (C.) ($n=9-10$), and steatosis by oil red O staining (scale bars $100\mu\text{m}$) (D.). Liver sections were stained with keratin 8/18 and ubiquitin to assess hepatocyte ballooning (E.) and H&E for hepatic inflammation (E, inset showing example of lobular inflammation (scale bars $40\mu\text{m}$)). Picrosirius Red staining was performed to assess fibrotic collagen deposition (scale bars $200\mu\text{m}$) (F.) and viewed under polarized light to enhance visualization (Inset scale bar $200\mu\text{m}$). Adipose inflammation was assessed from Giemsa stained sections from 40 week animals (scale bars $150\mu\text{m}$) (G.), crown-like structures marked with arrows, expression of *tnf* (H.) ($n=4-5$), and flow cytometric analysis of Siglec-F positive adipose eosinophils amongst CD45 leukocytes (I.) ($n=5-12$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P<0.005$, $****=P<0.0001$)

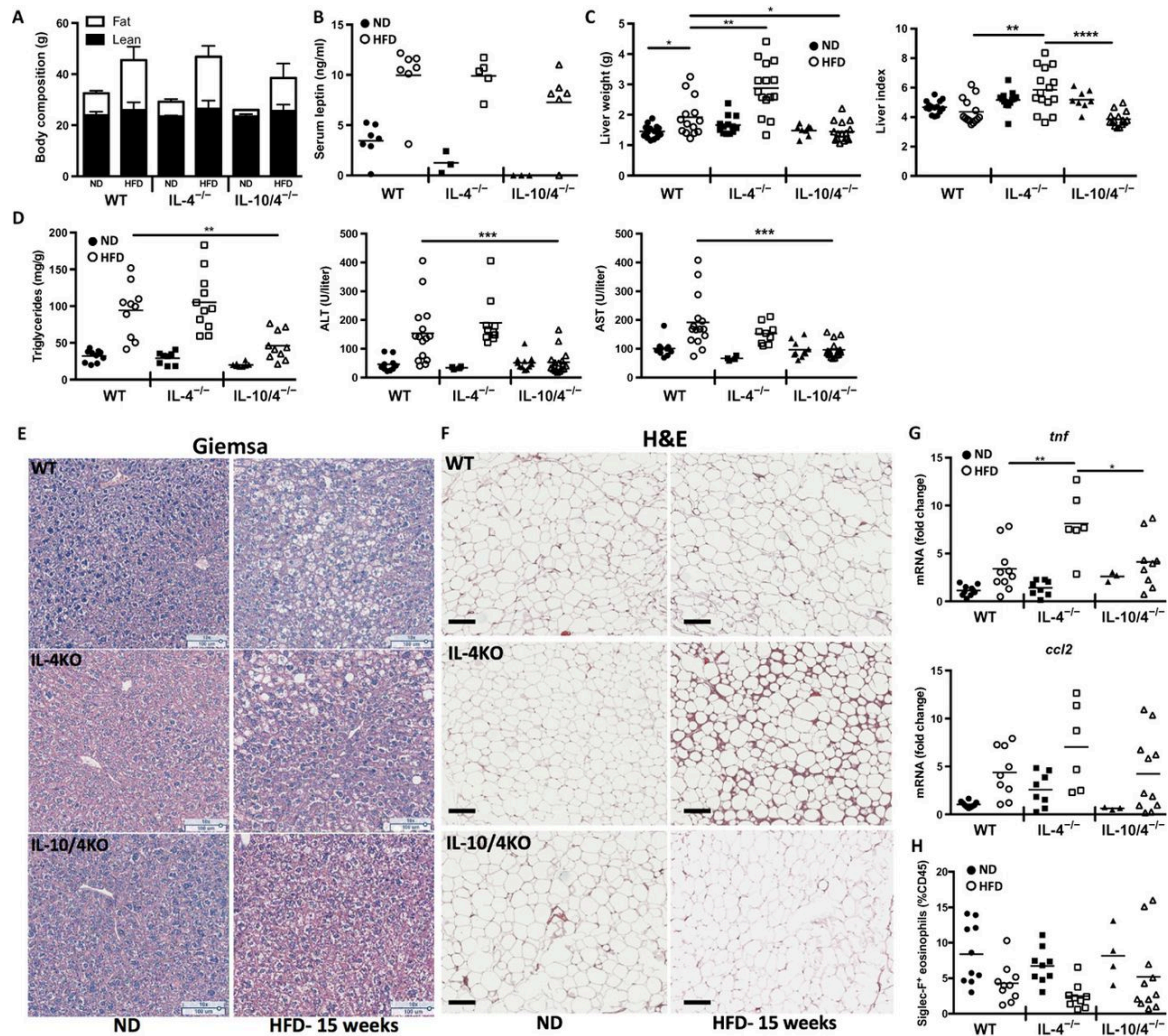


Figure 2. Type I immunity drives metabolic disease but protects against NAFLD.

Wild type (circles), IL-4^{-/-} (squares), and IL-10/4^{-/-} (triangles) mice were maintained on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) for 15 weeks. obesity was measured by MRI body composition (A.) ($n=4-6$) and serum leptin levels assessed by ELISA (B.) ($n=3-7$). NAFLD progression was assessed by liver weight and indices (C.) ($n=8-15$), hepatic triglyceride measurement ($n=8-11$), serum aminotransferase levels (D.) ($n=4-17$), and giemsa stained liver sections (E.). Adipose inflammation was assessed through histological analysis of H&E stained adipose sections (scale bars 150 μ m) (F.), adipose tissue expression of *tnf* and *ccl2* (G.) ($n=3-11$), and flow cytometric analysis of adipose eosinophils (H.) ($n=4-11$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; * $=P<0.05$, ** $=P<0.01$, *** $=P<0.005$, **** $=P<0.0001$)

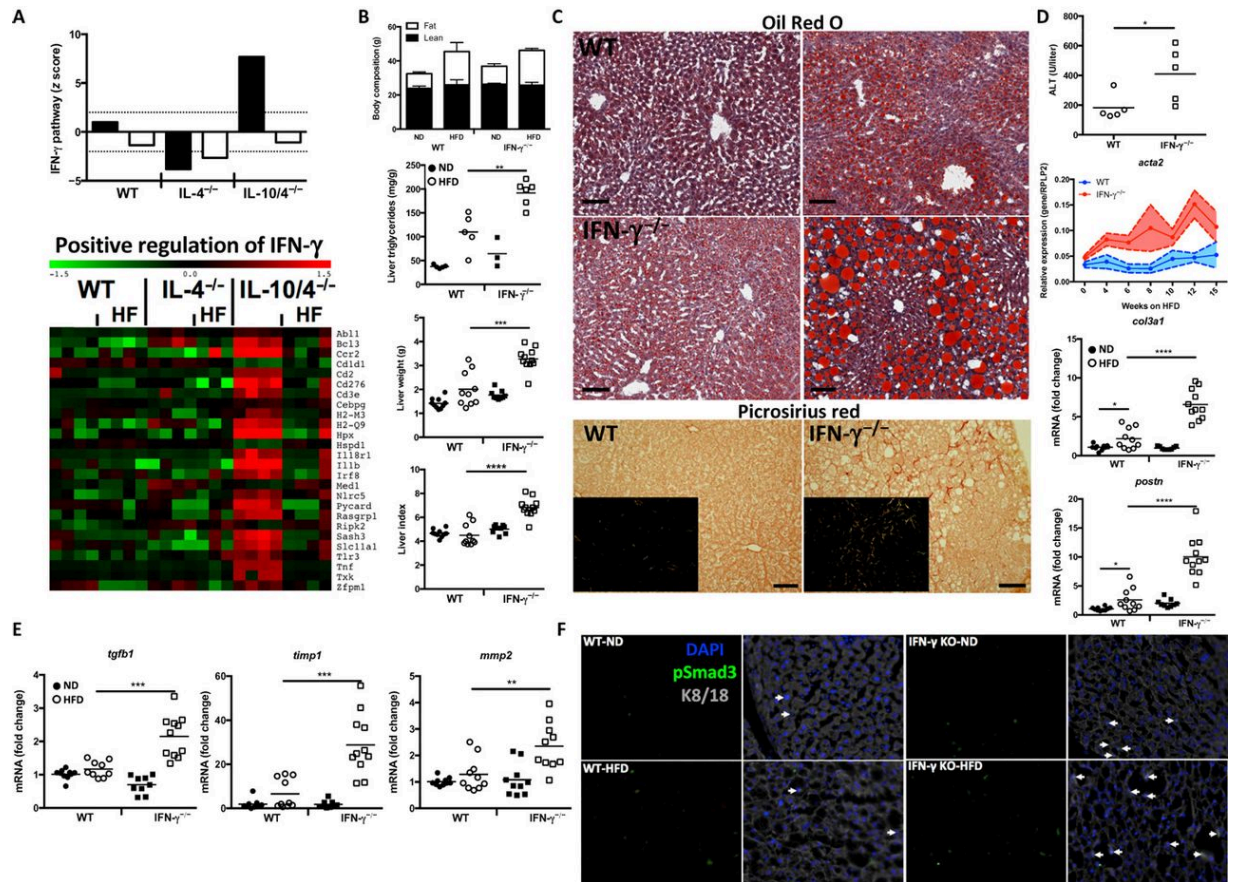


Figure 3. Obese IFN- γ ^{-/-} mice develop accelerated NAFLD with fibrosis

Activation scores of the IFN- γ pathway were assessed by Ingenuity analysis of significantly differentially expressed genes as determined by RNA-seq from whole liver tissue from WT, IL-4^{-/-}, and IL-10/4^{-/-} mice on HFD for 15 weeks (A.). Expression of genes annotated as being involved in positive regulation of IFN- γ are shown in the heat map (A.). Wild type (circles) and IFN- γ ^{-/-} (squares) mice were maintained for 15 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and assessed for obesity by MRI body composition measurement (B.) ($n=3-5$). NAFLD progression was also assessed by liver weight ($n=9-11$), liver index, hepatic triglyceride measurement (B.) ($n=3-6$), steatosis by Oil Red staining (scale bars 100 μ m) (C. normal diet-left panels, HFD- right panels), Picrosirius Red staining of collagen (scale bars 125 μ m) (C. bottom panels) (visualized under polarized light-inset (scale bars 125 μ m)), and serum ALT levels (D.) ($n=5$). Expression of fibrotic markers *col3a1* ($n=9-11$), *postn* ($n=9-11$) and *acta2* (standard deviation in shaded regions) ($n=3-5$) were assessed by qPCR (D.). Expression of

tgfb1 and TGF- β regulated genes *timp1* and *mmp2* were assessed (E.) ($n=9-11$). Immunofluorescent staining for phosphor-smad3 (Green), keratin8/18 (gray) and DAPI (Blue) (arrows indicating overlapping smad3 and DAPI staining (F.)). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P<0.005$, $****=P<0.0001$)

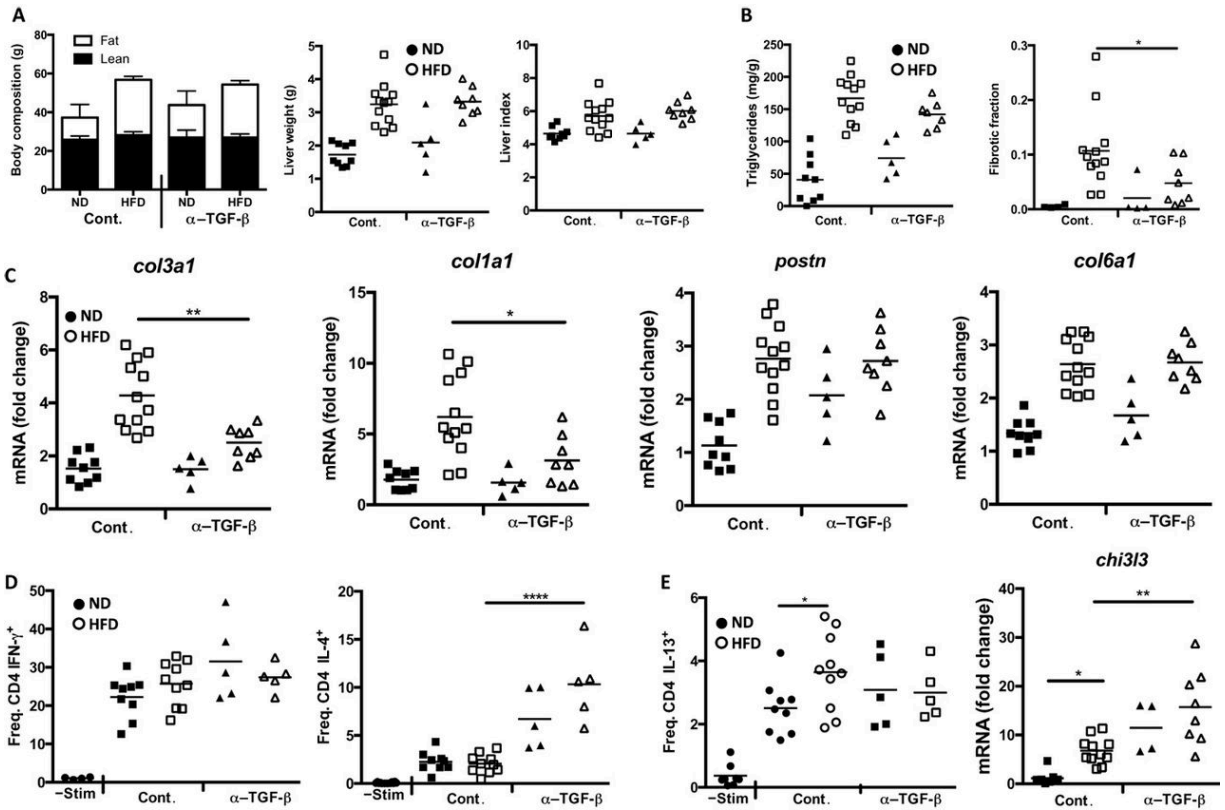


Figure 4. NASH-driven fibrosis is partly TGF- β -dependent

Wild type mice were maintained for 40 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and received 4 weeks of semi-weekly control Ig (squares) or anti-TGF- β (triangles) (250 μ g each). Mice were assessed for obesity by MRI body composition measurement ($n=5-9$) and hepatomegaly by liver weight and liver index scores (A.) ($n=5-12$). Hepatic triglycerides were measured and fibrotic fraction was calculated by measuring picrosirius red stained liver sections for characteristic NASH associated fibrosis (B.) ($n=4-12$). Expression of four fibrosis associated genes was measured (C.) ($n=5-12$). PMA/Ionomycin restimulated hepatic CD4 T cell production of IFN- γ and IL-4 (D.) and IL-13 (E. left panel) was assessed by intracellular cytokine staining ($n=5-10$). Expression of the type-2 inflammation marker *Chi3l3* was quantified from whole liver tissue (E. right panel) ($n=4-11$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P<0.005$, $****=P<0.0001$)

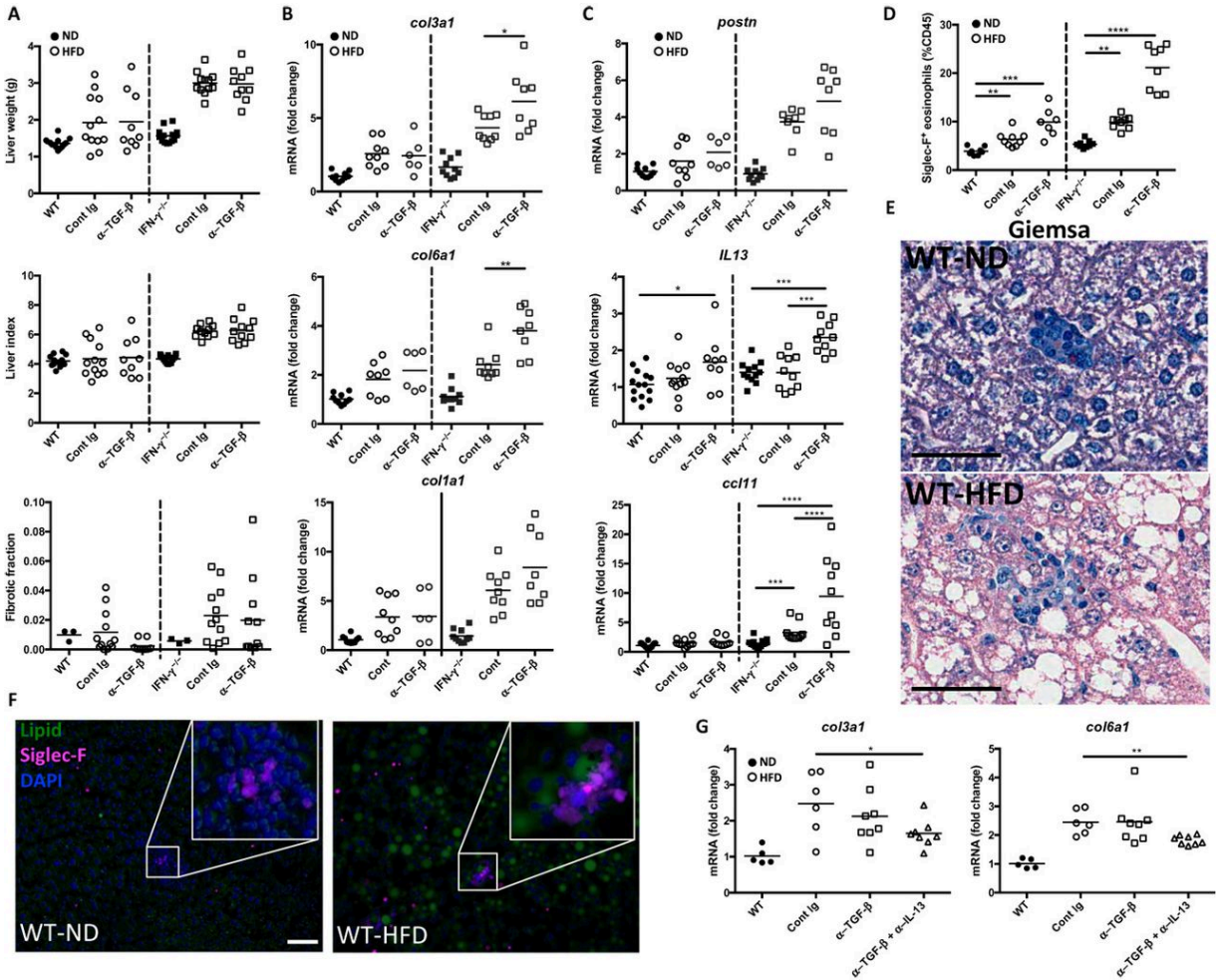


Figure 5. Accelerated NASH-driven fibrogenesis in obese $IFN-\gamma^{-/-}$ mice is characterized by severe eosinophilic inflammation during TGF- β blockade

Wild type (circles) and $IFN-\gamma^{-/-}$ (squares) mice were maintained for 20 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and received 4 weeks of biweekly control Ig or anti-TGF- β (250 μ g each). Liver weight and liver index were determined ($n=9-14$) and fibrotic fraction was calculated from picrosirius red stained liver sections (A.) ($n=3-12$). Expression of interstitial collagen genes (B.). Periostin, IL-13 and CCL11 expression were quantified from whole liver tissue ($n=6-14$). Hepatic eosinophils were measured by flow cytometric analysis of Siglec-F positive cells amongst CD45 leukocytes (C.) ($n=7-9$). Eosinophils were observed in hepatic tissue by Giemsa stained liver sections (scale bar 50 μ m) (D.) and by immunofluorescent staining of tissue sections for siglec-f positive cells (scale bar 125 μ m) (E.). Wild type mice were

maintained for 40 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and received 4 weeks of biweekly control Ig (circles), anti-TGF- β (squares), or combined anti-TGF- β and IL-13 mAbs (triangles) (250 μ g each). Expression of *col3a1* and *col6a1* from whole liver tissue were assessed by qPCR (G.) ($n=3-6$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P<0.005$, $****=P<0.0001$)

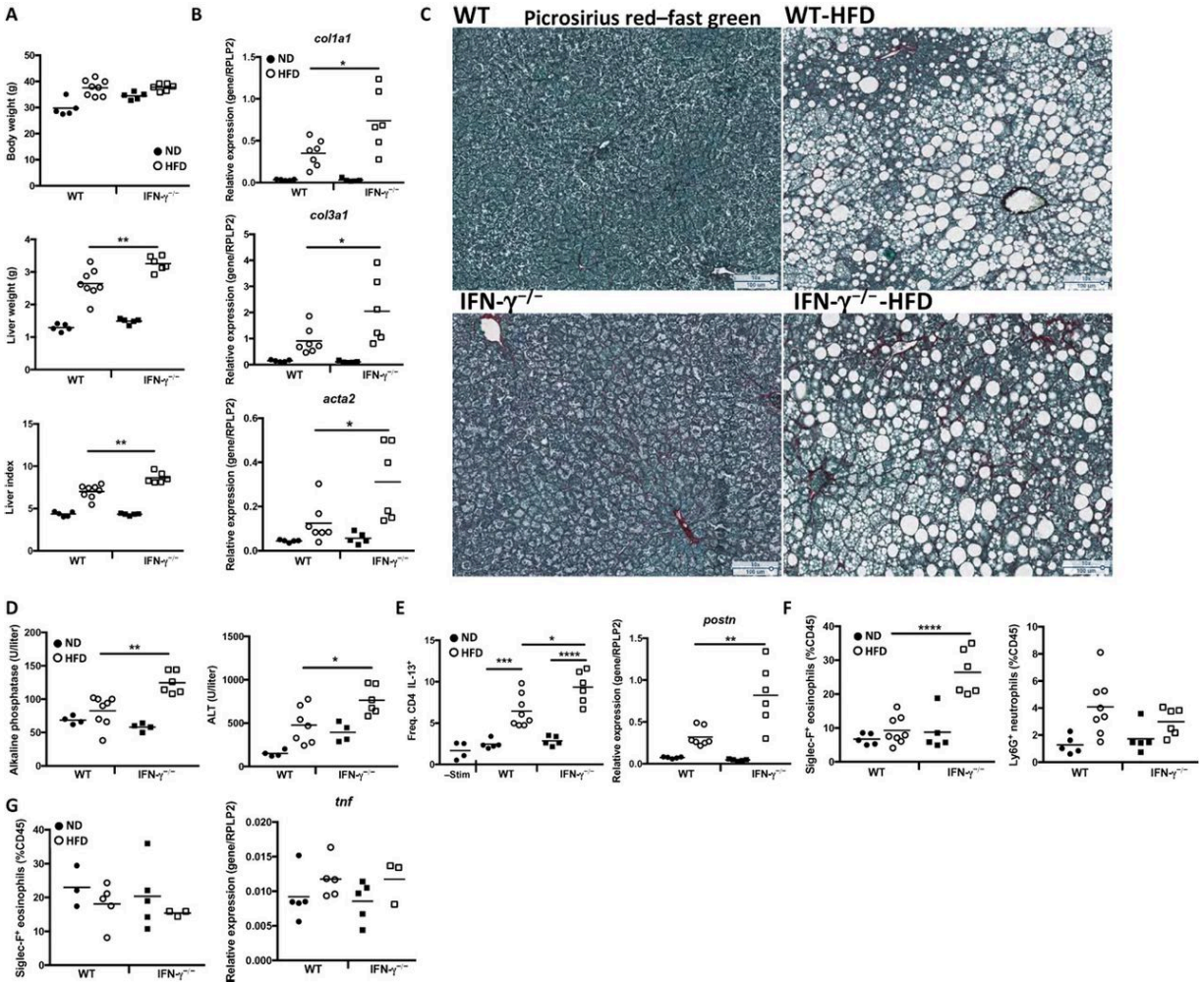


Figure 6. AMLN diet induced NASH recapitulates IFN-gamma regulation and type-2 inflammation despite modest adipose inflammation.

Wild type (circles) and IFN- $\gamma^{-/-}$ (squares) mice were maintained for 15 weeks on normal (filled symbols) or AMLN diet (open symbols) and assessed for obesity by body weight (A.) ($n=5-8$). NAFLD progression was assessed by liver weight and liver index, (A.), expression of fibrotic markers *Col3a1* and *col3a1*, and *acta2* as assessed by qPCR (B.) ($n=5-7$), Picrosirius Red and FAST green stained liver sections from WT (top panels) and IFN- $\gamma^{-/-}$ mice (lower panels) on normal (left) and HFD (right) (C.), and serum alkaline phosphatase, and ALT levels (D.) ($n=4-8$). Type II response was measured by intracellular staining of hepatic CD4 T cells for IL-13 after PMA/Ionomycin stimulation ($n=4-8$), *postn* expression (E.) ($n=5-8$), and flow cytometric analysis of hepatic eosinophils and neutrophils (F.) ($n=5-8$). Adipose inflammation was

measured by flow cytometric analysis of eosinophils and *tnfa* expression (G.) ($n=5-8$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. (Two-tailed T tests, $N=2-10$; $*=P<0.05$, $**=P<0.01$, $***=P<0.005$, $****=P<0.0001$)

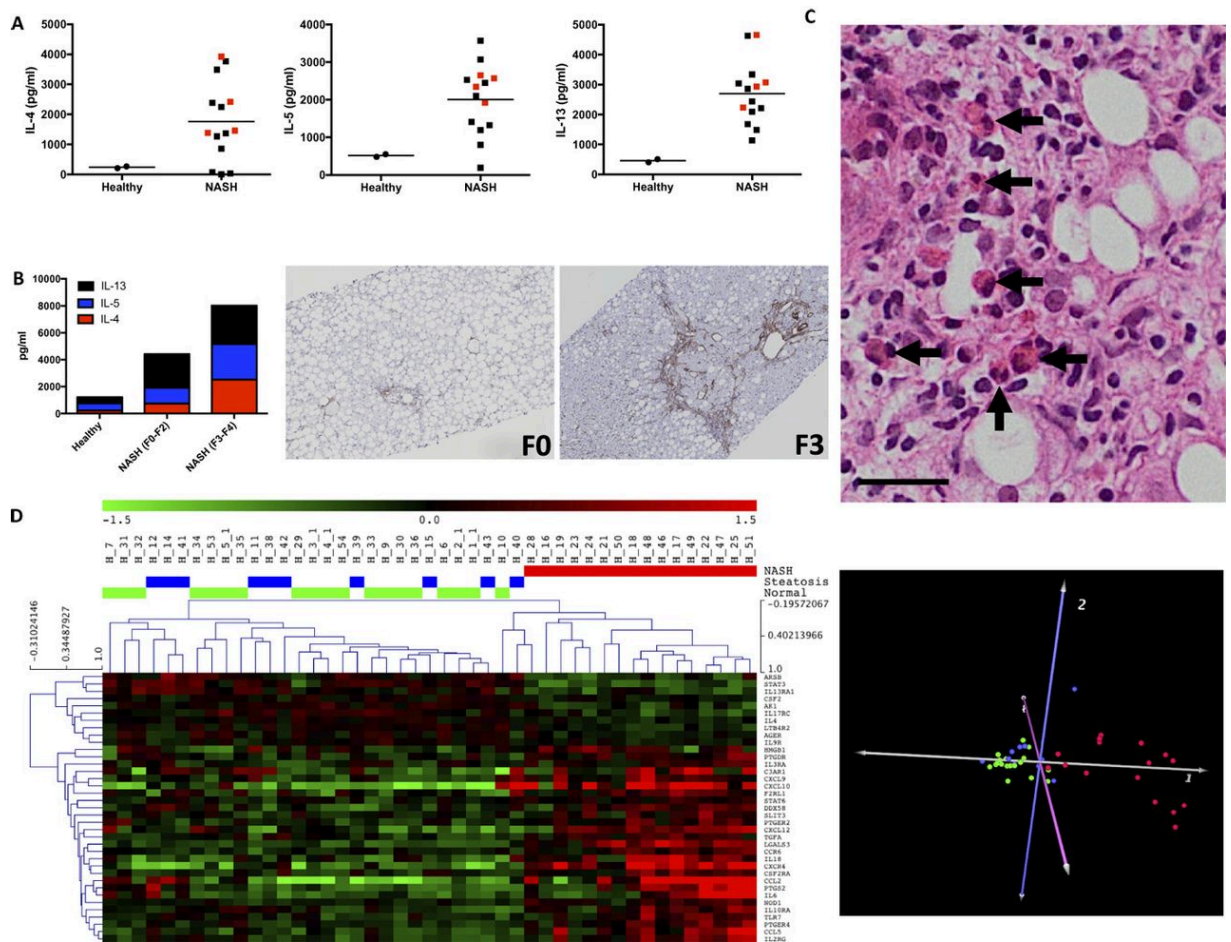


Figure 7. Human NASH is characterized by Type II Eosinophilic Inflammation

Cytokine production from healthy (circles) ($n=2$) and NASH (squares- red squares=HCV⁺ NASH patients) ($n=14$) patient liver biopsies was measured from expanded intrahepatic lymphocytes after a CD3/CD28 re-stimulation for IL-4, IL-5, and IL-13 (A.). Combined cytokine production stratified by METAVIR fibrosis score and representative anti-SMA histology from F0-F2 (left) and F3-F4 (right) biopsies (B.). Eosinophils were observed in H&E stained liver biopsies from patients (identified by arrows) (scale bar 25 μ m) (C.). Publicly available microarray data from healthy, steatotic and NASH liver biopsies was analyzed for eosinophil associated genes that demonstrated significantly altered expression, and hierarchical clustering by samples (left heat map) and principal component (right panel) analysis was performed based on this gene set (D.). All data points represent a single patient.

Supplementary Materials

Table S1. Primary Data

Materials and Methods

Histopathology

Murine liver lobes and perigonadal fat tissue (PGF) were harvested and fixed with a Bouin's-Hollande solution. Fixed tissue was embedded in paraffin for sectioning, and stained (Histopath of America) with Wright's Giemsa, picrosirius red with or without Fast green, or H&E.

Serum Analysis

Blood was collected in Serum Gel Z/1.1 tubes (Sarstedt) and serum was separated by centrifuging for 5 minutes at 5,000g. Serum was analyzed for sodium, potassium, chloride, calcium, magnesium, phosphorus, glucose, creatinine, uric acid, albumin, total protein, cholesterol, triglycerides, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), amylase, creatine kinase, and lactate dehydrogenase at the National Institutes of Health Clinical Center using a Vista Analyzer (Siemens; Deerfield, IL). Serum leptin was assessed by ELISA (R&D Systems DuoSet DY498).

Oil Red O Staining

As above, slides were removed from -80C and immediately fixed for 15 minutes using 10% neutral buffered formalin, briefly washed with water and stained for 30 seconds with Mayer's haematoxylin. After a wash in distilled water, sections were stained with freshly prepared and filtered Oil Red O solution (30 ml of 0.5g/100ml of isopropanol working stock diluted with 20 ml distilled water) for 10 minutes. Sections were rinsed again in distilled water and mounted with Fluormount G (Southern Biotech).

Cell Isolation and Flow Cytometry

Approximately 400 mg of liver or perigonadal adipose tissue was diced and incubated in 100 U/ml of collagenase (Sigma) at 37°C for an hour with rocking. Tissue was then passed through

a 70µm nylon filter to obtain a single cell suspension. Leukocytes were isolated on a 40% Percoll (Sigma) gradient, and treated with ACK buffer to remove erythrocytes. Isolated cells were either immediately fixed for cellular analysis or stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (10ng/ml) and ionomycin (1 µg/ml) in the presence of Brefeldin A (10 µg/ml) for three hours and fixed. Cells were permeabilized (Cytotfix/Cytoperm buffer; BD Biosciences; San Diego, CA) and stained for 30 minutes with antibodies for CD16/32, CD45, CD11b, CD4, IL-4, TNF- α , (Biolegend); Siglec F, Ly6G, Ly6C (BD Biosciences); IL-13 (ebioscience); and IFN- γ (Thermo Fisher).

Supplemental Figures

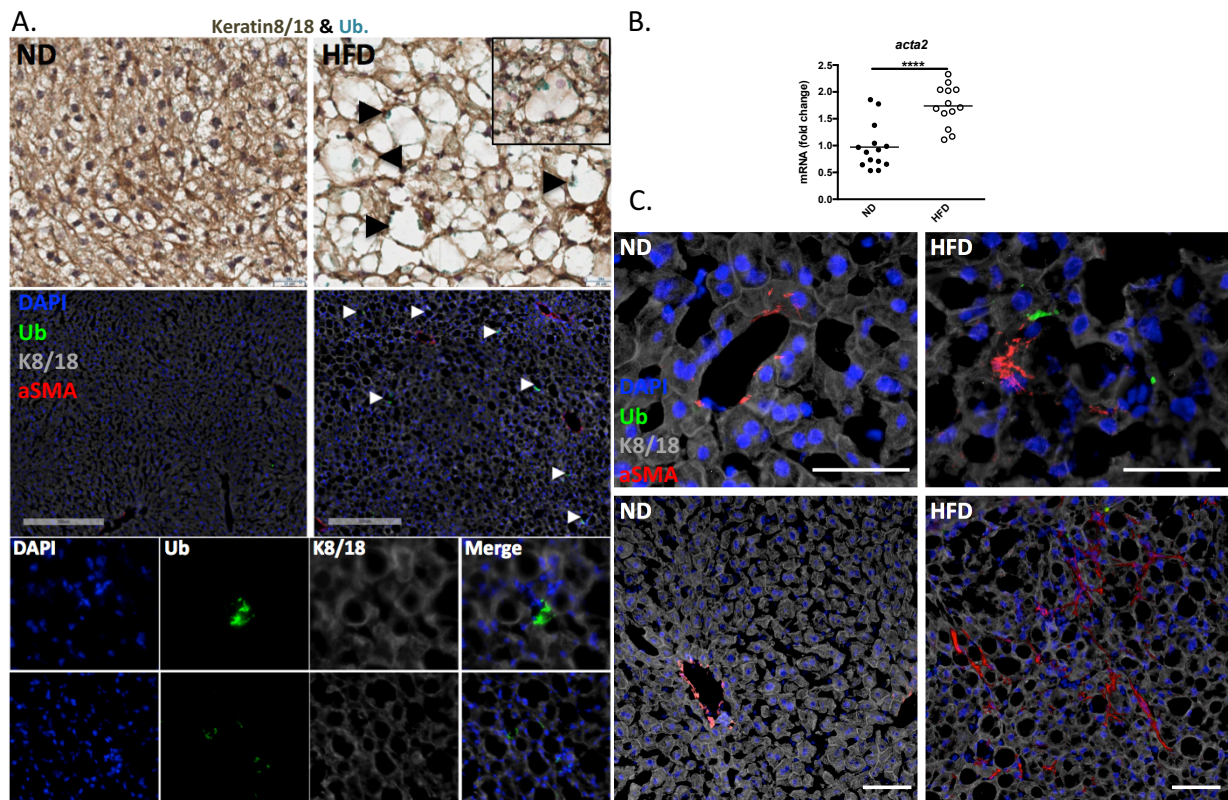


Figure S1. Chronic HFD induced NASH is associated with hepatic ballooning and activation of fibroblasts. Identification of ballooning hepatocytes by dual immunohistological staining for keratin8/18 and ubiquitin from chronic HFD fed mice (A. top panels). Immunofluorescent staining for keratin8/18 (gray), ubiquitin (green), aSMA (red), and nuclei (blue) eased identification of ballooned hepatocytes (arrowheads) (A.) Bottom panels demonstrating staining at higher magnification (A.). Tissue expression of *acta2* was measured in chronic HFD fed mice by qPCR ($n=12-13$), and also identified through immunofluorescent staining of keratin8/18 (gray), ubiquitin (green), aSMA (red), and nuclei (blue) (B.) at higher (upper panels) and lower (bottom panels) magnification.

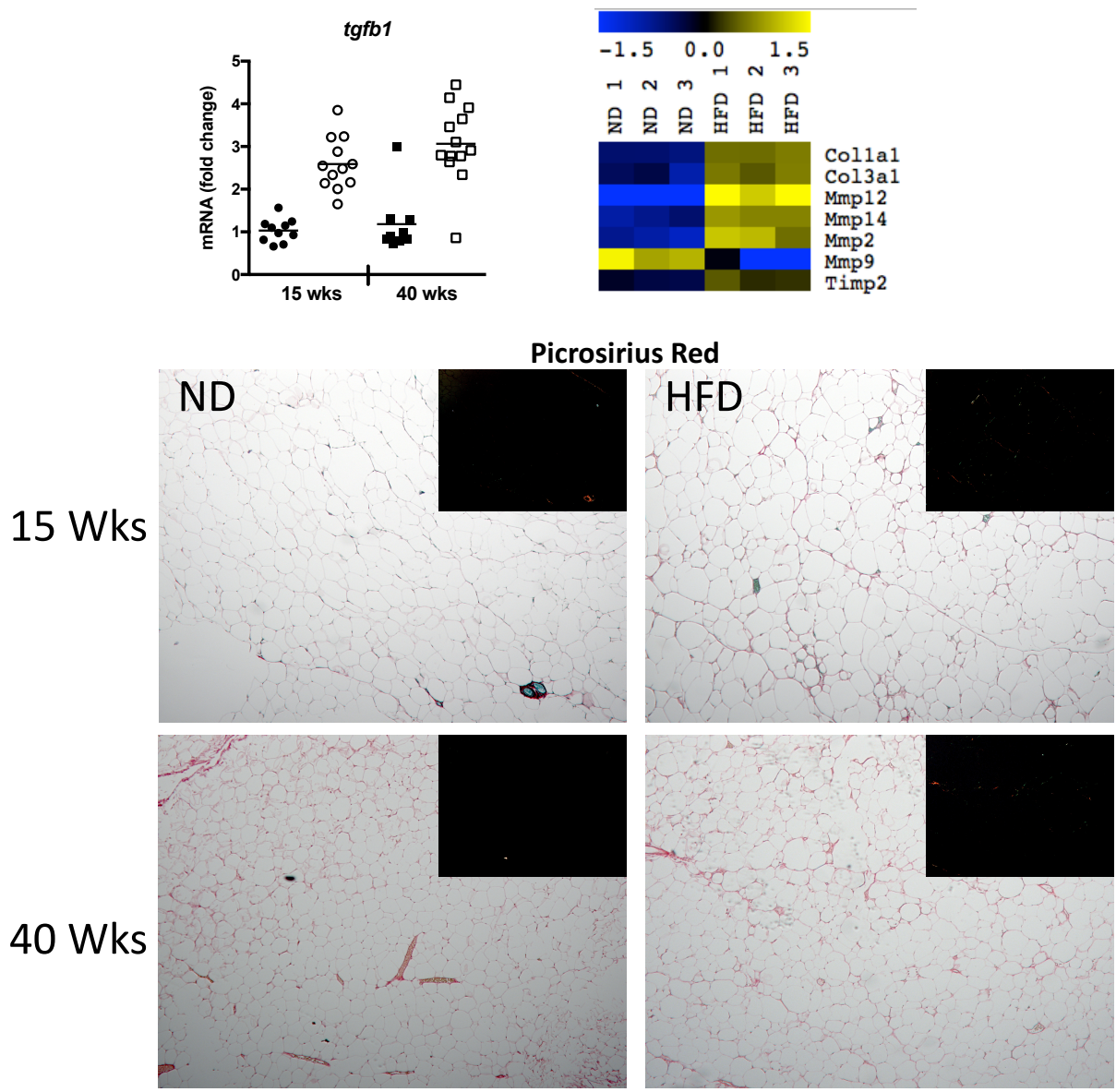
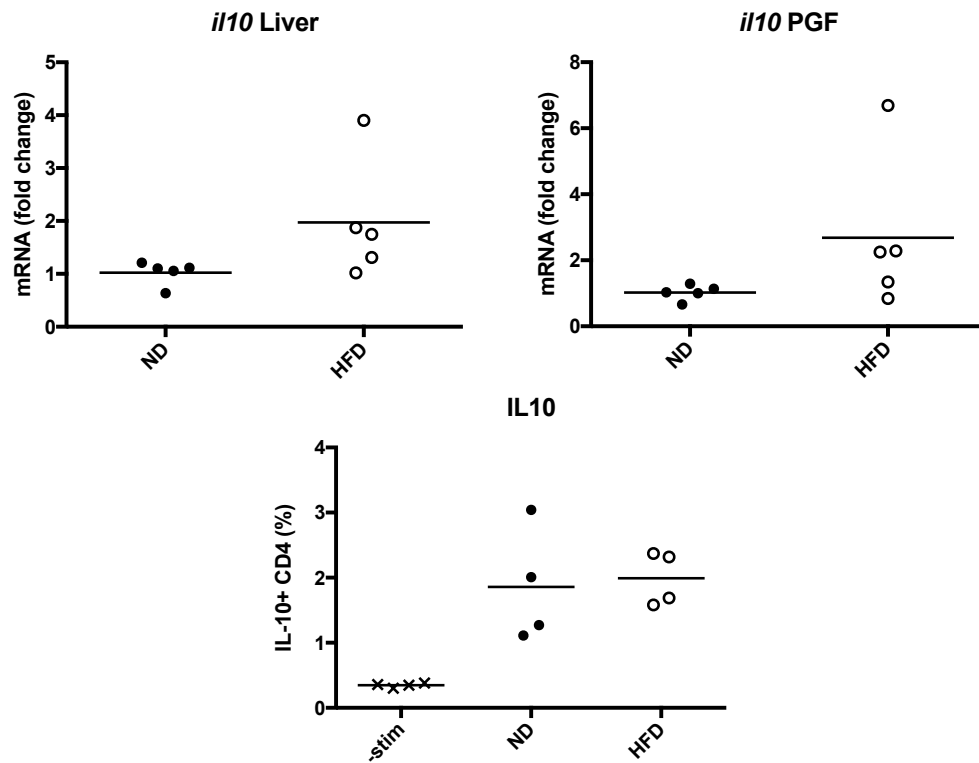


Figure S2. Analysis of adipose tissue fibrotic pathways and collagen deposition. Adipose tissue expression of *tgfb1* was assessed by qPCR ($n=9-13$), and pro and anti-fibrotic genes were measured by NANOSTRING analysis (heatmap). Picosirius red staining of adipose tissue was performed to monitor adipose fibrosis, and visualized under polarized light (inset).

A.



B.

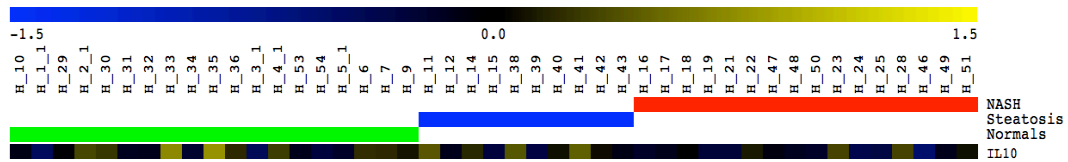


Figure S3. IL-10 in mouse and human NASH. Expression of IL-10 was measured by qPCR in liver and perigonadal fat of mice on HFD for 15 weeks ($n=5$), and by flow cytometric analysis of hepatic IL-10 producing CD4 T cells after stimulation at 40 weeks on HFD (A.) ($n=4$). Expression of *il10* was assessed in microarrays from patients (not significant) (B.).

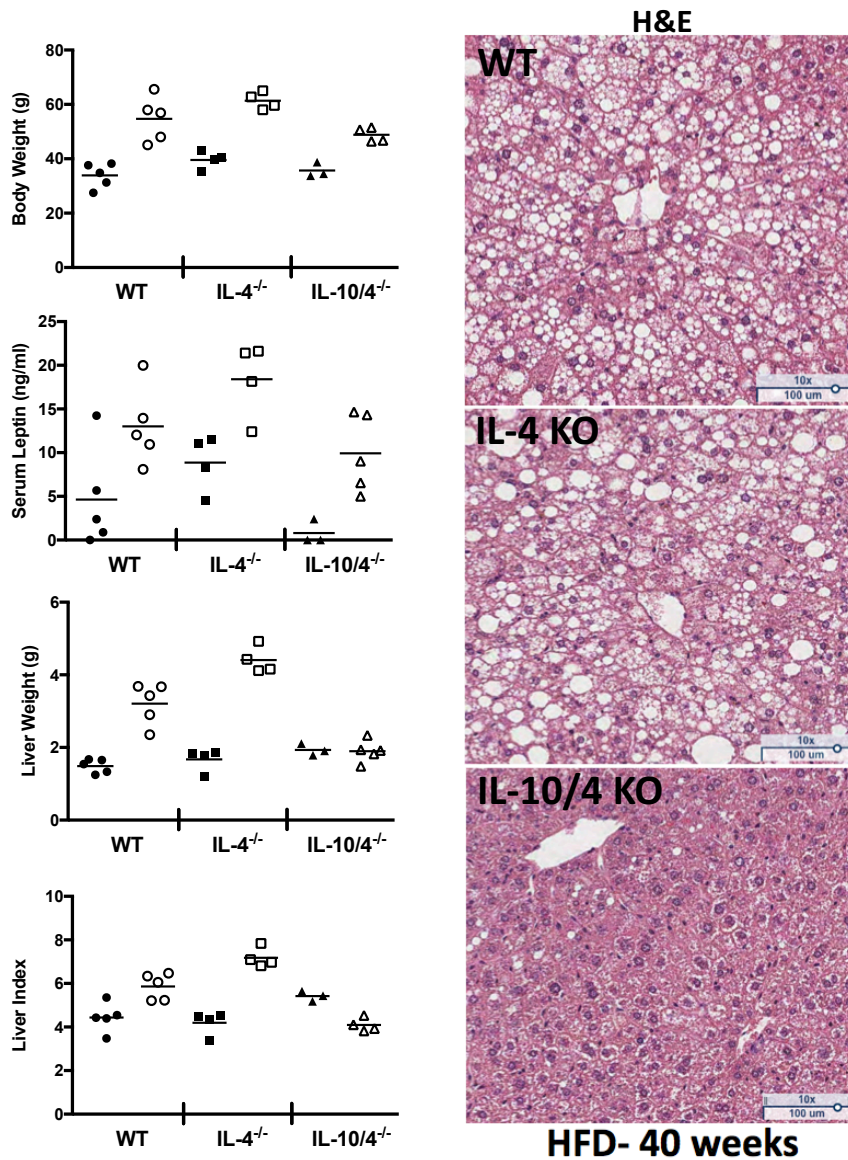


Figure S4. NAFLD/NASH in 40 week HFD challenged wild type, IL-4 and IL-10/4 knockout mice. Wild type (circles), IL-4^{-/-} (squares), and IL-10/4^{-/-} (triangles) mice were maintained on regular (filled symbols) or HFD (open symbols) for 40 weeks. Obesity was measured by body weight and serum leptin. NAFLD progression was assessed by liver weight and index, and H&E stained liver sections (WT top panel, IL-4^{-/-} middle, IL-10/4^{-/-} bottom panel). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown. ($n=3-5$).

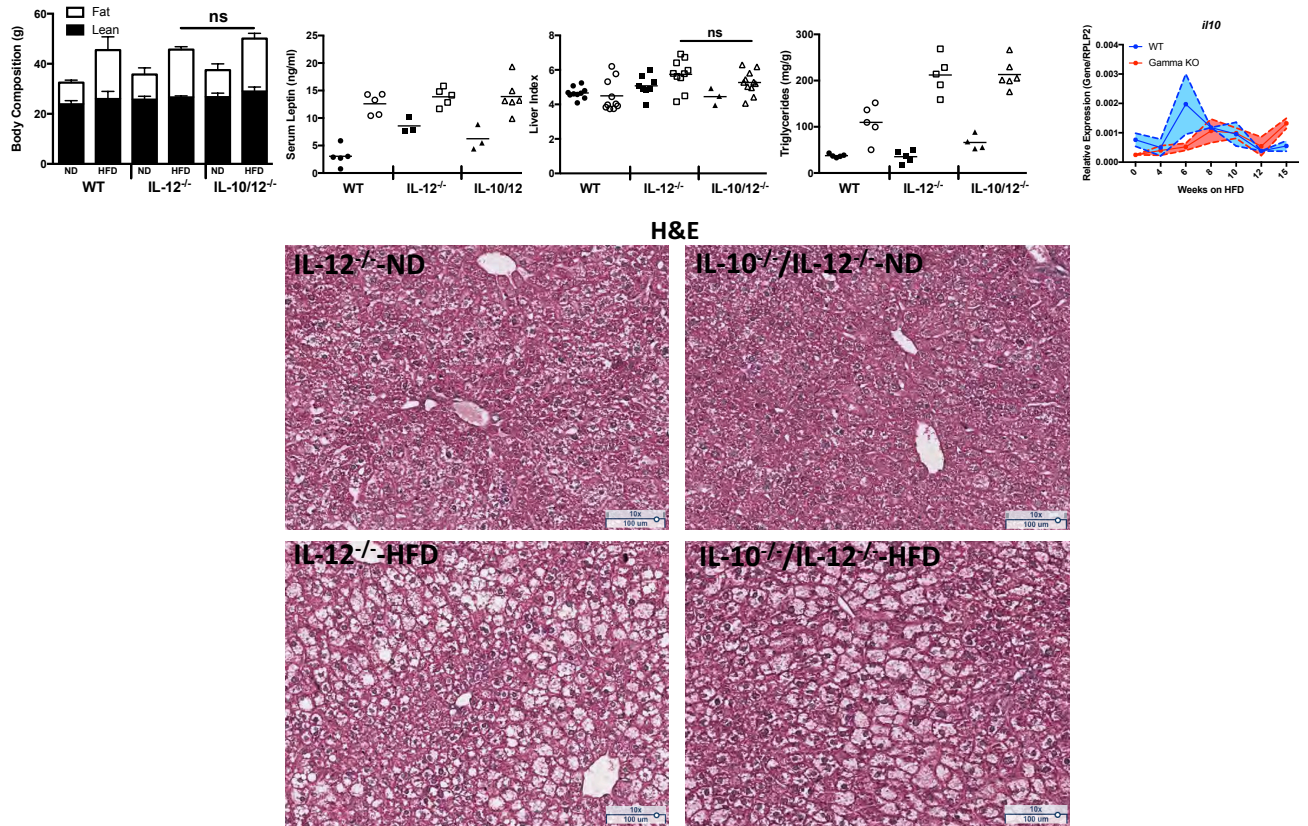


Figure S5. Comparison of IL-10 versus IL-12 deletion in NAFLD progression.

Wild type (circles), IL-12^{-/-} (squares), and IL-10/12^{-/-} (triangles) mice were maintained on regular (filled symbols) or HFD (open symbols) for 15 weeks. obesity was measured by MRI body composition ($n=4-6$). and serum leptin levels assessed by ELISA ($n=3-6$). NAFLD progression was assessed by liver index, hepatic triglyceride measurement, and giemsa stained liver sections ($n=3-11$). IL-10 expression was assessed from WT (blue) and IFN γ ^{-/-} (red) livers by qPCR. All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown.

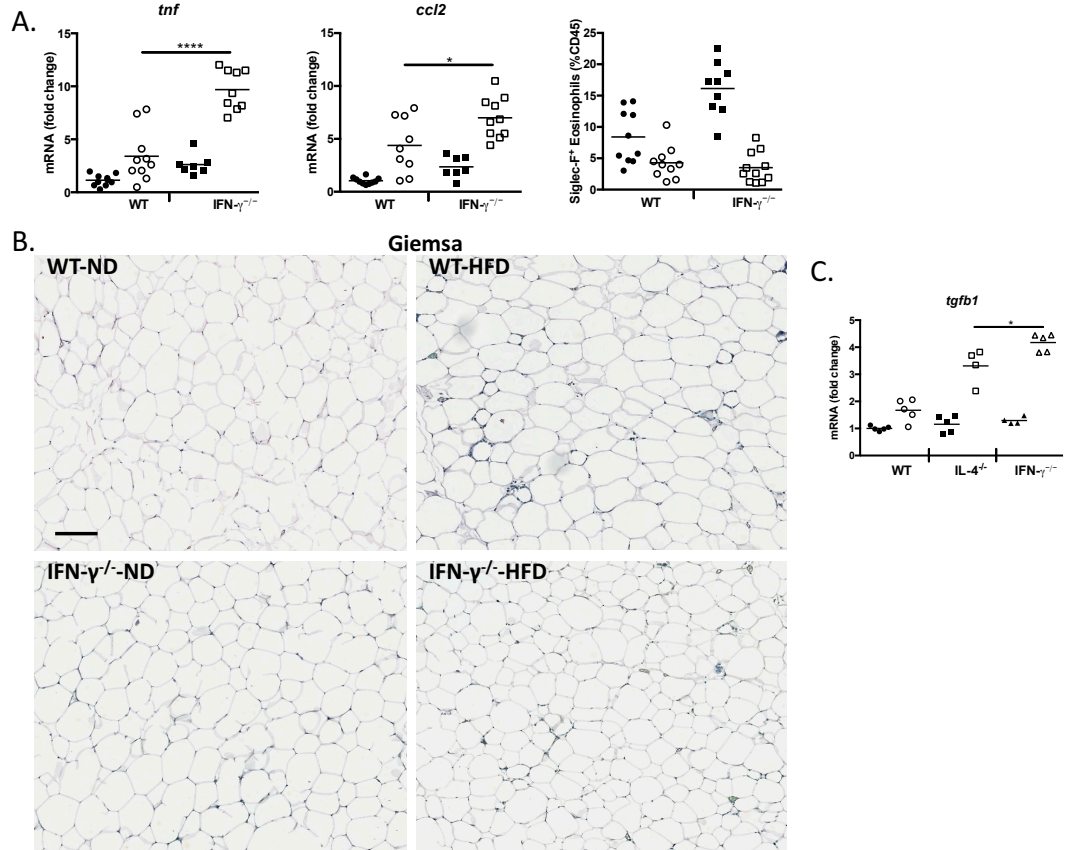


Figure S6 Adipose tissue inflammation in IFN- γ knockouts on a HFD. Wild type (circles) and IFN- $\gamma^{-/-}$ (squares) mice were maintained for 15 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols). Adipose tissue expression of *tnf* and *ccl2* was assessed from perigonadal fat tissue, and frequencies of siglec-f positive eosinophils amongst isolated CD45 leukocytes were quantified by flow cytometry (A.) ($n=7-10$). Giemsa stained adipose tissue sections were used to assess adipose inflammation (scale bar 200 μ m) (B.). Adipose expression of *tgfb1* was assessed by qPCR (C.) ($n=4-5$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown.

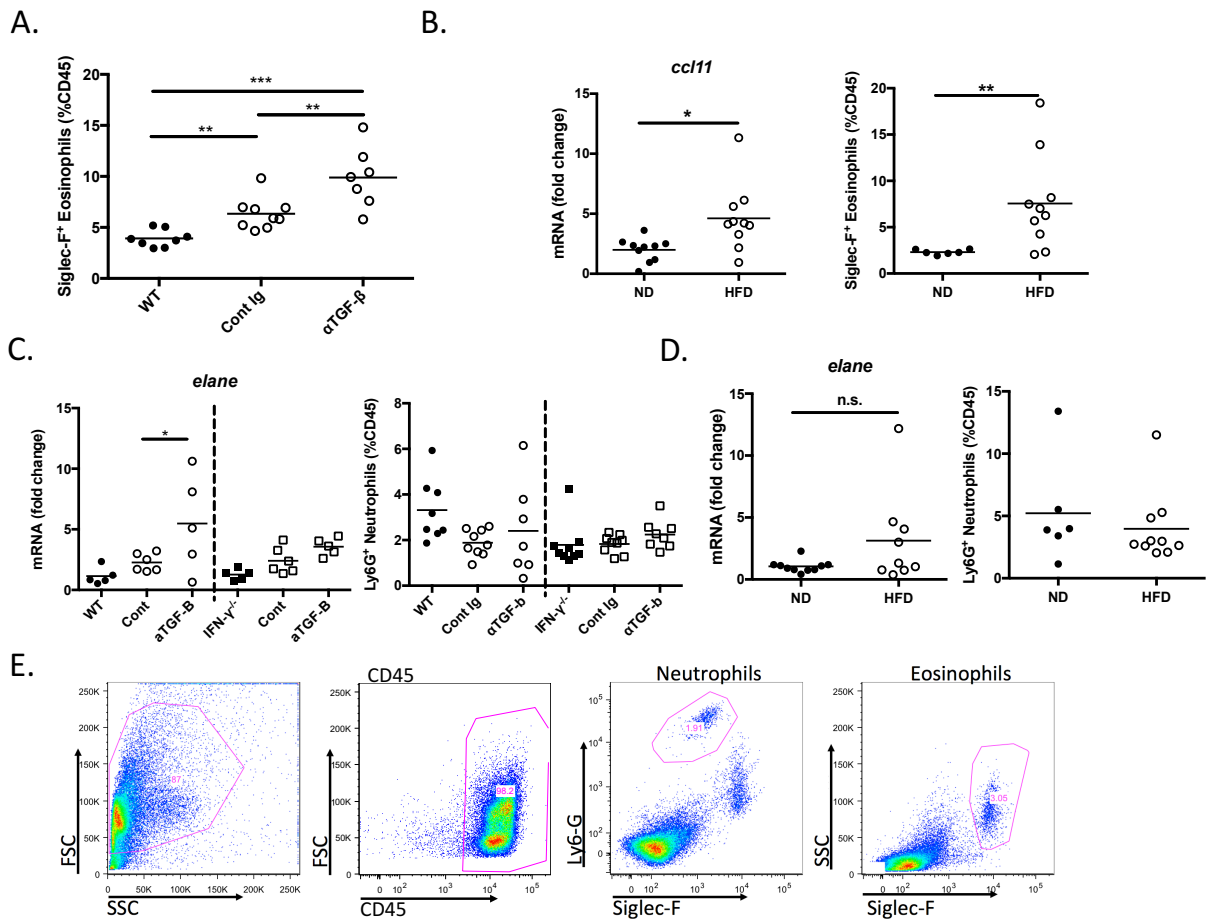


Figure S7. Presence of cellular mediators of inflammation in NAFLD/NASH. Expression of *ccl11* and frequencies of siglec-f positive eosinophils were quantified from mice on chronic HFD for 40 weeks (A.) ($n=6-15$). Isolated liver cell samples from wild type mice maintained for 40 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and received 4 weeks of biweekly control Ig (circles) or anti-TGF- β (squares) ($250 \mu\text{g}$ each) were assessed for eosinophil content (B.) ($n=6-10$). Wild type (circles) and IFN- $\gamma^{-/-}$ (squares) mice were maintained for 20 weeks on normal (filled symbols) or HFD (open symbols) and received 4 weeks of biweekly control Ig or anti-TGF- β ($250\mu\text{g}$ each) (C.) ($n=5-9$). Likewise, mice were maintained on chronic HFD for 40 weeks (D.) ($n=6-10$). Expression of neutrophil elastase (*elane*), and frequencies of Ly6G⁺ neutrophils amongst isolated CD45 positive liver leukocytes were quantified (A, B and C). Representative flow plots for neutrophils and eosinophils are also included. Cells were gated with a broad FSC and SSC, and singlets were excluded. Neutrophils were gated as Ly6C bright siglec-f negative and eosinophils were gated as SSC hi and Siglec-F bright amongst CD45

positive cells (D.). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown.

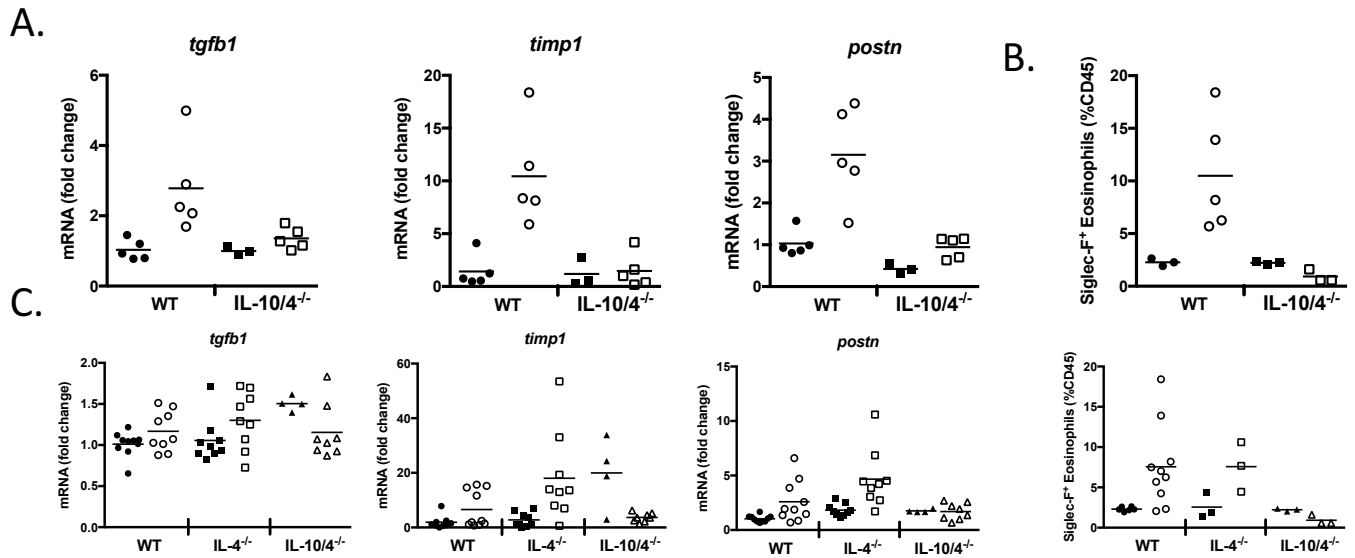


Figure S8. IL-10/4 knockout animals have long term protection from HFD-induced NASH. Wild type (circles) and IL-10/4^{-/-} (squares) mice were maintained on regular (filled symbols) or HFD (open symbols) for 40 weeks. Liver expression of *tgfb1*, *timp1* and *postn* were assessed by qPCR (A.). Liver eosinophils were measured by flow cytometry (B.) ($n=3-5$). Wild type (circles), IL-4^{-/-} (squares), and IL-10/4^{-/-} (triangles) mice were maintained on regular (filled symbols) or HFD (open symbols) for 15 weeks and liver expression of *tgfb1*, *timp1* and *postn* were assessed by qPCR ($n=4-10$). Frequencies of IL-13 producing CD4 T cells in the liver were assessed by flow cytometry after stimulation ($n=8-15$). All data points represent a single mouse, representative or pooled data from two or more independent experiments are shown.

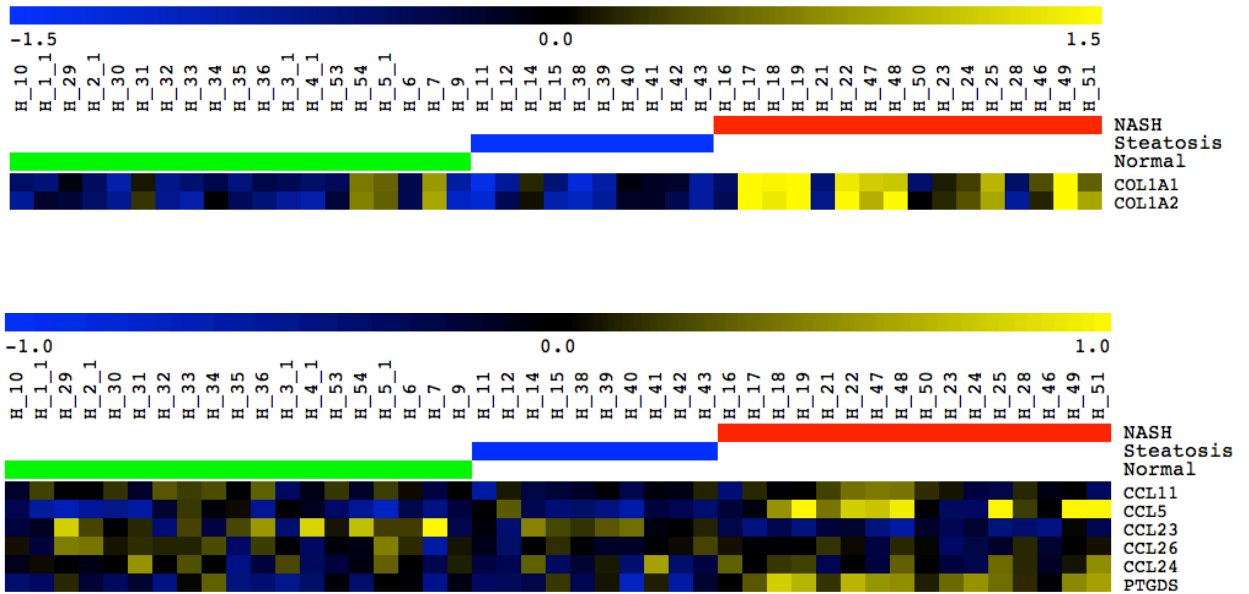


Figure S9. Collagen and eosinophil associated chemoattractant expression alterations in patient biopsies.

Analysis of publicly available microarray data from healthy, steatotic and NASH liver biopsies for expression of *coll1a1* and *coll1a2*. Additional analyses of the eosinophil associated chemoattractant associated *CCL5*, *CCL23*, and *PTGDS*.

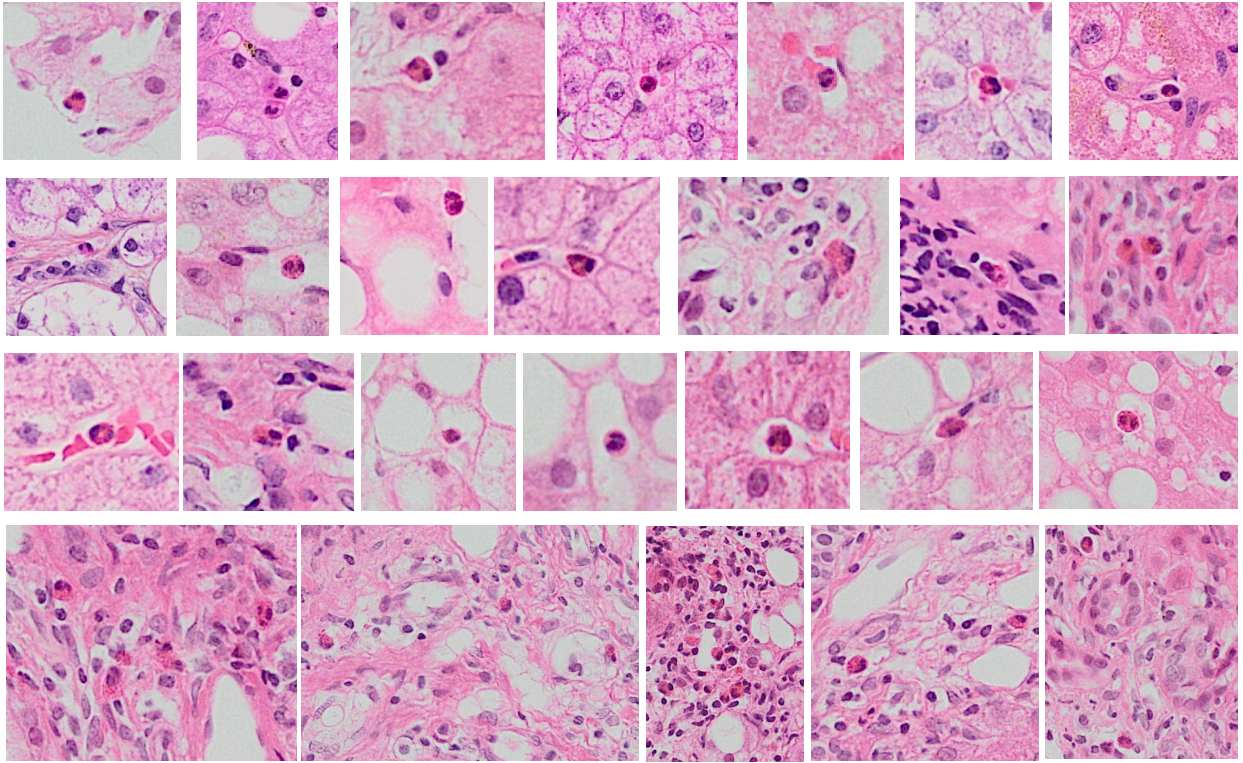


Figure S10. Representative histological eosinophils in NASH patient biopsies. Eosinophils were observed in H&E stained liver biopsies from patients. Each image is from an independent patient biopsy (n=26) (images are 150-350x magnified).

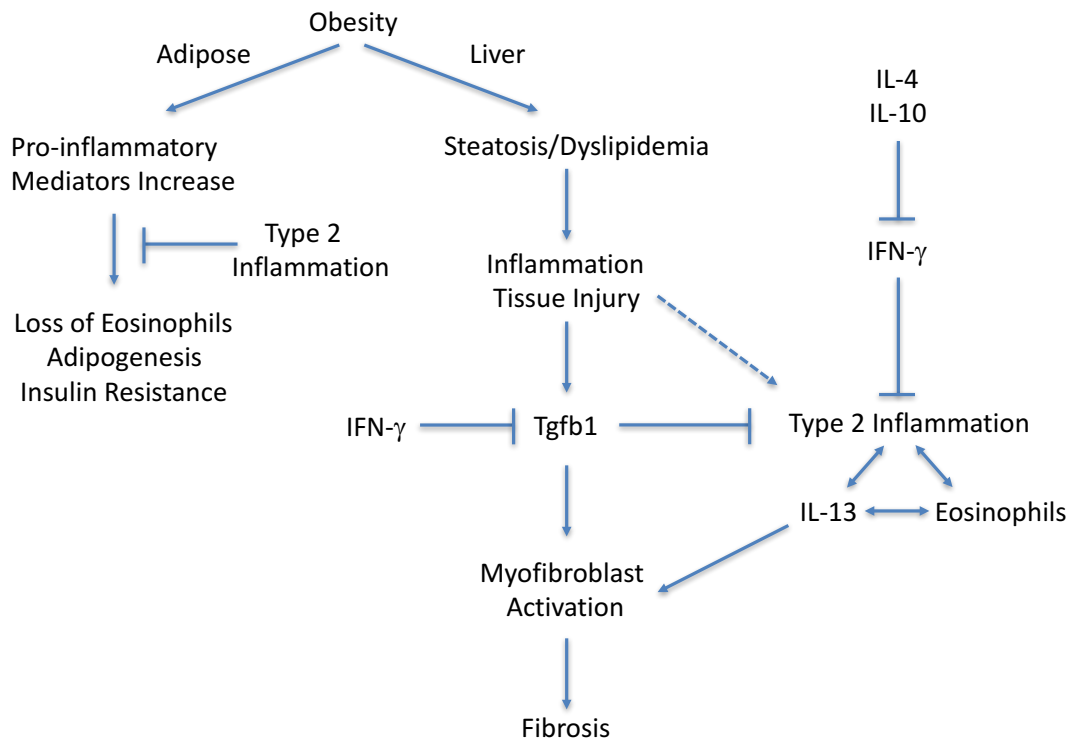


Figure S11. Inflammatory pathways in NASH progression. Model highlighting the key pathways driving adipose tissue inflammation and liver fibrosis in NAFLD. Type 2 immunity (IL-4/5/13) maintains adipose tissue homeostasis and insulin sensitivity by reducing type 1 inflammation in fat, with eosinophils playing a key protective role. In contrast, eosinophil numbers increase in the liver during NASH, with increases in type 2 immunity contributing to the development and progression of NAFLD fibrosis collaboratively with TGF- β 1. Chronic HFD causes steatosis, dyslipidemia, and hepatic injury, which activates pro-wound healing TGF- β 1 and IL-13 responses in the liver that contribute to the development of fibrosis. NAFLD is negatively regulated by IFN- γ through its regulation of TGF- β and type-2 inflammation, suggesting opposing roles for type 1 inflammation in adipose tissue inflammation and liver fibrogenesis in obesity.

V. Discussion et conclusion

1. Conclusions générales

La persistance de l'inflammation hépatique en réponse à des insultes tissulaires chroniques est directement liée à la progression de la fibrose. L'inflammation est médiée en partie par notre système immunitaire par la sécrétion de cytokines et de chimiokines. Les réponses inflammatoires sont complexes et peuvent être divisées en trois types. La balance entre l'inflammation de type I et de type II est fortement associée à la progression de la fibrose. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la progression de la fibrose ont été caractérisés dans ces deux contextes inflammatoires ^{2, 4}. Le rôle de l'inflammation de type III, qui est virtuellement présente dans la majorité des maladies inflammatoires humaines, est relativement peu exploré dans la fibrose hépatique. L'objectif de ces études était de caractériser le rôle de l'inflammation de type III, induite par les Th17, dans la progression de la fibrose hépatique. Puis, d'élucider les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels les cytokines de type III (IL-17A et IL-22) contribuent à la progression de la fibrose *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons étudié une cohorte de 62 patients souffrant de différents types d'hépatites chroniques avec différents stades de fibrose (Manuscrit 1). Cette cohorte nous a permis d'étudier l'inflammation de type III lors des hépatites chroniques et la progression de la fibrose en la comparant à l'inflammation de type I et de type II. Nous avons ainsi observé une augmentation du ratio Th17/Treg *ex vivo* et *in situ* chez les individus avec une fibrose avancée (F3-F4, quantifiée par le score METAVIR). De plus, nous avons observé une production accrue d'IL-17A et d'IL-22 par les lymphocytes intrahépatiques (IHLs) isolés chez des patients avec une fibrose avancée comparativement à ceux avec une fibrose modérée indépendamment de l'étiologie sous-jacente. Ces observations démontrent une dérégulation de l'inflammation de type III qui corrèle avec la progression de la fibrose. Nous avons aussi validé cette signature en consultant de données publiques de bio-puces sur des foies fibrotiques dans une étude sur NASH et sur l'infection par HCV. De plus, nous avons observé une dérégulation de l'inflammation de type II, chez les patients souffrant de NASH, que nous avons pu validé *in vivo* en collaboration avec Dr. Wynn (Manuscrit 1 et 3)²²².

Nous avons ensuite caractérisé les effets de l'IL-17A et de l'IL-22 sur les HSCs humaines (Manuscrit 1 et 2). Nous avons démontré que ces deux cytokines ne sont pas capables d'induire directement l'activation des HSCs. Cependant, elles augmentent la réponse des HSCs au TGF- β , la cytokine profibrotique majeure, par des mécanismes indépendants. L'IL-17A stabilise l'expression du TGF- β -RII à la surface des HSCs par l'activation de la voie JNK³³⁷ (Manuscrit 2). L'IL-22 quant à elle n'agit pas au niveau du récepteur au TGF- β , mais au niveau de la transduction du signal en augmentant la phosphorylation de SMAD2/3 par l'activation de p38 (Manuscrit 1, Figure 3-4). Nous avons reporté pour la première fois une nouvelle fonction profibrotique pour l'IL-22. Nous avons validé *in vivo* ces observations en utilisant des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-22 dans des modèles d'insultes hépatiques chroniques par administration de TAA ou de CCl₄ (Manuscrit 1, Figure 5). Ces souris démontrent une fibrose réduite comparativement aux souris sauvages issues de la même portée.

Enfin nous avons étudié si l'inhibition de l'inflammation de type III par l'administration d'antagoniste *in vivo* contre les facteurs de transcription essentiels pour la production d'IL-17A et d'IL-22 : ROR γ t et AHR^{281, 284}. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules IL-22⁺ dans le foie chez les animaux traités avec chacun des deux antagonistes, ainsi qu'une réduction de la fibrose hépatite (Manuscrit 1, Figure 6).

Ensemble nos résultats démontrent que l'inflammation de type III contribue à la progression de la fibrose hépatique. De plus, nous avons rapporté de nouvelles fonctions profibrotiques précédemment inconnues pour l'IL-17A et l'IL-22. Ces cytokines sensibilisent les HSCs à l'action du TGF- β au niveau du récepteur et de la transduction du signal, respectivement. Ces effets résultent de l'activation non canonique des MAPKs : JNK pour l'IL-17A et p38 pour l'IL-22. Finalement, nous avons démontré que l'inhibition de l'inflammation de type III, par l'administration d'antagonistes contre les facteurs de transcription ROR γ t et AHR, représente une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la fibrose hépatique.

2. Établissement d'une banque de biopsies hépatiques

Pour réaliser cette étude, nous avons établi une banque de biopsies hépatiques en collaboration avec la clinique d'hépatologie du CHUM. La nature de la participation, après

consentement informé du patient, est une prise de sang, un accès aux données cliniques et aux tissus fixés en paraffine et un fragment frais de la biopsie hépatique. Les critères d'exclusion pour cette étude étaient d'être mineur, d'avoir reçu une greffe hépatique (bien que nous ayons commencé le recrutement de ce type de patient pour des études futures) ou d'un autre organe et d'avoir une pathologie auto-immune notable comme la colite, le psoriasis ou la sclérose en plaques. En effet, les individus greffés sont traités avec des immunosuppresseurs qui pourraient influencer sur la caractérisation immunologique des IHLs. Les patients souffrant d'autres pathologies inflammatoires chroniques que les hépatites ont été exclus, car la réponse immunitaire induite par l'autre pathologie peut influencer nos résultats.

L'utilisation des tests non invasifs a grandement réduit le nombre de biopsies hépatiques au cours de la dernière décennie. De plus, la biopsie est une méthode invasive rendant impossible l'obtention de ce type de spécimen à des fins de recherches uniquement. De ce fait, nos patients ont été recrutés dans le cadre d'un suivi clinique. La majorité des patients recrutés avaient un résultat de fibroscan et de fibrotest sanguin discordant, ce qui a mené à une biopsie et à l'évaluation pathologique pour l'établissement du diagnostic. Le score de fibrose fut évalué par un pathologiste en utilisant le score METAVIR, qui est optimal pour les patients souffrant d'hépatites virales. Notre cohorte regroupe des patients souffrant du VHC et du VHB regroupés dans un groupe hépatites virales (VH) et des patients souffrant d'autres étiologies (groupe hépatites non virales : NVH) comme NASH (majorité) et d'hépatites auto-immunes. Le choix du score METAVIR a été fait, car il peut donner un score d'inflammation (activité). La diversité des cas d'hépatites dans notre cohorte a rendu difficile le choix du test, car aucun n'est adapté à toutes ces étiologies, ce qui représente probablement une limitation de cette étude.

De plus, nous avons regroupé les patients par stade de fibrose modéré (F0-F2) et avancé (F3-F4). Nous aurions aimé pouvoir faire une stratification plus précise de nos patients, à savoir pour chaque stade de fibrose. Cependant, puisque le nombre de patients qui reçoivent une biopsie est bas et que les tests non-invasifs permettent un bon diagnostic lorsque la fibrose est faible, nous avons dû regrouper nos patients afin de pouvoir faire une comparaison à l'aide des tests statistiques.

Malgré ces difficultés nous avons pu établir une cohorte relativement homogène avec une moyenne d'âge de 50.6 ans (VH : 53.1 ans, NVH : 49.6 ans), moyenne d'ALT dans le sérum 103 IU/mL (VH : 93.3 IU/mL, NVH : 106 IU/mL), de 34 hommes et de 28 femmes, avec des

cas de fibrose modérée (F0-F2) et de fibrose avancée (F3-F4) qui sont répartis équitablement dans les groupes VH et NVH; nous permettant ainsi de comparer nos groupes sans un grand impact de facteurs confondants pour la progression de la fibrose comme le sexe et l'âge ¹.

3. Signature inflammatoire des lymphocytes intrahépatiques associée à la progression de la fibrose hépatique

De nombreuses études ont démontré que la progression de la fibrose hépatique est associée à une altération de la balance entre l'inflammation de type I (IFN- γ , IL-6) et l'inflammation de type 2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 et IL-13) dans des modèles murins ^{2, 5, 6, 139, 160, 161, 264}. Chez l'homme, ces observations ont été principalement validées par la stimulation *in vitro* d'HSCs par l'IL-4, l'IL-13 et l'IFN- γ ^{338, 339, 340}. De plus, des fréquences accrues de T-CD4 produisant l'IL-4 dans le foie et le sang périphérique ainsi qu'une diminution de l'expression des ARNm des cytokines de type I ont été reportées chez des patients souffrant d'infection parasitaire ³⁴¹. Une étude chez des patients souffrant de l'hépatite n'a quant à elle démontré aucune différence entre l'expression des cytokines de type I et de type II lors de la progression de la fibrose ³⁴². Les limitations majeures de ces études sont l'accès limité à des IHLs ainsi que les techniques employées qui ne sont pas aussi sensibles que des techniques actuelles.

Nous avons quantifié simultanément par LegendPlex (Biolegend) la sécrétion des cytokines de type I (IFN- γ , IL-6, TNF- α), de type II (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13) et de type III (IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22) par les IHLs après 48 h de stimulation polyclonale (CD3/CD28). Cette technique ultra-sensible (limite de détection 20 pg/mL) nous a permis d'établir une signature cytokinique associée à la progression de la fibrose chez nos deux groupes de patients (VH et NVH). La limitation majeure de cette approche est que la production de cytokines mesurée reflète uniquement la production par les lymphocytes (T-CD4, T-CD8, MAIT et $\gamma\delta$ -T). De plus, le faible nombre de lymphocytes extraits ($\sim 10^5$ cellules) dans un fragment de biopsie (~ 0.5 cm) ne permet pas directement de réaliser cette technique. Nos lymphocytes, après extraction, sont mis en expansion pendant 15 jours en présence de cellules mononuclées du sang périphérique ou « peripheral blood mononuclear cells » (PBMCs)

autologues irradiés avec anti-CD3. Il est possible que cette expansion altère le phénotype de nos cellules.

3.a. L'inflammation de type I n'est pas associée à la progression de la fibrose hépatique

Nous avons d'abord observé que les cytokines de type I (IFN- γ et TNF- α) sont les plus abondamment produites lors des insultes hépatites chroniques (Manuscrit 1, Figure 2A-2B). Ceci suggère que l'inflammation de type I est responsable des dommages hépatiques qui peuvent être mesurés par la mort des hépatocytes et une élévation des ALT dans le sérum. Cependant, cette réponse ne corrèle pas avec la progression de fibrose hépatique puisque les niveaux d'IFN- γ et de TNF- α sont similaires entre les patients avec fibrose modérée et sévère dans les groupes VH et NVH. Ces observations confirment les résultats d'études précédentes dans des modèles murins, et ceux de Li et al. chez l'homme^{4, 5, 342}.

3.b. L'inflammation de type II est associée à la progression de la fibrose hépatique lors de la stéatose hépatique

Ensuite, nous avons observé une augmentation significative des cytokines de type II (IL-4, IL-5 et IL-13) d'environ 4 fois chez les patients avec une fibrose avancée dans le groupe NVH comparativement au groupe VH (Manuscrit 1, Figure 2A-2B). Cette élévation était spécifique au patient souffrant de NASH (Manuscrit 3, Figure 7A-B) et elle démontre que la nature de l'insulte hépatique peut entraîner une signature immunologique spécifique associée à la progression de la fibrose hépatique (discuté dans la prochaine section). L'IL-10, une cytokine anti-fibrotique associée à la régénération tissulaire^{2, 300, 343, 344, 345}, était aussi significativement augmentée chez les patients avec une fibrose avancée indépendamment de l'étiologie sous-jacente. L'IL-10 peut inhiber l'activation des HSCs, augmenter leur susceptibilité à être éliminé par les NKs en augmentant l'expression de FAS/FAS-L, mais aussi limite l'activation des lymphocytes T traversant l'endothélium hépatique^{51, 300, 343, 344, 345}. Il est possible que l'hôte essaie de contrôler cette réponse pathogénique en augmentant la production d'IL-10, cependant les niveaux et le nombre de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques présent dans le milieu contrecarrent probablement son effet. Enfin, l'IL-9 était augmenté significativement au

stade de fibrose avancée dans le groupe VH. L'IL-9 est une cytokine produite principalement par les Th9, une sous-population de Th2 nécessitant le TGF- β pour se différencier, qui peut avoir des fonctions pro- et anti-inflammatoires²⁷⁴. Son rôle dans la fibrose hépatique chez l'homme est encore peu exploré. Cependant des études *in vivo* récentes démontrent un rôle pathogénique dans la progression de la fibrose hépatique dans un modèle parasitaire schistosome et de CCl₄²⁷⁷. L'IL-9 permet de contrôler le recrutement des Th17 et elle pourrait donc influencer la réponse de type III²⁷⁶. Cependant, les facteurs menant à une altération de l'IL-9 spécifiquement dans les infections virales comparativement à NASH nécessitent d'être étudiés.

3.c. L'inflammation de type III est associée à la progression de la fibrose hépatique indépendamment de l'étiologie sous-jacente

Finalement, nous avons observé une augmentation significative (~ 5 fois) des cytokines de type III, IL-17A et IL-22, chez les patients avec une fibrose avancée dans les hépatites virales et non virales (Manuscrit 1, Figure 2A-C). Cette signature immunologique apparaît donc comme commune à la progression de la fibrose hépatique. L'étude de Li et al. n'avait pas évalué la production de cytokine de type III³⁴², cependant ce résultat est en accord avec des études sur les hépatites alcooliques et l'infection par le VHB qui ont reporté une augmentation de l'IL-17A ou de l'IL-22 dans les foies fibrotiques^{295,297}. Il est intéressant de noter que l'IL-17F était aussi significativement élevée dans les foies fibrotiques lors des hépatites virales. L'IL-17F et l'IL-17A possèdent une forte redondance dans leurs fonctions et l'expression des gènes qu'elles induisent³⁴⁶. De plus, *in vitro* et *in vivo*, ces deux cytokines augmentent la réponse fibrotique²⁹³. Néanmoins, il serait important de déterminer les facteurs menant à une production accrue d'IL-17F dans les hépatites virales puis de mieux caractériser les mécanismes moléculaires par lesquels l'IL-17F agit sur les HSCs (discuté dans la section 6).

En conclusion, la force de notre étude est d'avoir comparée simultanément l'inflammation de type I, de type II et de type III, permettant ainsi de démontrer que l'inflammation de type III est une signature commune de la progression de la fibrose. De plus, nous avons pu déterminer une signature mixte de type II et de type III associée à la progression de la fibrose spécifiquement dans NASH. Cette signature apporte de nouvelles perspectives de

recherche puisqu'à ce jour, une réponse mixte type II et de type III n'a jamais été reportée, puisque le dogme est que la réponse de type II inhibe les réponses de type I et de type III ².

4. Rôle opposé de l'inflammation de type I et de type II dans la progression de la fibrose lors de stéatose hépatique

Bien que la progression de la fibrose soit caractérisée par une dérégulation de la balance entre l'inflammation de type I et de type II ⁴, la recherche sur la progression de la fibrose dans le contexte de NASH a principalement porté sur la réponse de type I. En effet, le syndrome métabolique caractéristique de l'obésité est médié par une perte de l'homéostasie induite dans le tissu adipeux et le pancréas. Plusieurs études ont reporté que l'augmentation d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- α en réponse à l'activation des TLRs est associée à la progression de la pathogenèse ^{347, 348}. Tandis que l'inflammation de type II, caractérisée par la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 et le recrutement des éosinophiles, contribue à l'homéostasie ^{349, 350}. Le dogme dans NASH est que l'inflammation de type I contribue à la progression de la fibrose tandis que l'inflammation de type II limite la progression de celle-ci. Cependant, nous n'avons pas observé de dérégulation des cytokines de type I, mais une augmentation importante des cytokines de type II dans notre analyse (Manuscrit 1, Figure 2A-2B et Manuscrit 3, Figure 7 A-B).

En collaboration avec Dr. Wynn au NIH, nous avons étudié le potentiel rôle pathogénique de l'inflammation de type I et de type II dans un modèle murin de stéatose-hépatique. Nous avons utilisé deux types de diètes riches en gras qui miment la pathogenèse de la stéatose humaine en induisant l'obésité, un syndrome métabolique et la fibrose hépatique (Manuscrit 3, Figure 1). La force de ce modèle réside dans la combinaison du syndrome métabolique et de la fibrose hépatique qui n'est pas observée avec les diètes avec déficience en choline et méthionine. Après 40 semaines, les souris sauvages sous diète riche en gras ont une augmentation de la masse corporelle, une augmentation leucocytaire dans le foie, accumulation lipidique avec ubiquitination hépatocytaire caractéristique de NASH et un syndrome métabolique avec élévation de la leptine, des triglycérides et des ALT dans le sérum ¹⁷⁵. De plus, ces souris développent une fibrose hépatique observable par coloration au rouge de picro Sirius. Dans le tissu adipeux, nous avons aussi observé une diminution des éosinophiles et une

augmentation des cytokines de type I, ce qui suggère que ce modèle est proche de la physiopathologie du NASH chez l'homme.

Afin d'étudier l'impact de la réponse de type I et de type II, nous avons utilisé des souris déficientes pour l'IL-4 (IL-4^{-/-}) ou doubles déficientes pour l'IL-4 et l'IL-10 (IL-4/IL-10^{-/-}) et des souris déficientes pour l'IFN- γ . La déficience pour les cytokines de type 2 entraîne par compensation une réponse de type I accru tandis que la déficience en IFN- γ menant à un biais vers la réponse de type II. Ces lignées permettent ainsi d'étudier *in vivo* l'impact de ces deux réponses.

Nous avons d'abord observé que les souris déficientes pour l'inflammation de type II (IL-4^{-/-} et IL-4/IL-10^{-/-}) ont une prise de poids, un syndrome métabolique et une inflammation hépatique similaire à des souris sauvages. De plus, elle démontre une légère augmentation de l'inflammation dans le tissu adipeux en concordance avec les études précédentes montrant un rôle de cette réponse dans l'homéostasie adipeuse^{349, 350}. Cependant, ces souris sont protégées contre la stéatose et la fibrose hépatique (Manuscrit 3, Figure 2). À l'inverse, nous avons observé chez les souris déficientes pour l'IFN- γ une augmentation importante de la fibrose hépatique après seulement 15 semaines de diète riche en graisse (Manuscrit 3, figure 3). Ces souris ont une élévation significative de TGF- β et d'IL-13, deux cytokines impliquées dans la progression de la fibrose hépatique et négativement régulées par l'IFN- γ ^{2, 6, 161}. De plus, nous avons démontré que les cytokines de type II sont principalement produites par les Th2 et les éosinophiles dans le foie des souris IFN- γ ^{-/-}. Nous avons ensuite validé ces observations dans notre cohorte de patients montrant que les patients souffrant de NASH ont une production accrue d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 avec la progression de la fibrose ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles accrue dans le foie avec la progression de la fibrose (Manuscrit 3, Figure 7 A-C). Il est important de noter que cet enrichissement en éosinophiles est spécifique au foie puisque nous n'avons pas observé de différence significative dans le nombre d'éosinophiles dans le sang de nos patients mesuré par la formule sanguine. De plus, nous avons validé cette signature d'éosinophile dans des données publiques de bio-puces¹⁷⁴ comparants des foies stéatotiques sans fibrose avec des foies stéatotiques avec une fibrose avancée (Manuscrit 3, Figure 7D).

En conclusion, nous avons validé la signature immunologique observée par LegendPlex chez nos patients dans un modèle murin de stéatose hépatique. Nous avons démontré pour la

première fois que l'inflammation de type I et de type II jouent des rôles opposés dans le tissu adipeux et le foie. L'inflammation de type I contribue à la progression du syndrome métabolique en périphérie, mais limite la progression de la fibrose hépatique dans le foie en modulant négativement la réponse au TGF- β et aux cytokines de type II ^{2, 5, 347}. De l'autre côté, l'inflammation de type II contribue à l'homéostasie du tissu adipeux, mais lorsque dérégulée dans le foie elle contribue à la progression de la fibrose hépatique en permettant l'activation des HSCs par des mécanismes indépendants du TGF- β ^{2, 161, 341} (Figure 18). Ces résultats ont une implication majeure dans notre compréhension de la pathogenèse de NASH et le développement de cible thérapeutique.

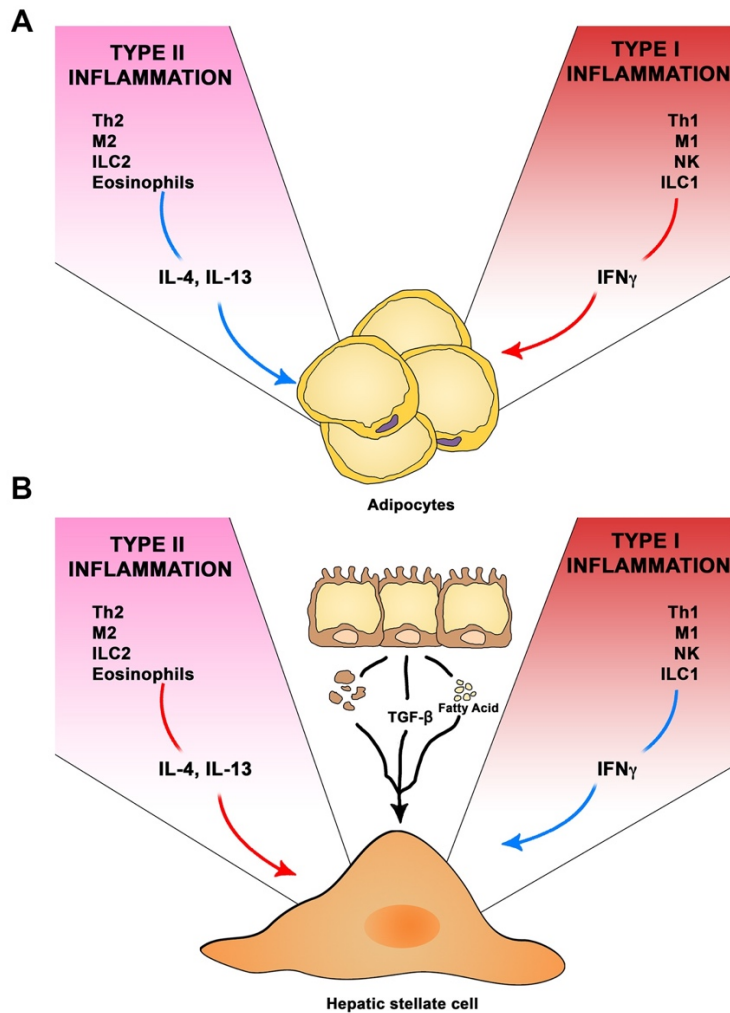


Figure 18. Rôle opposé de l'inflammation de type I et type II dans les tissus adipeux et le foie

(A) La réponse de type I (IFN- γ) contribue au syndrome métabolique en aggravant la réponse inflammatoire dans les tissus adipeux contrairement à la réponse de type II qui contribue à l'homéostasie de ce tissu. **(B)** Dans le foie, l'inflammation de type I joue une fonction anti-fibrotique en limitant la réponse au TGF- β ainsi que l'inflammation de type II. Cependant, lors de NASH l'inflammation de type II est dominante dans l'organe hépatique et induit la fibrose indépendamment du TGF- β via les cytokines IL-4 et IL-13. Les réponses protectrices sont en bleu et les réponses pathogéniques en rouge.

5. L'inflammation de type III est une signature commune de la progression de la fibrose chez l'homme et se caractérise par une dérégulation du ratio intrahépatique Th17/Treg

L'inflammation de type III est caractérisée par la sécrétion d'IL-17A et d'IL-22, et elle est orchestrée par les Th17⁶⁶. Notre expérience de LegendPLex a démontré une augmentation significative de ces deux cytokines dans les foies avec une fibrose avancée (Manuscrit 1, Figure 2A-B). Afin de mieux caractériser cette réponse, nous avons évalué *ex vivo* la fréquence des Th17 dans le sang périphérique et le foie de nos patients par cytométrie de flux. Puisque nous avons travaillé avec un nombre d'IHLs limitant, nous avons dû utiliser une approche phénotypique basée sur l'expression des marqueurs de surface (CD161, CCR6, CD26) pour identifier les Th17. Nous avons observé une augmentation de la fréquence intrahépatique des Th17 (Manuscrit 1, Figure 1C-D) chez les patients avec une fibrose avancée (moyenne 16.9%) comparativement aux patients avec une fibrose modérée (moyenne 9,65%). Aucune variation significative n'est mesurable en périphérie suggérant que l'état inflammatoire est localisé dans le compartiment hépatique. Ce résultat concorde avec les observations de Foster et al. qui ne démontrent aucun changement dans la fréquence des Th17 en périphérie et les niveaux plasmatiques d'IL-17 lors de la progression de la fibrose chez les individus infectés par le VHC²⁸⁶. Nous avons aussi essayé de discriminer les Th17 des Th22 *via* l'expression de CCR10, cependant nous n'avons pas détecté de cellules CCR10⁺ dans le foie de nos patients (non publié).

Nous avons par la suite mis au point un marquage d'immunofluorescence permettant de visualiser les marqueurs CD4, IL-17A et FOXP3 sur des coupes entières (~ 2 cm) de biopsies hépatiques fixés en paraffine. Ce triple marquage permet d'identifier les cellules produisant l'IL-17A, les Th17 (IL-17⁺CD4⁺) et les Tregs (FOXP3⁺CD4⁺). De plus, nous avons optimisé une analyse automatisée par le logiciel Vis (Visiopharm) permettant de compter et de visualiser les cellules d'intérêts sur l'ensemble de la biopsie, dans le parenchyme et le stroma fibrotique hépatique en utilisant un marquage au rouge de picro sirius et l'outil « tissue align » (Visiopharm) (Manuscrit 1, Figure supplémentaire S1-S2). L'avantage de cette approche est une quantification non biaisée sur une grande surface couplée à une partition complexe du tissu permettant une interprétation biologique des résultats. Nous avons observé un nombre accru de

cellules IL-17⁺ et Th17 dans les foies avec une fibrose avancée indépendamment de l'étiologie sous-jacente (Manuscrit 1, Figure 1E-F). Nous avons aussi établi des corrélations positives entre le nombre *in situ* de Th17 avec la quantité d'IL-17 mesuré par notre analyse de LegendPlex et avec la fréquence de Th17 mesuré *ex vivo* en cytométrie de flux (Manuscrit 1, Figure 2D et Figure supplémentaire 1H). Ces observations montrent premièrement que ces techniques sont complémentaires et deuxièmement que l'expansion des IHLs *in vitro* n'altère pas drastiquement leur phénotype. De plus, ceci confirme des observations en immunohistochimie lors de l'infection par le VHB, les hépatites alcooliques et auto-immunes^{295, 297, 351}. Cependant, notre analyse démontre que les Th17 représentent une minorité des cellules capables de produire l'IL-17 *in situ*, l'origine de ces cellules reste à déterminer (voir section limitations et perspectives). De plus, nous avons observé après la partition du tissu en parenchyme sain et en stroma fibrotique que les cellules IL-17⁺ et les Th17 s'accumulent dans la cicatrice chez les patients avec une fibrose avancée (Manuscrit 1, Figure 2J-K). Ces résultats suggèrent que ces cellules sont directement impliquées dans la progression de la fibrose hépatique. En effet, elles se situent à proximité des HSCs actives produisant le dépôt de collagène pathogénique renforçant le concept que l'IL-17 contribue à l'activation des HSCs. Malheureusement, nous n'avons pu étudier *in situ* la localisation et la production d'IL-22, car nous n'avons pas trouvé d'anticorps capable de marquer cette cytokine chez l'homme. De ce fait, nous n'avons pas évalué la capacité de ces cellules à co-produire l'IL-17 et l'IL-22 simultanément comme suggéré par Foster et al. en cytométrie de flux²⁸⁶.

L'altération du ratio Th17/Treg est l'un des facteurs importants lors de la pathogenèse associée à l'inflammation de type III dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques chez l'homme^{330, 331}. Nous avons donc évalué *in situ* les changements dans le nombre de Treg ainsi que l'altération du ratio Th17/Treg lors de la progression de la fibrose. Nous avons observé une augmentation significative du nombre de Treg dans les foies avec une fibrose avancée (Manuscrit 2, Figure 2G). Cette observation soulève la question de l'implication des Tregs dans la progression de la fibrose hépatique (discuté dans la section 5). Néanmoins, nous avons observé une augmentation du ratio Th17/Treg dans le stroma hépatique en comparaison avec le parenchyme hépatique lors de la fibrose avancée (Manuscrit 1, Figure 2I) validant ainsi que la progression de la fibrose hépatique est associée à une dérégulation de la réponse de type III.

Finalement, afin de confirmer nos résultats nous avons consulté des données publiques de bio-puces provenant de deux études sur la fibrose dans NASH et l'infection par le VHC. Nous avons étudié les voies de signalisation les plus significativement augmentées avec la progression de la fibrose hépatique. Nous avons observé que la voie de l'IL-17A fait partie des 15 voies les plus significativement augmentées dans NASH et des 20 voies les plus significativement augmentées dans HCV (Manuscrit 1, Figure supplémentaire 3). Tandis que l'IL-22 fait partie du top 5 dans ces deux études démontrant son importance dans la progression de la fibrose hépatique. Ces observations confirment nos résultats précédents et elles sont en concordance avec des données lors de l'infection par le VHB³¹⁵.

En conclusion, nos résultats et les données de la littérature démontrent que l'inflammation de type III est une signature commune de la progression de la fibrose hépatique. En effet, l'altération de la balance Th17/Treg ainsi que la production accrue d'IL-17 et d'IL-22 sont des observations communes dans nos deux groupes de patients, ainsi que dans des études sur les hépatites alcooliques, auto-immunes et d'infection par le VHB^{223, 286, 297, 315, 352}. Au-delà du foie, des observations similaires dans le poumon, la peau et le rein ont été reportées laissant supposer un rôle majeur de l'inflammation de type III dans la progression de la fibrose à travers le corps humain^{287, 309, 353, 354, 355, 356}.

6. Rôle des lymphocytes T régulateurs et de la plasticité

Th17/Treg dans la progression de la fibrose hépatique

La fonction des Tregs dans la progression de la fibrose hépatique est controversée. La capacité des Tregs à produire l'IL-10, une cytokine anti-fibrotique, en plus de leur capacité à moduler l'activation des autres lymphocytes fait pencher la balance en faveur d'une fonction anti-fibrotique^{300, 343, 357}. Cependant des études récentes démontrent des fonctions profibrotiques lors des insultes hépatiques chroniques^{332, 333, 358}. Chez l'homme et la souris, nous avons observé une corrélation positive avec les dommages hépatiques mesurés par l'élévation des ALT dans le sérum (Manuscrit 1, Figure supplémentaire S1D et Figure supplémentaire S8C). De plus, nous avons observé un nombre accru de Treg dans les foies avec une fibrose avancée chez l'homme, mais aussi chez les souris après traitement au CCl₄ (Manuscrit 1, Figure 1A et G, et Figure supplémentaire S8B). Nos observations sont en accord

avec des études chez des patients infectés par le VHC et des modèles murins d'hépatites chroniques^{318, 332, 333, 358}. Il est possible que l'inflammation hépatique induise le recrutement des Tregs via la sécrétion de CCL17 et CCL22³⁵⁹ pour contrôler l'inflammation, puis que leur fonction soit altérée entraînant ainsi la protection des HSCs contre l'apoptose induite par les cellules NK³³². D'un autre côté, les cellules stellaires actives peuvent aussi induire la différenciation des T naïfs en Tregs^{20, 21, 79}. De plus, les Tregs et les Th17 partagent un programme de plasticité, car ils dépendent de la signalisation par le TGF- β ^{325, 360}. Il est donc possible que les cellules T naïves soient recrutées au site de la blessure, puis différenciées avec l'aide des HSCs en Tregs qui sont ensuite convertis en Th17 par l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α présents dans le milieu hépatique (Figure 19).

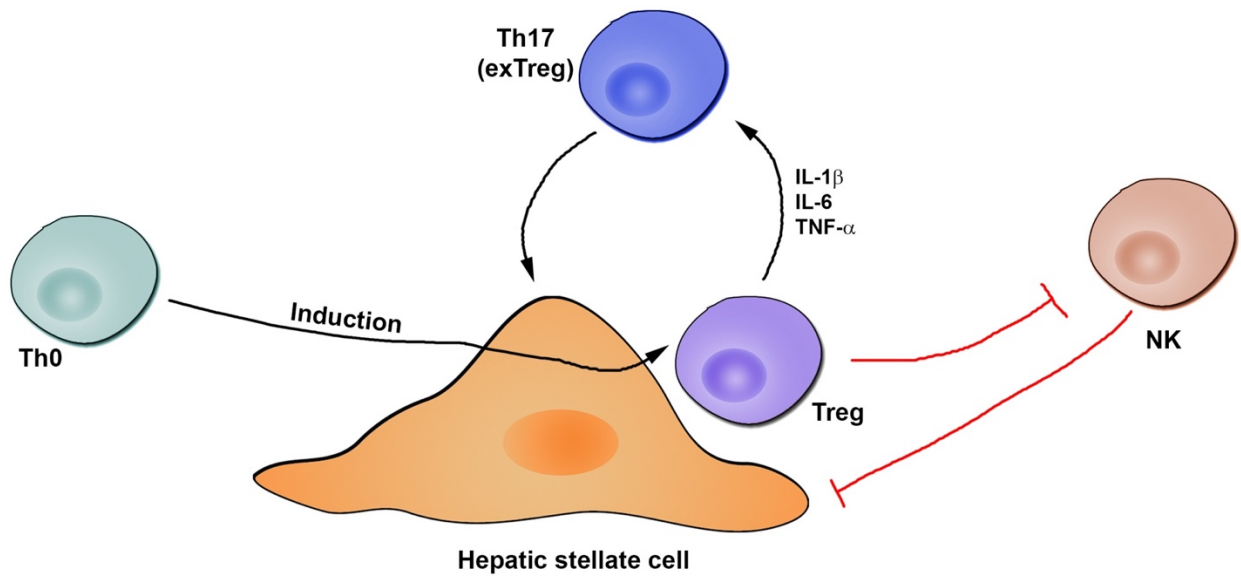


Figure 19. Modèle d'interactions entre les cellules stellaires hépatiques, les Tregs et les Th17 dans la progression de la fibrose hépatique

Les lymphocytes T naïfs sont recrutés au cours de l'insulte hépatique et se différencient en Tregs à l'aide des HSCs et du TGF- β ²¹. Les Tregs protègent ensuite les HSCs actives de l'action des cellules NK^{332,333}. Ces Tregs peuvent ensuite être convertis en Th17^{325,360} à l'aide des cytokines pro-inflammatoires d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α présentes dans le milieu hépatique.

7. Rôle de l'IL-17A dans la progression de la fibrose hépatique

L'IL-17A est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires chroniques humaines^{8, 73}. Cependant, nous n'avons pas observé de corrélation positive entre la fréquence ou le nombre de Th17 intrahépatiques avec l'inflammation hépatique mesurée par l'élévation des ALT dans le sérum. Néanmoins, de nombreuses études ainsi que la nôtre ont démontré par différentes techniques une forte augmentation des niveaux d'IL-17A dans les foies avec une fibrose avancée^{286, 297, 351, 361}. Nous avons donc décidé de caractériser la fonction de l'IL-17A sur les HSCs³³⁷ (Manuscrit 2) à l'aide d'un modèle *in vitro* de fibrose hépatique optimisé lors de ma maîtrise.

Ce modèle est basé sur la stimulation de la lignée humaine d'HSCs LX-2 et d'HSCs humaines primaires par des cytokines d'intérêt en utilisant le TGF- β , la cytokine profibrotique majeure, comme contrôle positif. Puis par la quantification de l'expression des gènes profibrotiques tels que ACTA2, COL1A1, TIMP-I et TGFb1 qui est validée ensuite au niveau protéique. La lignée LX-2 a l'avantage d'être facile à garder en culture permettant de tester de nombreuses conditions expérimentales. Cependant, elles ont un phénotype actif à l'état basal rendant leur réponse aux signaux profibrotiques, bien que quantifiable, plus faible d'environ 40% que celles des cellules primaires²⁰⁴. C'est pourquoi nous avons validé chacune de nos observations sur des HSCs primaires.

7.a L'interleukine 17 n'induit pas l'activation directe des cellules stellaires hépatiques

Nous avons démontré que l'IL-17A n'est pas capable d'induire directement l'activation des HSCs humaines puisque nous n'avons observé aucun changement dans l'expression des gènes profibrotiques ACTA2, COL1A1, TIMP-I et TGFb1 par qPCR (Manuscrit 2, Figure 1A), ainsi qu'au niveau protéique par Western Blot et coloration au rouge de Picro Sirius (Manuscrit 2, Figure 1 B-E). Ce résultat est en désaccord avec deux études ayant montré que l'IL-17A peut induire l'expression d' α -SMA après 8 h de stimulation. Néanmoins, ces deux études ont attribué cet effet à deux voies de signalisation différentes (MAPK et STAT3)^{293, 362}. Ces différences sont possiblement attribuables à des plans expérimentaux différents. Cependant, dans nos mains une stimulation de 8 h ne permet pas d'activer les HSCs. Nous avons décidé de stimuler nos

cellules pour 48 h, suite à une étude ayant démontré que la signalisation par l'IL-17A est induite de manière optimale après 24 h de stimulation ³⁵¹. De plus, nos résultats sont en ligne avec les observations de Lemmers et al. sur des HSCs primaires humaines qui ont reporté que l'IL-17A n'a pas d'effet sur l'expression des gènes ACTA2 et COL1A1 ²⁹⁷. Finalement, l'IL-17A n'induit pas l'expression de collagène de type I dans les fibroblastes de la peau ³⁶³.

7.b. L'interleukine 17 contrôle la production des cytokines profibrotiques dans le foie

L'IL-17A ne contrôle pas directement l'activation des HSCs, cependant elle contribue indirectement à la progression de la fibrose hépatique en modulant le recrutement de cellules pro-inflammatoire et la sécrétion de cytokines profibrotiques. *In vivo* deux études ont reporté que les HSCs murines ne s'activent pas directement en réponse à l'IL-17A, mais que l'IL-17A active les monocytes, les macrophages et les neutrophiles qui produisent du TGF- β et du PDGF menant à l'activation des HSCs ^{293, 364}. *In vivo* l'ablation de l'IL-17RA sur les macrophages ou bien leur déplétion par injection de chlorodronate entraîne une diminution significative de la fibrose hépatique ^{293, 364}. De plus, une autre étude dans un modèle de diète riche en gras a démontré que l'IL-17A contribue à la progression de la fibrose en augmentant le stress oxydatif menant indirectement à l'activation des HSCs ²⁹⁸. L'IL-17A induit aussi la sécrétion de TGF- β par les fibroblastes dans le poumon et sur les HSCs murines ^{293, 365}, et nous avons aussi observé le même effet sur les HSCs humaines (Manuscrit 2, Figure supplémentaire 1).

7.c. L'interleukine 17 sensibilise les cellules stellaires à l'action du TGF- β via l'expression du TGF- β -RII dépendamment de la voie JNK

Nous avons ensuite démontré que l'IL-17A augmente la réponse des HSCs à des doses sous-optimales de TGF- β . En effet, après stimulation avec l'IL-17A et le TGF- β nous avons quantifié une robuste expression des gènes profibrotiques ACTA2, COL1A1, TIMP-I ainsi qu'une production accrue d' α -SMA, TIMP-I par Western blot (manuscrit 1, Figure 1 A-C). Cet effet synergétique est dépendant de la transduction du signal par le TGF- β , puisque l'inhibition chimique des kinases nécessaires à la phosphorylation de SMAD2/3 par le TGF- β -R entraîne l'abolition du phénotype (Manuscrit 2, Figure 2). Nous avons ensuite démontré que les HSCs

quiescentes expriment fortement l'IL-17RA et que son expression n'est pas altérée par l'activation des HSCs. Ces résultats sont en accord avec les observations chez l'homme et chez la souris ^{293, 297}. Cependant, nous avons démontré que l'IL-17A augmente et stabilise l'expression du TGF- β -RII à la surface des HSCs. L'IL-17A prévient aussi la diminution de l'expression du TGF- β -RII en réponse au TGF- β . L'expression accrue du TGF- β -RII à la surface des HSCs se traduit par une forte transduction du signal à travers la phosphorylation de SMAD2/3 en réponse à des doses sous-optimales de TGF- β (Manuscrit 2, Figure 3). L'expression du TGF- β -RII est dépendante du facteur de transcription AP-1 qui est activé par la voie JNK ¹, qui peut être induite non canoniquement par l'IL-17A ²⁸⁹. Nous avons par la suite démontré que l'IL-17A induit la phosphorylation de JNK dans les HSCs (Manuscrit 2, Figure 4A). De plus, l'inhibition chimique de JNK abolit la surexpression du TGF- β -RII induite par l'IL-17A et donc la réponse à des doses sous-optimales de TGF- β (Manuscrit 2, Figure 4B-F). JNK est une des voies profibrotiques les plus importantes et elle est activée par de nombreux stimuli lors des insultes hépatiques. Les souris déficientes pour JNK ont une fibrose réduite et leurs HSCs sont moins sensibles aux signaux profibrotiques. JNK est une voie importante dans la régulation de la signalisation au TGF- β permettant une meilleure transduction du signal en facilitant la translocation de SMAD2/3 dans le noyau. Un phénotype que nous avons aussi observé dans les HSCs traitées avec la combinaison IL-17A et TGF- β .

En conclusion, nous avons démontré que l'IL-17A ne contribue pas directement à l'activation des HSCs. L'IL-17A augmente la réponse fibrogénique indirectement en induisant la sécrétion de chimiokines importante pour le recrutement des monocytes, des macrophages et des neutrophiles pro-inflammatoires. L'IL-17A active ensuite ces cellules qui produisent des cytokines profibrotiques comme le TGF- β et le PDGF. L'IL-17A sensibilise ensuite les HSCs à l'action du TGF- β par l'activation de la voie JNK induisant la stabilisation et la surexpression du TGF- β -RII (Figure 20). De plus, il a été démontré que l'IL-17A induit l'expression du PDGF-R sur les fibroblastes de l'intestin³⁶⁶ ce qui laisse supposer que l'IL-17A favorise la réponse des fibroblastes aux facteurs de croissance.

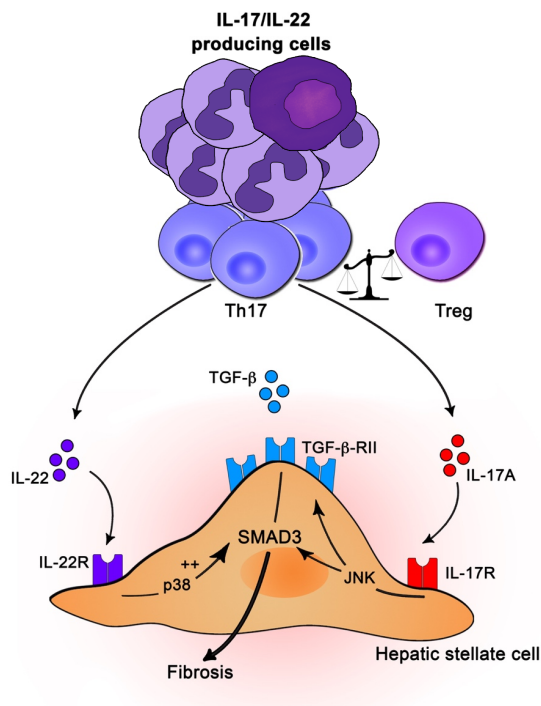


Figure 20. Les cytokines de type III, IL-17A et IL-22, augmentent la réponse au TGF- β par des mécanismes dépendant des MAPKs

La progression de la fibrose hépatique est associée à une dérégulation de la réponse de type III observable par une dérégulation du ratio Th17/Treg, et l'infiltration de cellules produisant l'IL-17A et l'IL-22. L'IL-17A stabilise l'expression du TGF- β -RII par l'activation de JNK tandis que l'IL-22 favorise la phosphorylation de SMAD2/3 par l'activation de p38. Ces deux cytokines augmentent la réponse des HSCs à la cytokine profibrotique majeure : le TGF- β .

8. Rôle de l'IL-22 dans la progression de la fibrose hépatique

L'IL-22 est la cytokine la plus fortement associée à la progression de la fibrose dans nos biopsies hépatiques. De plus, nous avons observé une augmentation significative de la voie de l'IL-22 dans les foies fibrotiques en consultant des données publiques de bio-puces dans NASH et l'infection par le VHC. Des observations similaires ont été reportées lors de l'infection par le VHB³¹⁵. Nous avons donc décidé de caractériser la fonction de cette énigmatique cytokine.

8.a. L'IL-22 sensibilise les cellules stellaires hépatiques à l'action du TGF- β via la voie p38/MAPK

Nous avons démontré que similairement à l'IL-17A, l'IL-22 n'est pas capable d'induire l'activation des HSCs puisque nous n'avons pas observé de changement dans l'expression des gènes profibrotiques ACTA2, COL1A1, TIMP-I et TGF β 1 par qPCR (Manuscrit 1, Figure 3A), ainsi qu'au niveau protéique par Western Blot et par immunofluorescence (Manuscrit 2, Figure 3 B-D). De plus, nous avons démontré que comme l'IL-17A, l'IL-22 augmente la réponse des HSCs à des doses sous-optimales de TGF- β . Cependant, le mécanisme d'action est différent puisque l'IL-22 ne permet pas d'augmenter l'expression du TGF- β -RII (Manuscrit 1, Figure 3E). Malgré cela, l'IL-22 favorise la transduction du signal au TGF- β qui s'observe par une augmentation de la phosphorylation de SMAD2/3 (Manuscrit 1, Figure 3F). Afin de déterminer le mécanisme par lequel l'IL-22 augmente la réponse des HSCs, nous avons réalisé des expériences de RNAseq qui ont révélé une signature génique correspondant à l'activation de facteurs de transcription dépendant de la voie p38/MAPK comme MEF-2 (Manuscrit 2, Figure 4A). MEF-2 est un facteur de transcription important dans l'activation des HSCs et qui contrôle la signalisation du TGF- β ³⁶⁷. De plus, les molécules bloquant l'induction de MEF2 limitent fortement la fibrose hépatique en réduisant significativement la sensibilité des HSCs^{110, 368}. Nous avons ensuite démontré que l'IL-22 active la voie p38/MAPK et que l'inhibition chimique de p38 abolit l'effet de l'IL-22 sur les HSCs (Manuscrit 1, Figure 4C-E). Cette activation de la voie p38 est non canonique puisque l'IL-22 signale principalement par STAT3. Cependant, d'autres études ont démontré des effets pathogéniques de l'IL-22 dans la carcinogenèse par activation non canonique de la voie p38³⁶⁹. Ensemble ces résultats démontrent que l'IL-22

sensibilise les HSCs à l'action du TGF- β par un mécanisme différent de l'IL-17A dépendant de la voie p38/MAPK (Figure 20).

8.b. L'IL-22 contribue à la progression de la fibrose in vivo

Nous avons ensuite étudié le rôle de l'IL-22 dans la progression de la fibrose hépatique dans des modèles d'insulte hépatique chronique par l'administration de toxines dans des souris sauvages et IL-22RA1 déficientes issues de la même portée. Pour cette étude, nous avons décidé d'utiliser des mâles et des femelles en accord avec les nouvelles directives du « National Institute of Health » (NIH) dans le cadre de la recherche translationnelle. Nous avons utilisé les deux modèles d'hépatites les mieux caractérisés à ce jour, le CCl⁴ et le TAA, deux toxines qui induisent la fibrose avec inflammation hépatique forte et modérée, respectivement. Dans ces deux modèles, nous avons démontré que l'absence de signalisation par l'IL-22 entraîne une réduction significative de la fibrose associée à une diminution de l'activation des HSCs mesurée par l'expression d' α -SMA (Manuscrit 1, Figure 5). De plus, les souris déficientes pour l'IL-22RA1 ont une déposition de collagène épars (chickenwire) comparativement aux souris WT qui forme un réseau de pont fibreux important similaire à un stade de fibrose avancé chez l'homme (Manuscrit 1, Figure 5D). Ce phénotype laisse supposer que la fibrose qui se développe chez une souris déficiente pour l'IL-22RA1 est plus facilement réversible, bien que des expériences de régression doivent être effectuées pour le confirmer. La différence dans la déposition de collagène n'est pas explicable par des différences dans les niveaux d'inflammation hépatique puisque les souris WT et IL-22RA1 déficientes ont une élévation des ALT plasmique et une infiltration immunitaire similaire dans le foie. De plus, nous avons observé les mêmes signes de splénomégalie et d'augmentation du ratio masse hépatique sur masse de l'animal qui indique une sévérité similaire de l'insulte hépatique. Ces différences en termes de fibrose ne sont pas attribuables à une diminution de la densité des cellules IL-22⁺ dans le foie ni à leur localisation tissulaire (Manuscrit 1, Figure 5B-C). Les cellules IL-22⁺ s'accumulent au niveau de la cicatrice hépatique et sont situées en proximité des HSCs probablement pour délivrer de manière optimale l'IL-22 aux HSCs. De plus, ces cellules sont en faible nombre au niveau du parenchyme hépatique laissant supposer que lors des insultes chroniques les hépatocytes reçoivent moins de signaux de survie de la part de l'IL-22. Nos analyses phénotypiques sur les cellules immunitaires intrahépatiques démontrent que l'IL-22 est principalement produite par

des cellules CD3^{neg} exprimant fortement ROR γ t et par les T-CD4 (Manuscrit 1, Figure supplémentaire 9). Finalement, nos observations corréleront fortement avec nos résultats sur les HSCs humaines primaires et nos observations sur les biopsies.

Nos résultats sont en opposition avec les observations de Kong et al. qui ont démontré une fonction anti-fibrotique de l'IL-22 dans un modèle de souris transgénique surexprimant l'IL-22³¹⁴. Dans ce modèle, la surexpression de l'IL-22 entraîne une réduction de la fibrose hépatique qui laisse supposer que les niveaux d'IL-22 déterminent si son effet est pathogénique ou non. Cependant, plusieurs questions peuvent être soulevées sur le mécanisme d'action proposé par les auteurs. Premièrement, les souris sont issues d'une lignée B6NJ qui sont connues pour avoir un phénotype hépatique divergeant comparativement au souris B6N ou B6J. Deuxièmement, les auteurs décrivent que l'IL-22 induit la sénescence des HSCs par l'activation de la voie STAT3. Or STAT3 est une voie de signalisation liée à la survie et à la prolifération cellulaire dans tous les types cellulaires. Les expériences *in vitro* menées par les auteurs démontrent que l'IL-22 induit p21, une protéine importante pour le cycle cellulaire et la sénescence, après seulement 24 heures de stimulation. La protéine p21 permet l'arrêt du cycle cellulaire et elle est naturellement surexprimée en culture dès que les cellules atteignent la confluence. Dans leur expérience les auteurs n'ont pas démontré l'un des facteurs les plus importants de la sénescence cellulaire : l'arrêt de la prolifération et de la réplication. Finalement, la sénescence réplivative ne peut pas être observée en seulement 24 heures et nos données de RNAseq sur les HSCs humaines ne permettent pas d'observer une signature génique sénescence. L'administration d'IL-22 lors d'un modèle d'insulte par BDL entraîne une réduction légère de la fibrose hépatique lors de la phase aiguë de l'insulte²⁹³. Ces observations laissent supposer que l'IL-22 a un double rôle dans la progression de la fibrose en fonction de la durée de l'insulte tissulaire. Enfin, une autre étude réalisée sur des souris IL-22 déficientes a aussi démontré un rôle profibrotique lors de la phase chronique par le recrutement des Th17 à travers la sécrétion de CXCL10 par les HSCs³¹⁵. L'IL-22 contribue aussi à la progression de la fibrose dans le poumon et le pancréas lors des insultes chroniques^{370, 371}.

Finalement, une limitation des souris IL-22RA1 déficientes est que cette chaîne du récepteur est utilisée alternativement par l'IL-20 et l'IL-24, deux cytokines pouvant activer les myofibroblastes³⁷². Ces deux cytokines ont une expression principalement limitée à la peau, une étude a cependant reporté que l'IL-20 contribue à la progression de la fibrose hépatique³⁷³.

Cependant, nous n'avons pas détecté de changement significatif de l'expression de l'IL-20 entre nos souris contrôles et traitées. De plus, nous n'avons pas pu détecter l'IL-24 dans le foie de nos souris. Chiu et al. ont aussi démontré que l'administration d'anticorps neutralisant contre l'IL-20R1 (le récepteur classique de l'IL-20) suffit à abolir le phénotype démontrant que l'IL-20 n'utilise pas ou faiblement l'IL-22RA1 dans le foie³⁷³. Ensemble ces observations suggèrent que l'effet que nous avons observé dans nos souris IL-22RA1 est spécifique de la signalisation de l'IL-22.

En conclusion, les souris IL-22RA1 déficientes développent une inflammation hépatique similaire aux souris sauvages. Lors de l'insulte hépatique, les cellules IL-22⁺ (principalement CD3^{neg}) envahissent la cicatrice et délivrent l'IL-22 aux HSCs. L'absence de signalisation par l'IL-22 entraîne une réduction significative de la fibrose hépatique. L'IL-22 contribue aussi à la progression de la fibrose dans d'autres organes validant ainsi une fonction pathogénique de cette cytokine lors des insultes tissulaires chroniques.

8.c. Rôle opposé de l'IL-22 dans les insultes tissulaires aiguës et chroniques

Une fonction des fonctions principales de l'IL-22 lors des insultes tissulaires est de protéger l'intégrité de l'épithélium. L'IL-22 induit la survie des cellules épithéliales par l'activation de STAT3 permettant la prolifération et donc la régénération de l'épithélium³⁰⁶. De plus, l'IL-22 induit l'expression de défensines et peptides antimicrobiens qui contribuent à maintenir l'intégrité tissulaire. Dans le foie, l'IL-22 a des propriétés hépatoprotectives permettant de limiter les dommages cellulaires et tissulaires comme la nécrose. L'ablation de l'IL-22 dans les insultes aiguës induit une apoptose importante des hépatocytes observable par l'élévation des ALT dans le sérum⁷⁴. Les mêmes propriétés lors des insultes aiguës du pancréas et de l'intestin ont été reportées^{310, 370, 374}. Cependant, la dérégulation ou l'exposition prolongée à l'IL-22 entraîne une réponse pathogénique dans de le pancréas, le poumon, la peau, l'intestin ainsi que dans le foie comme nous l'avons démontré^{309, 311, 375, 376}.

Malgré ces propriétés anti-inflammatoires et hépatoprotectives, nous n'avons pas observé des signes d'inflammation aggravés dans nos souris IL-22RA1 déficientes lors des insultes chroniques hépatiques (Manuscrit 1, Figures supplémentaires 5C-D et 6B)

contrairement aux insultes aiguës ⁷⁴. Il est donc possible que lors des insultes chroniques des mécanismes compensatoires émergent pour contrôler les dommages tissulaires, comme l'IL-10 ou la production de facteurs de croissance pour l'épithélium comme le « hepatocyte growth factor » (HGF). De plus, la localisation de l'IL-22 dans la cicatrice hépatique laisse supposer que les HSCs sont la cible principale menant ainsi à une fibrose accrue. La matrice cellulaire pathogénique envoie des signaux de survies ³⁷⁷ aux hépatocytes, *via* les intégrines qui à long terme favorisent la carcinogenèse ³. Enfin, l'exposition continue des hépatocytes à l'IL-22 entraînant à la suractivation de la voie STAT3 liée à la carcinogenèse ³⁷⁸. Le même mécanisme a été décrit dans l'intestin ³¹¹.

En conclusion, l'IL-22 est une cytokine dont la fonction diffère au cours des insultes tissulaires. De ce fait, elle doit être régulée par différents mécanismes au cours du temps pour limiter la progression de la pathogenèse. Lors des insultes aiguës, l'IL-22 joue un rôle bénéfique permettant de préserver l'épithélium et d'induire la régénération tissulaire. Il est possible qu'elle favorise l'activation des myofibroblastes pour favoriser un dépôt de matrice extracellulaire favorisant aussi la survie des cellules épithéliales ³⁷⁷. Lors des insultes chroniques, l'IL-22 favorise l'activation des myofibroblastes favorisant la fibrose. La fibrose ainsi que l'activation de la voie STAT3 dans les hépatocytes entraîne au long terme le développement du HCC (Figure 21).

8.d. Régulation de la signalisation de l'IL-22 par l'IL-22BP

L'IL-22 est une cytokine qui nécessite d'être correctement régulée pour exercer un effet bénéfique, puisque la dérégulation de cette voie est liée à la progression de la fibrose et du carcinome. L'activité de l'IL-22 est directement modulée par l'expression d'un récepteur soluble inhibiteur qui agit comme un leurre : l'IL-22BP. Dans l'intestin, il a été démontré que l'expression de l'IL-22BP varie au cours des insultes tissulaires. Lors de la phase aiguë, l'expression de l'IL-22BP diminue suite à l'activation de l'inflammasome et de la sécrétion d'IL-18, tandis que l'IL-22 est produite ³¹¹. Lors de la résolution de la blessure, l'IL-22BP est de nouveau exprimée pour maintenir un retour à l'homéostasie. Ce mécanisme de régulation est vital pour l'hôte puisque l'ablation de l'IL-22BP entraîne une réponse de régénération tissulaire anormale et la carcinogenèse ³¹¹.

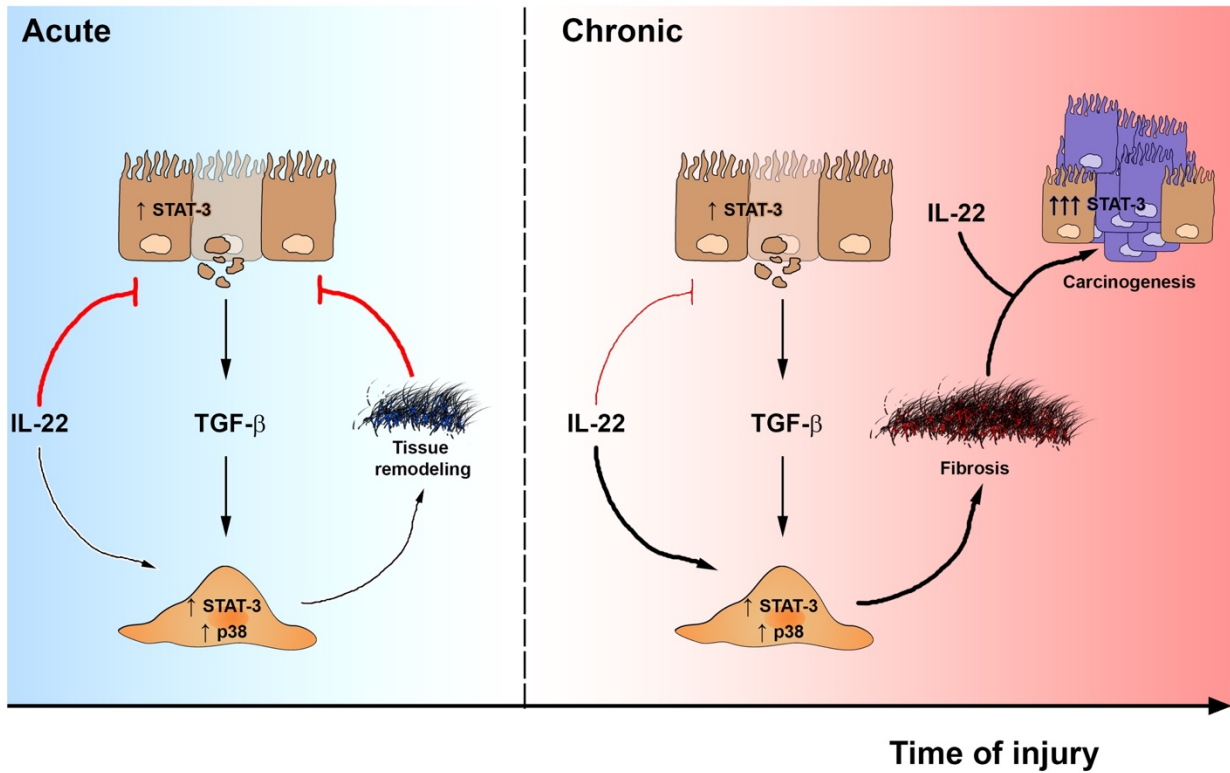


Figure 21. Modèle d'action de l'IL-22 dans les insultes tissulaires aiguës et chroniques

Lors des insultes aiguës, l'IL-22 contribue à la survie des hépatocytes via l'activation de STAT3 réduisant indirectement la production de TGF- β entraînant une régénération tissulaire normale. Lors des insultes chroniques, l'IL-22 favorise la production de la fibrose en augmentant la réponse des HSCs au TGF- β . La persistance de cette réponse fibrotique, ainsi que l'exposition continue des hépatocytes à l'IL-22 induit le développement du carcinome.

Ce mécanisme de régulation est similaire à l'IL-13, une autre cytokine anti-inflammatoire avec des propriétés profibrotiques régulées aussi par un récepteur leurre : l'IL-13RA2^{267, 268}. Nous avons donc essayé de détecter son expression dans l'ARN total hépatique par qPCR, malheureusement nous n'avons pas pu détecter son expression. L'IL-22BP est produit majoritairement par les cellules dendritiques, les T-CD4 et les éosinophiles^{311, 313}, il est donc possible que le signal soit trop dilué dans des extractions d'ARN de foies totaux. Une des limitations majeures de notre étude sur le rôle de l'IL-22 dans la progression de la fibrose hépatique est de ne pas avoir évalué la fonction de l'IL-22BP (discuté dans la section limitations et perspectives).

9. Modulation de l'inflammation de type III comme traitement de la fibrose hépatique

La modulation de l'inflammation induite par le système immunitaire est une cible thérapeutique démontrant une certaine efficacité dans l'arthrite rhumatoïde (RA), la colite et le psoriasis, notamment par l'administration molécules ou d'anticorps neutralisant contre le TNF- α (RA et colite) et l'IL-17A (psoriasis)^{379, 380}. *In vivo*, l'inhibition de l'inflammation de type II a prouvé son efficacité dans de nombreux modèles de fibrose induite par insulte tissulaire chronique. Les anti-IL-13 sont par ailleurs en essai clinique pour le traitement la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF)^{52, 257}.

Nous avons donc étudié si la modulation de l'inflammation de type III par l'administration d'antagoniste d'AHR et de ROR γ t peut réduire la fibrose hépatique. Nous avons décidé de ne pas utiliser nos antagonistes de manière prophylactique puisque d'un point de vue clinique un traitement contre la fibrose sera donné pour limiter sa progression, et non son développement. Le choix de cibler les facteurs de transcription importants pour le développement des cellules de type III et la production de l'IL-17 et l'IL-22 représente pour nous un avantage thérapeutique. En effet, en plus de bloquer la production des cytokines pathogéniques, ils inhibent aussi la différenciation ainsi que les autres fonctions inflammatoires de ces cellules. La fibrose hépatique est quantifiable et notable histologiquement après 2 semaines de traitement par le CCl₄. Nous avons donc traité des souris sauvages pendant quatre semaines avec du CCl₄, à partir la deuxième semaine les souris ont reçu des injections

quotidiennes d'antagoniste (10 mg/kg) ou de véhicule comme contrôle (Manuscrit 1, Figure 6A). Nous avons démontré que les deux antagonistes entraînent une réduction de la fibrose observable par une réduction de l'activation des HSCs et un dépôt de collagène moins important (Manuscrit 1 Figure 6D-G). De plus, nous avons démontré que le traitement induit une réduction significative de la densité intrahépatique des cellules IL-22⁺, validant ainsi que l'inflammation de type III est diminuée.

Lors du traitement, les antagonistes ont été bien supportés par les souris. Néanmoins des études pharmacologiques supplémentaires sont requises pour tester la toxicité et pour valider l'efficacité dans d'autres modèles avec un nombre plus important de souris. Cependant, l'antagoniste de ROR γ t a déjà été caractérisé dans la colite et il a démontré une bonne efficacité et une bonne tolérance³⁸¹. Ces résultats démontrent qu'il est possible de moduler la réponse de type III pour le traitement des maladies inflammatoires chroniques.

Une limitation de notre étude est de ne pas avoir mesuré comment la modulation de l'inflammation de type III change l'inflammation de type I et de type II. En effet, l'inhibition de l'inflammation de type I favorise le développement d'une réponse de type II aberrante qui contribue à la progression de la fibrose hépatique. Inversement, l'inhibition de la réponse de type II peut induire une réponse de type I aberrante menant à la nécrose tissulaire et à la production de TGF- β ^{2,4}. Par ailleurs, l'inhibition de l'inflammation de type I et de type II abolit la progression de la fibrose hépatique démontrant que la régénération tissulaire nécessite de ramener l'équilibre dans la balance inflammatoire²³¹. Il sera ainsi important de déterminer l'impact de l'inhibition de l'inflammation de type III sur les réponses de type I et de type II puisque les voies modifiant ces trois réponses inflammatoires se recoupent (Figure 22).

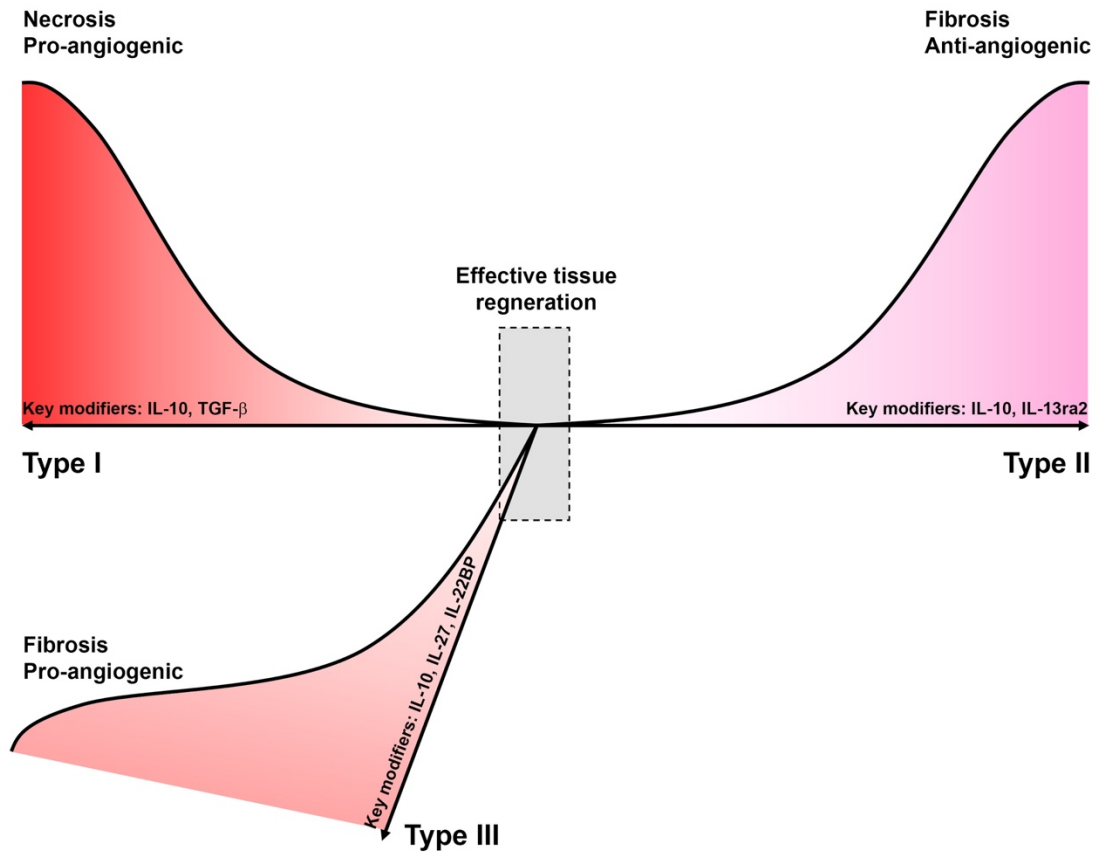


Figure 22. Les réponses inflammatoires fortement polarisées contribuent à la fibrose hépatique

Les réponses inflammatoires excessives entraînent la progression de la fibrose. La réponse de type I favorise la nécrose et la production de TGF- β , tandis que la réponse de type III amplifie l'effet du TGF- β . L'inflammation de type II inhibe l'inflammation de type I, mais contribue directement à la progression de la fibrose. La régénération tissulaire normale ne peut être induite que si ces trois réponses inflammatoires sont régulées de manière optimale.

10. Rôle de l'inflammation de type III dans le carcinome hépatocellulaire

Nous avons démontré que la réponse de type III, médiée par l'IL-17A et l'IL-22, contribue à la progression de la fibrose hépatique lors des insultes chroniques. La fibrose est le premier pas vers le carcinome hépatocellulaire. La persistance de la fibrose joue un rôle important dans la carcinogenèse en activant de nombreuses voies oncogéniques³. En effet, les interactions entre la matrice extracellulaire et les intégrines induisent des signaux de survie dans les hépatocytes. L'activité antitumorale des cellules NK est réduite, car leur motilité tissulaire est limitée par la densité de l'ECM ainsi que par la sécrétion de TIMPs par les HSCs³. De plus, de nombreuses voies de signalisation activées par des molécules profibrotiques mènent à la production d'oncogènes. Les liposaccharides bactériens en se liant au TLR-4 à la surface des HSCs entraînent leur activation par des mécanismes dépendant de NF- κ B¹¹². Cette même voie est liée à la progression du HCC puisque NF- κ B favorise la production d'oncogènes par les HSCs comme l'épiréguline et le HGF³⁸².

L'IL-17A et l'IL-22 sont deux cytokines associées à la progression du cancer et qui sont enrichies dans les carcinomes hépatocellulaires^{251, 383, 384, 385, 386, 387, 388}. L'IL-22 agit sur la transformation des hépatocytes en augmentant leur survie par l'activation de STAT3³⁷⁸. L'IL-17A signale aussi par STAT3 ainsi que NF- κ B, ces deux voies sont impliquées dans la carcinogenèse^{292, 382}. Nous avons démontré que l'IL-17A active la voie JNK permettant d'augmenter la réponse des HSCs au TGF- β . Or, la voie JNK est importante pour l'initiation et progression du cancer³⁸⁹. Une étude récente démontre que les T-CD4 produisant l'IL-17A et l'IL-22 contribuent à la progression du HCC en inhibant la fonction lymphocytes T-CD8 cytotoxiques³⁹⁰. L'IL-22 contribue aussi à la génération d'un phénotype de cellules souches facilitant la progression tumorale par des mécanismes dépendants des MAPKs^{369, 391}. Enfin, l'absence de régulation de l'IL-22 par l'ablation de l'IL-22BP favorise le développement du cancer dans les insultes tissulaires chroniques de l'intestin³¹¹.

Ensemble ces résultats suggèrent que la dérégulation de l'inflammation de type III peut entraîner la progression de la carcinogenèse. Tout d'abord, cette réponse contribue à la progression de la fibrose qui contribue à la carcinogenèse. De plus, ces cytokines de type III peuvent agir sur les hépatocytes et activer des voies oncogéniques tout en augmentant probablement la sécrétion d'oncogènes par les HSCs. Finalement, nous avons observé que la

progression de la fibrose est associée à une augmentation du nombre intrahépatique de Tregs pouvant ainsi favoriser un environnement tolérogène facilitant la progression du carcinome.

11. Conclusions, limitations et perspectives

11.a. Conclusions générales

La progression de la fibrose est liée à une dérégulation de la balance inflammatoire entraînant un déséquilibre entre cytokines pro- et anti-fibrotiques. L'inflammation peut être divisée en trois types caractérisés par l'activation de certaines cellules immunitaires et une signature cytokinique. L'étude des réponses inflammatoires associées à la progression de la fibrose hépatique chez l'homme représente un challenge puisque l'accès au tissu hépatique est un facteur limitant. Les modèles *in vivo* ont permis d'établir le dogme que l'inflammation de type I est anti-fibrotique, tandis que l'inflammation de type II est profibrotique lors des insultes chroniques^{1,4}. Cependant, ces observations négligent l'implication de l'inflammation de type III. Nous avons donc étudié le rôle de l'inflammation de type I, de type II et de type III chez l'homme dans la progression de la fibrose en utilisant une cohorte de patients souffrant d'hépatites virales ou non virales avec différents degrés de fibrose hépatique. Le but de cette étude était de déterminer les signatures inflammatoires associées à la progression de la fibrose hépatique chez l'homme puis de valider les mécanismes d'actions cellulaires et moléculaires *in vivo* et *in vitro*.

La conclusion principale de notre étude est que l'inflammation de type III caractérisée par une dérégulation du ratio intrahépatique Th17/Treg et que la sécrétion importante d'IL-17A et d'IL-22 est une signature commune de la progression de la fibrose hépatique. Cette réponse inflammatoire se localise au niveau de la cicatrice hépatique. L'IL-17A et l'IL-22 contribuent indirectement à la progression de la fibrose hépatique en sensibilisant les HSCs à l'action du TGF- β par des mécanismes différents qui dépendent des MAPKs. L'IL-17A stabilise l'expression du TGF- β -RII à la surface des HSCs par l'activation de la voie JNK. *In vivo*, l'IL-17A contribue aussi à la progression de la fibrose en augmentant le recrutement et l'activation des monocytes et des macrophages pro-inflammatoires. La voie de l'IL-22 est fortement associée à la progression de la fibrose dans NASH, l'infection par le VHC et le VHB comme démontré par des données de bio-puces. L'IL-22 augmente la phosphorylation de SMAD2/3,

les molécules effectrices de la voie du TGF- β , par l'activation de la voie p38/MAPK qui entraîne la différenciation des HSCs en myofibroblastes. L'absence de signalisation par l'IL-22 limite la progression de la fibrose hépatique *in vivo*. Nous avons aussi démontré que l'inhibition de l'inflammation de type III, par administration d'antagoniste contre AHR et contre ROR γ t, limite la progression de la fibrose. Cette diminution de la fibrose est associée à un nombre réduit de cellules IL-22⁺ dans le foie. Ceci démontre que l'administration de petites molécules, dirigées contre les facteurs clés de la réponse de type III, peut avoir un effet thérapeutique.

Finalement, nous avons démontré que l'inflammation de type I n'est pas associée à la progression de la fibrose hépatique tandis que l'inflammation de type II (IL-4 et IL-13) contribue à la progression de la fibrose dans NASH uniquement. Nous avons validé dans un modèle murin de diète riche en gras. Nous avons démontré un rôle opposé pour l'inflammation de type I et type II dans le foie et le tissu adipeux. L'inflammation de type I contribue à la progression du syndrome métabolique lors de NASH tout en limitant la progression de la fibrose dans le foie. Au contraire, l'inflammation de type II contribue à l'homéostasie du tissu adipeux, mais induit la progression de la fibrose hépatique par des mécanismes indépendants du TGF- β .

11.b. Limitations et perspectives

11.b.1. Études longitudinales sur la progression de la fibrose hépatique

Notre étude est la première à avoir étudié dans le foie les trois signatures inflammatoires associées à la progression de la fibrose dans une cohorte souffrant de différentes étiologies hépatiques (n=62). Malgré cela, un aspect limitant de notre étude est le fait qu'elle ne soit pas longitudinale. De ce fait, nous n'avons pas pu suivre nos patients au cours du temps afin de déterminer des signatures inflammatoires pouvant prédire la progression de la fibrose hépatique. Cependant, puisque nous avons commencé le recrutement de ces patients en 2012 il est normal que ces patients n'aient pas reçu de nouvelle biopsie hépatique pendant la période de suivi. Néanmoins, cette faiblesse peut être contournée en optimisant l'utilisation d'un groupe d'anticorps conjugués à différents fluorochromes afin d'évaluer de façon concomitante les réponses de type I (IFN- γ), type II (IL-4 et IL-13) en plus de la réponse de type III (IL-17A, CD4, FOXP3). Cette optimisation permettrait ainsi d'évaluer la réponse de type I, II et III sur

des spécimens cliniques archivés inclus en paraffine. Il serait ainsi possible de réaliser une étude longitudinale.

11.b.2. Caractérisations phénotypiques des cellules IL-17⁺ et IL-22⁺ dans le foie

Nos analyses *in situ* démontrent que la majorité des cellules produisant l'IL-17 ne sont pas des Th17. De nombreuses études ont démontré que cette cytokine peut être produite par les mastocytes, les neutrophiles, les lymphocytes $\gamma\delta$ et les ILC3s. Il sera donc nécessaire d'identifier ces cellules IL-17⁺ dans le foie de nos patients en réalisant des marquages contre l'IL-17, la tryptase (marqueurs des mastocytes), CD66b (marqueurs des neutrophiles/granulocytes), CD3 (marqueurs des lymphocytes), le TCR $\gamma\delta$ et NKp44 (marqueurs des ILC3s). Cette étude permettra de démontrer la contribution de ces différentes populations. Des études similaires pour caractériser les cellules produisant l'IL-22 seront aussi nécessaires. Cependant, le manque d'anticorps fonctionnels contre cette cytokine rend cette étude plus complexe. L'hybridation *in situ* des ARNm codants pour l'IL-22 semble à ce jour la meilleure alternative pour détecter cette cytokine *in situ* dans des spécimens fixés en paraffine.

11.b.3. Rôle de l'IL-22BP dans la progression de la fibrose hépatique

Une autre limitation importante de notre étude est de ne pas avoir évalué le rôle de l'IL-22BP, le récepteur soluble de l'IL-22 qui agit comme leurre et limite son action. Tout comme l'IL-13, l'IL-22 est régulé par la sécrétion de son récepteur inhibiteur l'IL-22BP. Il sera important de déterminer le phénotype des souris IL-22RA2 (IL-22BP) déficientes dans des modèles de fibrose hépatique par administration de toxines ou diètes riches en graisses. Nous nous attendons à une diminution de l'inflammation tissulaire dans la phase aiguë de l'insulte, mais à une progression de la fibrose et du carcinome hépatocellulaire comme suggéré par les études dans l'intestin sur l'IL-22BP et sur le rôle de l'IL-13RA2^{267, 311}.

11.b.4. Rôle des Tregs dans la progression de la fibrose hépatique

Le rôle des Tregs dans la progression de la fibrose est de plus en plus controversé. Nous avons reporté que la fréquence des Tregs corrèle avec l'inflammation hépatique mais aussi avec les niveaux de collagène présent dans le tissu hépatique. De plus, des études récentes ont aussi reporté des observations similaires et ont déterminé *in vitro* des mécanismes probables par

lesquels les Tregs contribuent à la progression de la fibrose hépatique^{332, 333}. Des études complémentaires *in vivo* doivent être conduites pour valider ces observations. Des expériences de déplétion des Tregs *in vivo* à différents stades de l'insulte hépatique, par l'utilisation de souris exprimant le récepteur à la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur FOXP3 (FOXP3-DTR), pourraient clarifier le rôle de ces cellules.

11.b.5. Déterminer la plasticité des Th17 et des Tregs lors des insultes hépatiques chroniques

La plasticité entre les Th17 et les Tregs a été reportée dans de nombreux modèles de maladies inflammatoires^{285, 325}. Ce phénomène mérite d'être exploré lors de la progression de la fibrose hépatique. Des expériences utilisant des souris rapporteuses pour l'expression de ROR γ t (ROR γ t-RFP) croisées avec des souris FOXP3-CRE.rosa26-GFP pourraient permettre de détecter la conversion des Tregs en Th17 par identification des cellules RFP+GFP+ négatives pour FOXP3. À l'inverse, l'utilisation de souris FOXP3-RFP croisées avec des souris ROR γ t-CRE.rosa26-GFP pourrait permettre de détecter la conversion des Th17 en Tregs au cours de l'insulte hépatique.

11.b.6. Effet de l'IL-17A et de l'IL-22 sur les différents compartiments cellulaires hépatiques lors des insultes chroniques

Afin de développer des traitements visant les différentes voies inflammatoires, il est nécessaire de comprendre l'impact des différentes cytokines sur les différents compartiments cellulaires hépatiques. En effet, les marqueurs spécifiques des différentes cellules hépatiques ont été récemment identifiés par de nombreux groupes. Une élégante étude récente a démontré *in vivo* le rôle de l'IL-13 sur les hépatocytes, les myofibroblastes et les cholangiocytes dans différents modèles d'insultes chroniques hépatiques¹⁶⁰. Bien que le rôle de l'IL-13 dans la fibrose soit connu depuis de nombreuses années, cette étude a permis de significativement accroître nos connaissances sur la fonction de cette cytokine dans les différents compartiments hépatiques. La première étape sera de générer des souris IL-17RA et IL-22RA1 « floxées » puis de les croiser avec des souris exprimant la recombinase CRE sous l'expression de l'albumine (hépatocytes), Lrat (HSCs), PDGF β R (myofibroblastes), F4/80 (macrophages) et keratine-19 (cholangiocytes).

11.b.7. Rôle de l'IL-22 dans la progression de la stéatose et fibrose hépatique

Nous avons observé une signature mixte de type II/III chez les patients souffrant de NASH. Bien que nous ayons validé le rôle de l'immunité de type II dans la progression de la fibrose chez NASH, nous n'avons pas évalué le rôle de l'Immunité de type III. Nous devons donc encore conduire les expériences de diètes riches en gras sur les souris IL-22RA1 déficientes, puisque des études ont déjà montré la protection chez les souris IL-17RA déficientes²⁹⁸. Ces études risquent d'être complexes puisque l'IL-22 contribue à l'homéostasie de l'intestin et donc indirectement au métabolisme des lipides qui influence directement la progression de la pathogenèse dans NASH. Il sera donc peut-être nécessaire de générer une souris IL-22RA1 « floxée » afin de réaliser des déplétions spécifiques dans les hépatocytes (albumin-cre), les HSCs (Irat-cre) et l'épithélium intestinal (vilin-cre) pour mieux disséquer le phénotype.

11.c Importance de l'étude

L'importance de cette étude est qu'elle démontre un rôle crucial de l'inflammation de type III dans la majorité des cas d'hépatites. Cette signature immunologique représente une cible thérapeutique majeure, car elle pourrait limiter la progression de la fibrose dans de nombreuses étiologies. Nous avons démontré conceptuellement que la modulation de cette réponse inflammatoire peut limiter la progression de la fibrose hépatique. Le mécanisme d'action des cytokines de type III est l'amplification de la signalisation du TGF- β , la cytokine profibrotique majeure, par l'activation des MAPKs. Les voies de signalisation activées par l'inflammation de type III sont aussi associées à la progression du carcinome. Ainsi, les approches thérapeutiques visant à limiter l'inflammation de type III auront probablement un double impact qui aura un effet immédiat sur la fibrose et un effet plus tardif sur la progression du carcinome.

Finalement, cibler l'inflammation chronique est une voie de recherche thérapeutique importante. Les efforts de recherche actuels sont basés sur un retour à l'homéostasie entre les réponses de type I et de type II. Cependant, notre étude démontre que l'inflammation de type III contribue aussi fortement à ce déséquilibre (Figure 22). Nos observations ouvrent donc la porte à de prochaines études visant à caractériser les mécanismes entraînant une dérégulation de l'inflammation de type III et comment cette réponse influence l'inflammation de type I et de type II.

Bibliographie

1. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S.L. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annual review of pathology* **6**, 425-456 (2011).
2. Gieseck, R.L., 3rd, Wilson, M.S. & Wynn, T.A. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nature reviews. Immunology* (2017).
3. Zhang, D.Y. & Friedman, S.L. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* **56**, 769-775 (2012).
4. Eming, S.A., Wynn, T.A. & Martin, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science (New York, N.Y.)* **356**, 1026-1030 (2017).
5. Baroni, G.S. *et al.* Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* **23**, 1189-1199 (1996).
6. Barron, L. & Wynn, T.A. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **300**, G723-728 (2011).
7. Isailovic, N., Daigo, K., Mantovani, A. & Selmi, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of autoimmunity* **60**, 1-11 (2015).
8. Lafdil, F., Miller, A.M., Ki, S.H. & Gao, B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cellular & molecular immunology* **7**, 250-254 (2010).
9. Lubberts, E. Th17 cytokines and arthritis. *Seminars in immunopathology* **32**, 43-53 (2010).
10. Fouser, L.A., Wright, J.F., Dunussi-Joannopoulos, K. & Collins, M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunological reviews* **226**, 87-102 (2008).
11. Stenvall, A., Larsson, E., Strand, S.E. & Jonsson, B.A. A small-scale anatomical dosimetry model of the liver. *Physics in medicine and biology* **59**, 3353-3371 (2014).
12. Scholzel, K. *et al.* Transfer of MHC-class-I molecules among liver sinusoidal cells facilitates hepatic immune surveillance. *Journal of hepatology* **61**, 600-608 (2014).
13. Limmer, A. *et al.* Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nature medicine* **6**, 1348-1354 (2000).

14. Wisse, E., De Zanger, R.B., Charels, K., Van Der Smissen, P. & McCuskey, R.S. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* **5**, 683-692 (1985).
15. Wisse, E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *Journal of ultrastructure research* **31**, 125-150 (1970).
16. Shirakami, Y., Lee, S.A., Clugston, R.D. & Blaner, W.S. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochimica et biophysica acta* **1821**, 124-136 (2012).
17. Sauvant, P., Cansell, M. & Atgie, C. Vitamin A and lipid metabolism: relationship between hepatic stellate cells (HSCs) and adipocytes. *Journal of physiology and biochemistry* **67**, 487-496 (2011).
18. Blomhoff, R. *et al.* Hepatic retinol metabolism. Distribution of retinoids, enzymes, and binding proteins in isolated rat liver cells. *The Journal of biological chemistry* **260**, 13560-13565 (1985).
19. Tsuchida, T. & Friedman, S.L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **14**, 397-411 (2017).
20. Chinnadurai, R. & Grakoui, A. B7-H4 mediates inhibition of T cell responses by activated murine hepatic stellate cells. *Hepatology* **52**, 2177-2185 (2010).
21. Ichikawa, S., Mucida, D., Tyznik, A.J., Kronenberg, M. & Cheroutre, H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 5549-5555 (2011).
22. McDonald, B., Jenne, C.N., Zhuo, L., Kimata, K. & Kubes, P. Kupffer cells and activation of endothelial TLR4 coordinate neutrophil adhesion within liver sinusoids during endotoxemia. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **305**, G797-806 (2013).
23. Haubrich, W.S. Kupffer of Kupffer cells. *Gastroenterology* **127**, 16 (2004).
24. Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R. & Wisse, E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* **6**, 718-722 (1986).
25. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews. Immunology* **13**, 159-175 (2013).
26. McDonald, B. *et al.* Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 362-366 (2010).
27. Rui, L. Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology* **4**, 177-197 (2014).

28. Agius, L. Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism. *The Biochemical journal* **414**, 1-18 (2008).
29. Zhang, T. *et al.* Acetylation negatively regulates glycogen phosphorylase by recruiting protein phosphatase 1. *Cell metabolism* **15**, 75-87 (2012).
30. She, P. *et al.* Phosphoenolpyruvate carboxykinase is necessary for the integration of hepatic energy metabolism. *Molecular and cellular biology* **20**, 6508-6517 (2000).
31. Mutel, E. *et al.* Targeted deletion of liver glucose-6 phosphatase mimics glycogen storage disease type 1a including development of multiple adenomas. *Journal of hepatology* **54**, 529-537 (2011).
32. Zhou, J. *et al.* A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *The Journal of biological chemistry* **281**, 15013-15020 (2006).
33. Falcon, A. *et al.* FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **299**, E384-393 (2010).
34. Wan, M. *et al.* Postprandial hepatic lipid metabolism requires signaling through Akt2 independent of the transcription factors FoxA2, FoxO1, and SREBP1c. *Cell metabolism* **14**, 516-527 (2011).
35. Kersten, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *The Journal of clinical investigation* **103**, 1489-1498 (1999).
36. Besse-Patin, A. *et al.* Estrogen Signals Through Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Coactivator 1alpha to Reduce Oxidative Damage Associated With Diet-Induced Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **152**, 243-256 (2017).
37. Chiang, J.Y. Bile acid metabolism and signaling. *Comprehensive Physiology* **3**, 1191-1212 (2013).
38. Boyer, J.L. Bile formation and secretion. *Comprehensive Physiology* **3**, 1035-1078 (2013).
39. Duane, W.C. & Javitt, N.B. 27-hydroxycholesterol: production rates in normal human subjects. *Journal of lipid research* **40**, 1194-1199 (1999).
40. Li, T. *et al.* Transgenic expression of cholesterol 7alpha-hydroxylase in the liver prevents high-fat diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Hepatology* **52**, 678-690 (2010).

41. Fang, Y. *et al.* Bile acids induce mitochondrial ROS, which promote activation of receptor tyrosine kinases and signaling pathways in rat hepatocytes. *Hepatology* **40**, 961-971 (2004).
42. Li, T. & Chiang, J.Y. A novel role of transforming growth factor beta1 in transcriptional repression of human cholesterol 7alpha-hydroxylase gene. *Gastroenterology* **133**, 1660-1669 (2007).
43. Crispe, I.N. Liver antigen-presenting cells. *Journal of hepatology* **54**, 357-365 (2011).
44. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* **43**, S54-62 (2006).
45. John, B. & Crispe, I.N. Passive and active mechanisms trap activated CD8+ T cells in the liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 5222-5229 (2004).
46. Mehal, W.Z., Juedes, A.E. & Crispe, I.N. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **163**, 3202-3210 (1999).
47. Fabre T, S.N. Immunology of the liver. *Encyclopedia of Immunobiology*, vol. 5, 2016, pp 13-22.
48. Knolle, P. *et al.* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *Journal of hepatology* **22**, 226-229 (1995).
49. Freudenberg, M.A., Freudenberg, N. & Galanos, C. Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *British journal of experimental pathology* **63**, 56-65 (1982).
50. Gale, R.P., Sparkes, R.S. & Golde, D.W. Bone marrow origin of hepatic macrophages (Kupffer cells) in humans. *Science (New York, N.Y.)* **201**, 937-938 (1978).
51. Knolle, P.A. *et al.* IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clinical and experimental immunology* **114**, 427-433 (1998).
52. Wynn, T.A. & Vannella, K.M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450-462 (2016).
53. Norris, S. *et al.* Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *Journal of hepatology* **28**, 84-90 (1998).
54. Melhem, A. *et al.* Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *Journal of hepatology* **45**, 60-71 (2006).

55. Emoto, M. & Kaufmann, S.H. Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends in immunology* **24**, 364-369 (2003).
56. Kronenberg, M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annual review of immunology* **23**, 877-900 (2005).
57. Swain, M.G. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clinical science (London, England : 1979)* **114**, 457-466 (2008).
58. Ussher, J.E. *et al.* CD161⁺⁺ CD8⁺ T cells, including the MAIT cell subset, are specifically activated by IL-12+IL-18 in a TCR-independent manner. *European journal of immunology* **44**, 195-203 (2014).
59. Dusseaux, M. *et al.* Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161^{hi} IL-17-secreting T cells. *Blood* **117**, 1250-1259 (2011).
60. van Wilgenburg, B. *et al.* MAIT cells are activated during human viral infections. *Nature communications* **7**, 11653 (2016).
61. Le Bourhis, L. *et al.* MAIT cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. *PLoS pathogens* **9**, e1003681 (2013).
62. Steinman, R.M. & Banchereau, J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**, 419-426 (2007).
63. Schildberg, F.A. *et al.* Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *European journal of immunology* **38**, 957-967 (2008).
64. Pelletier, S. *et al.* Sustained hyperresponsiveness of dendritic cells is associated with spontaneous resolution of acute hepatitis C. *Journal of virology* **87**, 6769-6781 (2013).
65. Takahashi, K. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 7431-7436 (2010).
66. Annunziato, F., Romagnani, C. & Romagnani, S. The 3 major types of innate and adaptive cell-mediated effector immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology* **135**, 626-635 (2015).
67. Robinette, M.L. *et al.* Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nature immunology* **16**, 306-317 (2015).
68. Klose, C.S. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell* **157**, 340-356 (2014).

69. Doherty, D.G. & O'Farrelly, C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunological reviews* **174**, 5-20 (2000).
70. Nuti, S. *et al.* Dynamics of intra-hepatic lymphocytes in chronic hepatitis C: enrichment for Valpha24+ T cells and rapid elimination of effector cells by apoptosis. *European journal of immunology* **28**, 3448-3455 (1998).
71. Welsh, R.M. *et al.* Alpha beta and gamma delta T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections. *Immunological reviews* **159**, 79-93 (1997).
72. Hammerich, L., Heymann, F. & Tacke, F. Role of IL-17 and Th17 cells in liver diseases. *Clinical & developmental immunology* **2011**, 345803 (2011).
73. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of immunology* **27**, 485-517 (2009).
74. Zenewicz, L.A. *et al.* Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* **27**, 647-659 (2007).
75. Calne, R.Y. *et al.* Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* **223**, 472-476 (1969).
76. Bertolino, P., McCaughan, G.W. & Bowen, D.G. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunology and cell biology* **80**, 84-92 (2002).
77. Bertolino, P. Impaired function of dendritic cells translocating the liver sinusoids: a veto effect contributing to intrahepatic tolerance? *European journal of immunology* **38**, 938-941 (2008).
78. Bowen, D.G. *et al.* The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *The Journal of clinical investigation* **114**, 701-712 (2004).
79. Dangi, A. *et al.* Selective expansion of allogeneic regulatory T cells by hepatic stellate cells: role of endotoxin and implications for allograft tolerance. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 3667-3677 (2012).
80. Mengshol, J.A. *et al.* A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PloS one* **5**, e9504 (2010).
81. Lohse, A.W. *et al.* Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* **110**, 1175-1181 (1996).
82. Cheng, J.T. *et al.* Hepatic carcinoma-associated fibroblasts induce IDO-producing regulatory dendritic cells through IL-6-mediated STAT3 activation. *Oncogenesis* **5**, e198 (2016).

83. Sun, X. *et al.* IDO-competent-DCs induced by IFN-gamma attenuate acute rejection in rat liver transplantation. *Journal of clinical immunology* **32**, 837-847 (2012).
84. Luan, X. *et al.* Dynamic changes of indoleamine 2,3-dioxygenase of Kupffer cells in rat liver transplant rejection and tolerance. *Transplantation proceedings* **44**, 1045-1047 (2012).
85. Vaughn, B.P., Robson, S.C. & Longhi, M.S. Purinergic signaling in liver disease. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)* **32**, 516-524 (2014).
86. Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C. & Stagg, J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological reviews* **276**, 121-144 (2017).
87. Takenaka, M.C., Robson, S. & Quintana, F.J. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends in immunology* **37**, 427-439 (2016).
88. Regateiro, F.S., Cobbold, S.P. & Waldmann, H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clinical and experimental immunology* **171**, 1-7 (2013).
89. Protzer, U., Maini, M.K. & Knolle, P.A. Living in the liver: hepatic infections. *Nature reviews. Immunology* **12**, 201-213 (2012).
90. Huang, L.R. *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nature immunology* **14**, 574-583 (2013).
91. Rabinovich, G.A. *et al.* Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **160**, 4831-4840 (1998).
92. Perillo, N.L., Pace, K.E., Seilhamer, J.J. & Baum, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* **378**, 736-739 (1995).
93. Dal-Secco, D. *et al.* A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury. *The Journal of experimental medicine* **212**, 447-456 (2015).
94. Wynn, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology* **214**, 199-210 (2008).
95. McDonald, B. & Kubes, P. Innate Immune Cell Trafficking and Function During Sterile Inflammation of the Liver. *Gastroenterology* **151**, 1087-1095 (2016).

96. Wong, C.H., Jenne, C.N., Petri, B., Chrobok, N.L. & Kubes, P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nature immunology* **14**, 785-792 (2013).
97. Wang, J. & Kubes, P. A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. *Cell* **165**, 668-678 (2016).
98. Slaba, I. *et al.* Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice. *Hepatology* **62**, 1593-1605 (2015).
99. Mederacke, I. *et al.* Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nature communications* **4**, 2823 (2013).
100. Pagan, R. *et al.* Effects of growth and differentiation factors on the epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *Journal of hepatology* **31**, 895-904 (1999).
101. Koyama, Y. *et al.* Mesothelin/mucin 16 signaling in activated portal fibroblasts regulates cholestatic liver fibrosis. *The Journal of clinical investigation* **127**, 1254-1270 (2017).
102. Xu, J. & Kisseleva, T. Bone marrow-derived fibrocytes contribute to liver fibrosis. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* **240**, 691-700 (2015).
103. Xu, J. *et al.* Contribution of bone marrow-derived fibrocytes to liver fibrosis. *Hepatobiliary surgery and nutrition* **4**, 34-47 (2015).
104. Iwaisako, K. *et al.* Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, E3297-3305 (2014).
105. Mehal, W.Z., Iredale, J. & Friedman, S.L. Scraping fibrosis: expressway to the core of fibrosis. *Nature medicine* **17**, 552-553 (2011).
106. Greene, R.M., Nugent, P., Mukhopadhyay, P., Warner, D.R. & Pisano, M.M. Intracellular dynamics of Smad-mediated TGFbeta signaling. *Journal of cellular physiology* **197**, 261-271 (2003).
107. Tahashi, Y. *et al.* Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* **35**, 49-61 (2002).
108. Kavsak, P. *et al.* Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell* **6**, 1365-1375 (2000).
109. Lin, X., Liang, M. & Feng, X.H. Smurf2 is a ubiquitin E3 ligase mediating proteasome-dependent degradation of Smad2 in transforming growth factor-beta signaling. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36818-36822 (2000).

110. Lv, Z. *et al.* Effect of salvianolic-acid B on inhibiting MAPK signaling induced by transforming growth factor-beta1 in activated rat hepatic stellate cells. *Journal of ethnopharmacology* **132**, 384-392 (2010).
111. Friedman, S.L. A deer in the headlights: BAMBI meets liver fibrosis. *Nature medicine* **13**, 1281-1282 (2007).
112. Seki, E. *et al.* TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine* **13**, 1324-1332 (2007).
113. Atorrasagasti, C. *et al.* SPARC downregulation attenuates the profibrogenic response of hepatic stellate cells induced by TGF-beta1 and PDGF. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **300**, G739-748 (2011).
114. Henderson, N.C. *et al.* Targeting of alphav integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature medicine* **19**, 1617-1624 (2013).
115. Fernandez, M. *et al.* Angiogenesis in liver disease. *Journal of hepatology* **50**, 604-620 (2009).
116. Huang, G. & Brigstock, D.R. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **17**, 2495-2507 (2012).
117. Bernard, M. *et al.* Autophagy fosters myofibroblast differentiation through MTORC2 activation and downstream upregulation of CTGF. *Autophagy* **10**, 2193-2207 (2014).
118. Chen, L., Chen, R., Kemper, S., Charrier, A. & Brigstock, D.R. Suppression of fibrogenic signaling in hepatic stellate cells by Twist1-dependent microRNA-214 expression: Role of exosomes in horizontal transfer of Twist1. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **309**, G491-499 (2015).
119. Olivares-Navarrete, R. *et al.* Substrate Stiffness Controls Osteoblastic and Chondrocytic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells without Exogenous Stimuli. *PloS one* **12**, e0170312 (2017).
120. Wen, J.H. *et al.* Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nat Mater* **13**, 979-987 (2014).
121. Mederacke, I., Dapito, D.H., Affo, S., Uchinami, H. & Schwabe, R.F. High-yield and high-purity isolation of hepatic stellate cells from normal and fibrotic mouse livers. *Nature protocols* **10**, 305-315 (2015).
122. Sun, K.H., Chang, Y., Reed, N.I. & Sheppard, D. alpha-Smooth muscle actin is an inconsistent marker of fibroblasts responsible for force-dependent TGFbeta activation

- or collagen production across multiple models of organ fibrosis. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **310**, L824-836 (2016).
123. Mannaerts, I. *et al.* The Hippo pathway effector YAP controls mouse hepatic stellate cell activation. *Journal of hepatology* **63**, 679-688 (2015).
 124. Machado, M.V. *et al.* Accumulation of duct cells with activated YAP parallels fibrosis progression in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology* **63**, 962-970 (2015).
 125. Bai, H. *et al.* Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation. *Hepatology* **56**, 1097-1107 (2012).
 126. Michelotti, G.A. *et al.* Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *The Journal of clinical investigation* **123**, 2380-2394 (2013).
 127. Syn, W.K. *et al.* Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **53**, 106-115 (2011).
 128. Hernandez-Gea, V. *et al.* Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* **142**, 938-946 (2012).
 129. Liang, S., Kisseleva, T. & Brenner, D.A. The Role of NADPH Oxidases (NOXs) in Liver Fibrosis and the Activation of Myofibroblasts. *Frontiers in physiology* **7**, 17 (2016).
 130. Yamada, M. *et al.* Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* **7**, 1224-1229 (1987).
 131. Kluwe, J. *et al.* Absence of hepatic stellate cell retinoid lipid droplets does not enhance hepatic fibrosis but decreases hepatic carcinogenesis. *Gut* **60**, 1260-1268 (2011).
 132. Yi, H.S. *et al.* Alcohol dehydrogenase III exacerbates liver fibrosis by enhancing stellate cell activation and suppressing natural killer cells in mice. *Hepatology* **60**, 1044-1053 (2014).
 133. Tomita, K. *et al.* Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* **59**, 154-169 (2014).
 134. Teratani, T. *et al.* A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* **142**, 152-164.e110 (2012).

135. Saxena, N.K. & Anania, F.A. Adipocytokines and hepatic fibrosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **26**, 153-161 (2015).
136. Tacke, F., Zimmermann, H.W., Berres, M.L., Trautwein, C. & Wasmuth, H.E. Serum chemokine receptor CXCR3 ligands are associated with progression, organ dysfunction and complications of chronic liver diseases. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **31**, 840-849 (2011).
137. Seki, E. *et al.* CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 1858-1870 (2009).
138. Friedman, S.L. & Bansal, M.B. Reversal of hepatic fibrosis -- fact or fantasy? *Hepatology* **43**, S82-88 (2006).
139. Jeong, W.I., Park, O., Radaeva, S. & Gao, B. STAT1 inhibits liver fibrosis in mice by inhibiting stellate cell proliferation and stimulating NK cell cytotoxicity. *Hepatology* **44**, 1441-1451 (2006).
140. Radaeva, S. *et al.* Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D-dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* **130**, 435-452 (2006).
141. Kisseleva, T. *et al.* Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 9448-9453 (2012).
142. Park, S.H. & Rehermann, B. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity* **40**, 13-24 (2014).
143. El-Serag, H.B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **142**, 1264-1273 e1261 (2012).
144. Nassal, M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* (2015).
145. Cooper, A., Tal, G., Lider, O. & Shaul, Y. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**, 3165-3176 (2005).
146. Hosel, M. *et al.* Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* **50**, 1773-1782 (2009).
147. Abdel-Hakeem, M.S. & Shoukry, N.H. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Frontiers in immunology* **5**, 274 (2014).

148. Horner, S.M. & Gale, M., Jr. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nature medicine* **19**, 879-888 (2013).
149. Foy, E. *et al.* Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-I signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2986-2991 (2005).
150. Grakoui, A. *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science (New York, N.Y.)* **302**, 659-662 (2003).
151. Shoukry, N.H. *et al.* Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* **197**, 1645-1655 (2003).
152. Munshaw, S. *et al.* Laser captured hepatocytes show association of butyrylcholinesterase gene loss and fibrosis progression in hepatitis C-infected drug users. *Hepatology* **56**, 544-554 (2012).
153. Teixeira, R., Marcos, L.A. & Friedman, S.L. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection and hepatic fibrosis: New insights into antifibrotic therapy in chronic hepatitis C. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **37**, 579-595 (2007).
154. Florimond, A. *et al.* Human hepatic stellate cells are not permissive for hepatitis C virus entry and replication. *Gut* **64**, 957-965 (2015).
155. Kanwal, F. *et al.* Increasing prevalence of HCC and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **140**, 1182-1188 e1181 (2011).
156. Shariff, M.I. *et al.* Hepatocellular carcinoma: current trends in worldwide epidemiology, risk factors, diagnosis and therapeutics. *Expert review of gastroenterology & hepatology* **3**, 353-367 (2009).
157. Heathcote, E.J. Prevention of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* **127**, S294-302 (2004).
158. Shaker, Y., Samy, N. & Ashour, E. Hepatobiliary Schistosomiasis. *Journal of clinical and translational hepatology* **2**, 212-216 (2014).
159. Andrade, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite immunology* **31**, 656-663 (2009).
160. Gieseck, R.L., 3rd *et al.* Interleukin-13 Activates Distinct Cellular Pathways Leading to Ductular Reaction, Steatosis, and Fibrosis. *Immunity* **45**, 145-158 (2016).

161. Chiamonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W. & Wynn, T.A. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation* **104**, 777-785 (1999).
162. Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. & Yuda, M. Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS biology* **2**, E4 (2004).
163. Pradel, G. & Frevert, U. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* **33**, 1154-1165 (2001).
164. Cockburn, I.A. *et al.* Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8+ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS pathogens* **6**, e1000877 (2010).
165. Chakravarty, S. *et al.* CD8+ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nature medicine* **13**, 1035-1041 (2007).
166. Morrot, A., Hafalla, J.C., Cockburn, I.A., Carvalho, L.H. & Zavala, F. IL-4 receptor expression on CD8+ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. *The Journal of experimental medicine* **202**, 551-560 (2005).
167. Carvalho, L.H. *et al.* IL-4-secreting CD4+ T cells are crucial to the development of CD8+ T-cell responses against malaria liver stages. *Nature medicine* **8**, 166-170 (2002).
168. Sebode, M., Hartl, J., Vergani, D. & Lohse, A.W. Autoimmune hepatitis: From current knowledge and clinical practice to future research agenda. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* (2017).
169. Cassim, S., Bilodeau, M., Vincent, C. & Lapierre, P. Novel Immunotherapies for Autoimmune Hepatitis. *Frontiers in pediatrics* **5**, 8 (2017).
170. Seth, D. *et al.* Alcohol, signaling, and ECM turnover. *Alcoholism, clinical and experimental research* **34**, 4-18 (2010).
171. Dunn, W. & Shah, V.H. Pathogenesis of Alcoholic Liver Disease. *Clinics in liver disease* **20**, 445-456 (2016).
172. Seki, E. & Schnabl, B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *The Journal of physiology* **590**, 447-458 (2012).
173. Guo, J. & Friedman, S.L. Toll-like receptor 4 signaling in liver injury and hepatic fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair* **3**, 21 (2010).
174. Lake, A.D. *et al.* Analysis of global and absorption, distribution, metabolism, and elimination gene expression in the progressive stages of human nonalcoholic fatty liver

- disease. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **39**, 1954-1960 (2011).
175. Bedossa, P. Pathology of non-alcoholic fatty liver disease. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **37 Suppl 1**, 85-89 (2017).
 176. Wong, V.W. *et al.* Pathogenesis and novel treatment options for non-alcoholic steatohepatitis. *The lancet. Gastroenterology & hepatology* **1**, 56-67 (2016).
 177. Patel, A. & Harrison, S.A. Hepatitis C virus infection and nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* **8**, 305-312 (2012).
 178. Ma, C. *et al.* NAFLD causes selective CD4(+) T lymphocyte loss and promotes hepatocarcinogenesis. *Nature* **531**, 253-257 (2016).
 179. Guido, M. & Ruge, M. Liver biopsy sampling in chronic viral hepatitis. *Seminars in liver disease* **24**, 89-97 (2004).
 180. Friedman, S.L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **7**, 425-436 (2010).
 181. Colloredo, G., Guido, M., Sonzogni, A. & Leandro, G. Impact of liver biopsy size on histological evaluation of chronic viral hepatitis: the smaller the sample, the milder the disease. *Journal of hepatology* **39**, 239-244 (2003).
 182. Bedossa, P., Dargere, D. & Paradis, V. Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* **38**, 1449-1457 (2003).
 183. Brunt, E.M. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* **31**, 241-246 (2000).
 184. Bedossa, P. & Poynard, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* **24**, 289-293 (1996).
 185. Ishak, K. *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis. *Journal of hepatology* **22**, 696-699 (1995).
 186. Bedossa, P. Utility and appropriateness of the fatty liver inhibition of progression (FLIP) algorithm and steatosis, activity, and fibrosis (SAF) score in the evaluation of biopsies of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **60**, 565-575 (2014).
 187. Ngo, Y. *et al.* A prospective analysis of the prognostic value of biomarkers (FibroTest) in patients with chronic hepatitis C. *Clinical chemistry* **52**, 1887-1896 (2006).

188. Sanchez-Conde, M. *et al.* Comparison of transient elastography and liver biopsy for the assessment of liver fibrosis in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients and correlation with noninvasive serum markers. *Journal of viral hepatitis* **17**, 280-286 (2010).
189. Friedrich-Rust, M. *et al.* Performance of transient elastography for the staging of liver fibrosis: a meta-analysis. *Gastroenterology* **134**, 960-974 (2008).
190. Friedman, S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* **134**, 1655-1669 (2008).
191. Llovet, J.M. & Villanueva, A. Liver cancer: Effect of HCV clearance with direct-acting antiviral agents on HCC. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **13**, 561-562 (2016).
192. Burak, K.W. & Sherman, M. Hepatocellular carcinoma: Consensus, controversies and future directions. A report from the Canadian Association for the Study of the Liver Hepatocellular Carcinoma Meeting. *Can J Gastroenterol Hepatol* **29**, 178-184 (2015).
193. Brenner, M.C. *et al.* FG-3019, a Human Monoclonal Antibody Recognizing Connective Tissue Growth Factor, is Subject to Target-Mediated Drug Disposition. *Pharm Res* **33**, 1833-1849 (2016).
194. Meissner, E.G. *et al.* Simtuzumab treatment of advanced liver fibrosis in HIV and HCV-infected adults: results of a 6-month open-label safety trial. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **36**, 1783-1792 (2016).
195. Friedman, S.L. *et al.* A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Cenicriviroc for Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis with Fibrosis. *Hepatology* (2017).
196. Harrison, S.A. *et al.* Randomised clinical study: GR-MD-02, a galectin-3 inhibitor, vs. placebo in patients having non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis. *Aliment Pharmacol Ther* **44**, 1183-1198 (2016).
197. Ratziu, V. *et al.* Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* **150**, 1147-1159 e1145 (2016).
198. Cusi, K. *et al.* Long-Term Pioglitazone Treatment for Patients With Nonalcoholic Steatohepatitis and Prediabetes or Type 2 Diabetes Mellitus: A Randomized Trial. *Annals of internal medicine* **165**, 305-315 (2016).
199. Nevens, F. *et al.* A Placebo-Controlled Trial of Obeticholic Acid in Primary Biliary Cholangitis. *The New England journal of medicine* **375**, 631-643 (2016).

200. Doleshal, M. *et al.* Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* **10**, 203-211 (2008).
201. Chung, J.Y., Braunschweig, T. & Hewitt, S.M. Optimization of recovery of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B* **15**, 229-236 (2006).
202. van de Bovenkamp, M. *et al.* Precision-cut liver slices as a new model to study toxicity-induced hepatic stellate cell activation in a physiologic milieu. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **85**, 632-638 (2005).
203. Murakami, K. *et al.* Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **72**, 731-739 (1995).
204. Xu, L. *et al.* Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* **54**, 142-151 (2005).
205. Leite, S.B. *et al.* Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials* **78**, 1-10 (2016).
206. Takebe, T. *et al.* Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplantation proceedings* **44**, 1018-1020 (2012).
207. Sugimoto, S. *et al.* Hepatic organoid formation in collagen sponge of cells isolated from human liver tissues. *Tissue engineering* **11**, 626-633 (2005).
208. Michalopoulos, G.K., Bowen, W.C., Mule, K. & Luo, J. HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene expression* **11**, 55-75 (2003).
209. McMillan, P.N., Ferayorni, L.S., Gerhardt, C.O. & Jauregui, H.O. Light and electron microscope analysis of lectin binding to adult rat liver in situ. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **50**, 408-420 (1984).
210. Tiegs, G., Hentschel, J. & Wendel, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *The Journal of clinical investigation* **90**, 196-203 (1992).
211. Docherty, J.F. & Burgess, E. THE ACTION OF CARBON TETRACHLORIDE ON THE LIVER. *British medical journal* **2**, 907-908 (1922).
212. Jaeschke, H., Williams, C.D., McGill, M.R., Xie, Y. & Ramachandran, A. Models of drug-induced liver injury for evaluation of phytotherapeutics and other natural products.

Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association **55**, 279-289 (2013).

213. Zimmermann, T., Franke, H. & Dargel, R. Studies on lipid and lipoprotein metabolism in rat liver cirrhosis induced by different regimens of thioacetamide administration. *Experimental pathology* **30**, 109-117 (1986).
214. RF, S. *Animal Models for the Study of Human Disease*. Science, 2013.
215. Fuchs, M. & Stange, E.F. Cholesterol and cholestasis: a lesson from the Mdr2 (-/-) mouse. *Journal of hepatology* **34**, 339-341 (2001).
216. Johnstone, J.M. & Lee, E.G. A quantitative assessment of the structural changes the rat's liver following obstruction of the common bile duct. *British journal of experimental pathology* **57**, 85-94 (1976).
217. Lieber, C.S., DeCarli, L.M. & Sorrell, M.F. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* **10**, 501-510 (1989).
218. Derkow, K. *et al.* Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology* **46**, 1155-1165 (2007).
219. Ibrahim, S.H., Hirsova, P., Malhi, H. & Gores, G.J. Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive diseases and sciences* **61**, 1325-1336 (2016).
220. Syn, W.K. *et al.* Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **51**, 1998-2007 (2010).
221. Takahashi, Y., Soejima, Y. & Fukusato, T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* **18**, 2300-2308 (2012).
222. Hart KM, F.T., Scirba JS, Gieseck RL III, Borthwick LA, Vannella KM, Acciani TH, de Queiroz Prado R, Thompson RW, White S, Soucy G, Bilodeau M, Ramalingam TR, Shoukry NH, and Wynn TA. Type-2 immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD collaboratively with TGF- β . *Science translational medicine* **In press** (2017).
223. Zhang, Y. *et al.* A proinflammatory role for interleukin-22 in the immune response to hepatitis B virus. *Gastroenterology* **141**, 1897-1906 (2011).
224. Washburn, M.L. *et al.* A humanized mouse model to study hepatitis C virus infection, immune response, and liver disease. *Gastroenterology* **140**, 1334-1344 (2011).

225. Billerbeck, E. *et al.* Mouse models of acute and chronic hepatitis C infection. *Science (New York, N.Y.)* **357**, 204-208 (2017).
226. Delire, B., Starkel, P. & Leclercq, I. Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *Journal of clinical and translational hepatology* **3**, 53-66 (2015).
227. Fairfax, K., Nascimento, M., Huang, S.C., Everts, B. & Pearce, E.J. Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in immunopathology* **34**, 863-871 (2012).
228. Peterson, R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicologic pathology* **40**, 186-204 (2012).
229. Jia, L. & Wu, C. The biology and functions of Th22 cells. *Advances in experimental medicine and biology* **841**, 209-230 (2014).
230. Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V. & Bayry, J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *The American journal of pathology* **181**, 8-18 (2012).
231. Ramalingam, T.R. *et al.* Enhanced protection from fibrosis and inflammation in the combined absence of IL-13 and IFN- γ . *The Journal of pathology* **239**, 344-354 (2016).
232. Mentink-Kane, M.M. *et al.* Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology* **141**, 2200-2209 (2011).
233. Singh, B., Nikoopour, E., Huszarik, K., Elliott, J.F. & Jevnikar, A.M. Immunomodulation and regeneration of islet Beta cells by cytokines in autoimmune type 1 diabetes. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **31**, 711-719 (2011).
234. Lambrecht, B.N. & Hammad, H. Asthma: the importance of dysregulated barrier immunity. *European journal of immunology* **43**, 3125-3137 (2013).
235. Pawankar, R., Hayashi, M., Yamanishi, S. & Igarashi, T. The paradigm of cytokine networks in allergic airway inflammation. *Current opinion in allergy and clinical immunology* **15**, 41-48 (2015).
236. Neill, D.R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**, 1367-1370 (2010).
237. McKenzie, A.N. Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. *Pharmacology & therapeutics* **88**, 143-151 (2000).

238. Bamias, G., Arseneau, K.O. & Cominelli, F. Cytokines and mucosal immunity. *Current opinion in gastroenterology* **30**, 547-552 (2014).
239. Eidenschenk, C., Rutz, S., Liesenfeld, O. & Ouyang, W. Role of IL-22 in microbial host defense. *Current topics in microbiology and immunology* **380**, 213-236 (2014).
240. Blaschitz, C. & Raffatellu, M. Th17 cytokines and the gut mucosal barrier. *Journal of clinical immunology* **30**, 196-203 (2010).
241. Liu, J.Z., Pezeshki, M. & Raffatellu, M. Th17 cytokines and host-pathogen interactions at the mucosa: dichotomies of help and harm. *Cytokine* **48**, 156-160 (2009).
242. Dubin, P.J. & Kolls, J.K. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunological reviews* **226**, 160-171 (2008).
243. Munoz, M. *et al.* Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. *Immunity* **42**, 321-331 (2015).
244. Schreiber, F., Arasteh, J.M. & Lawley, T.D. Pathogen Resistance Mediated by IL-22 Signaling at the Epithelial-Microbiota Interface. *Journal of molecular biology* **427**, 3676-3682 (2015).
245. Morrison, P.J., Ballantyne, S.J. & Kullberg, M.C. Interleukin-23 and T helper 17-type responses in intestinal inflammation: from cytokines to T-cell plasticity. *Immunology* **133**, 397-408 (2011).
246. Duvallet, E., Semerano, L., Assier, E., Falgarone, G. & Boissier, M.C. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases. *Annals of medicine* **43**, 503-511 (2011).
247. Buonocore, S. *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* **464**, 1371-1375 (2010).
248. Shen, W. & Durum, S.K. Synergy of IL-23 and Th17 cytokines: new light on inflammatory bowel disease. *Neurochemical research* **35**, 940-946 (2010).
249. Kared, H., Fabre, T., Bedard, N., Bruneau, J. & Shoukry, N.H. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS pathogens* **9**, e1003422 (2013).
250. Malakouti, M., Brown, G.E., Wang, E., Koo, J. & Levin, E.C. The role of IL-17 in psoriasis. *The Journal of dermatological treatment* **26**, 41-44 (2015).
251. Blake, S.J. & Teng, M.W. Role of IL-17 and IL-22 in autoimmunity and cancer. *Actas dermo-sifiliograficas* **105 Suppl 1**, 41-50 (2014).

252. Yang, J., Sundrud, M.S., Skepner, J. & Yamagata, T. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. *Trends in pharmacological sciences* **35**, 493-500 (2014).
253. Monteleone, I., Sarra, M., Pallone, F. & Monteleone, G. Th17-related cytokines in inflammatory bowel diseases: friends or foes? *Current molecular medicine* **12**, 592-597 (2012).
254. Wang, X., Ma, C., Wu, J. & Zhu, J. Roles of T helper 17 cells and interleukin-17 in neuroautoimmune diseases with emphasis on multiple sclerosis and Guillain-Barre syndrome as well as their animal models. *Journal of neuroscience research* **91**, 871-881 (2013).
255. Hoffmann, K.F. *et al.* Disease fingerprinting with cDNA microarrays reveals distinct gene expression profiles in lethal type 1 and type 2 cytokine-mediated inflammatory reactions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **15**, 2545-2547 (2001).
256. Pradere, J.P. *et al.* Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* **58**, 1461-1473 (2013).
257. Wynn, T.A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nature reviews. Immunology* **15**, 271-282 (2015).
258. Vannella, K.M. *et al.* Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Science translational medicine* **8**, 337ra365 (2016).
259. Jackson, D.J. *et al.* IL-33-dependent Type 2 Inflammation During Rhinovirus-induced Asthma Exacerbations In Vivo. *American journal of respiratory and critical care medicine* (2014).
260. Scanlon, S.T. & McKenzie, A.N. Type 2 innate lymphoid cells: new players in asthma and allergy. *Current opinion in immunology* **24**, 707-712 (2012).
261. Hong, G.U., Kim, N.G., Kim, T.J. & Ro, J.Y. CD1d expressed in mast cell surface enhances IgE production in B cells by up-regulating CD40L expression and mediator release in allergic asthma in mice. *Cellular signalling* **26**, 1105-1117 (2014).
262. Yu, M. *et al.* Mast cells can promote the development of multiple features of chronic asthma in mice. *The Journal of clinical investigation* **116**, 1633-1641 (2006).
263. Hargrove, L. *et al.* Bile duct ligation-induced biliary hyperplasia, hepatic injury, and fibrosis are reduced in mast cell-deficient KitW-sh mice. *Hepatology* **65**, 1991-2004 (2017).

264. Reiman, R.M. *et al.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity* **74**, 1471-1479 (2006).
265. Yamaguchi, Y. *et al.* Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1737-1742 (1988).
266. Nakamura, A., Yamazaki, K., Suzuki, K. & Sato, S. Increased portal tract infiltration of mast cells and eosinophils in primary biliary cirrhosis. *The American journal of gastroenterology* **92**, 2245-2249 (1997).
267. Wilson, M.S. *et al.* IL-13R α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *The Journal of clinical investigation* **117**, 2941-2951 (2007).
268. Mentink-Kane, M.M. & Wynn, T.A. Opposing roles for IL-13 and IL-13 receptor α 2 in health and disease. *Immunological reviews* **202**, 191-202 (2004).
269. Pesce, J.T. *et al.* Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS pathogens* **5**, e1000371 (2009).
270. Bility, M.T. *et al.* Chronic hepatitis C infection-induced liver fibrogenesis is associated with M2 macrophage activation. *Scientific reports* **6**, 39520 (2016).
271. Saha, B., Kodys, K. & Szabo, G. Hepatitis C Virus-Induced Monocyte Differentiation Into Polarized M2 Macrophages Promotes Stellate Cell Activation via TGF- β . *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* **2**, 302-316.e308 (2016).
272. Ohtsuki, T. *et al.* M2 Macrophages Play Critical Roles in Progression of Inflammatory Liver Disease in Hepatitis C Virus Transgenic Mice. *Journal of virology* **90**, 300-307 (2015).
273. Bility, M.T. *et al.* Hepatitis B virus infection and immunopathogenesis in a humanized mouse model: induction of human-specific liver fibrosis and M2-like macrophages. *PLoS pathogens* **10**, e1004032 (2014).
274. Elyaman, W. *et al.* Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells. *Immunity* **36**, 623-634 (2012).
275. Jabeen, R. & Kaplan, M.H. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Current opinion in immunology* **24**, 303-307 (2012).
276. Zhou, Y. *et al.* IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 4415-4421 (2011).

277. Li, L. *et al.* Characteristics of IL-9 induced by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Scientific reports* **7**, 2343 (2017).
278. Chen, F. *et al.* mTOR Mediates IL-23 Induction of Neutrophil IL-17 and IL-22 Production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **196**, 4390-4399 (2016).
279. Taylor, P.R. *et al.* Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ and dectin-2. *Nature immunology* **15**, 143-151 (2014).
280. Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* **453**, 1051-1057 (2008).
281. Ivanov, I.I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
282. Alam, M.S. *et al.* Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4⁺ T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5943-5948 (2010).
283. Trifari, S., Kaplan, C.D., Tran, E.H., Crellin, N.K. & Spits, H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nature immunology* **10**, 864-871 (2009).
284. Veldhoen, M. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106-109 (2008).
285. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221-225 (2015).
286. Foster, R.G., Golden-Mason, L., Rutebemberwa, A. & Rosen, H.R. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Digestive diseases and sciences* **57**, 381-389 (2012).
287. Sakkas, L.I. & Bogdanos, D.P. Are psoriasis and psoriatic arthritis the same disease? The IL-23/IL-17 axis data. *Autoimmunity reviews* **16**, 10-15 (2017).
288. Yamagata, T., Skepner, J. & Yang, J. Targeting Th17 Effector Cytokines for the Treatment of Autoimmune Diseases. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis* **63**, 405-414 (2015).
289. Gaffen, S.L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature reviews. Immunology* **9**, 556-567 (2009).
290. Ramirez-Carrozzi, V. *et al.* IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nature immunology* **12**, 1159-1166 (2011).

291. Zepp, J., Wu, L. & Li, X. IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends in immunology* **32**, 232-239 (2011).
292. Luedde, T. & Schwabe, R.F. NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* **8**, 108-118 (2011).
293. Meng, F. *et al.* Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* **143**, 765-776 e761-763 (2012).
294. Kluwe, J. *et al.* Modulation of hepatic fibrosis by c-Jun-N-terminal kinase inhibition. *Gastroenterology* **138**, 347-359 (2010).
295. Zhang, J.Y. *et al.* Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **51**, 81-91 (2010).
296. Sparna, T. *et al.* Genome-wide comparison between IL-17 and combined TNF-alpha/IL-17 induced genes in primary murine hepatocytes. *BMC genomics* **11**, 226 (2010).
297. Lemmers, A. *et al.* The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* **49**, 646-657 (2009).
298. Harley, I.T. *et al.* IL-17 signaling accelerates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatology* **59**, 1830-1839 (2014).
299. Conti, P. *et al.* IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunology letters* **88**, 171-174 (2003).
300. Louis, H. *et al.* Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* **28**, 1607-1615 (1998).
301. Rutz, S., Wang, X. & Ouyang, W. The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nature reviews. Immunology* **14**, 783-795 (2014).
302. Zenewicz, L.A. & Flavell, R.A. IL-22 and inflammation: leukin' through a glass onion. *European journal of immunology* **38**, 3265-3268 (2008).
303. Wolk, K. & Sabat, R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine & growth factor reviews* **17**, 367-380 (2006).
304. Fickenscher, H. & Pirzer, H. Interleukin-26. *International immunopharmacology* **4**, 609-613 (2004).

305. Kotenko, S.V. *et al.* Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *The Journal of biological chemistry* **276**, 2725-2732 (2001).
306. Zenewicz, L.A. & Flavell, R.A. Recent advances in IL-22 biology. *International immunology* **23**, 159-163 (2011).
307. Parks, O.B., Pociask, D.A., Hodzic, Z., Kolls, J.K. & Good, M. Interleukin-22 Signaling in the Regulation of Intestinal Health and Disease. *Frontiers in cell and developmental biology* **3**, 85 (2015).
308. Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A. & Artis, D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nature immunology* **12**, 383-390 (2011).
309. Sonnenberg, G.F. *et al.* Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *The Journal of experimental medicine* **207**, 1293-1305 (2010).
310. Zenewicz, L.A. *et al.* Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* **29**, 947-957 (2008).
311. Huber, S. *et al.* IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature* (2012).
312. Nagem, R.A., Ferreira Junior, J.R., Dumoutier, L., Renauld, J.C. & Polikarpov, I. Interleukin-22 and its crystal structure. *Vitamins and hormones* **74**, 77-103 (2006).
313. Martin, J.C. *et al.* IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal immunology* **9**, 539-549 (2016).
314. Kong, X. *et al.* Interleukin-22 induces hepatic stellate cell senescence and restricts liver fibrosis in mice. *Hepatology* **56**, 1150-1159 (2012).
315. Zhao, J. *et al.* Pathological functions of interleukin-22 in chronic liver inflammation and fibrosis with hepatitis B virus infection by promoting T helper 17 cell recruitment. *Hepatology* **59**, 1331-1342 (2014).
316. Roncarolo, M.G., Gregori, S., Bacchetta, R. & Battaglia, M. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Current topics in microbiology and immunology* **380**, 39-68 (2014).

317. Katz, S.C. *et al.* Obstructive jaundice expands intrahepatic regulatory T cells, which impair liver T lymphocyte function but modulate liver cholestasis and fibrosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 1150-1156 (2011).
318. Claassen, M.A., de Knecht, R.J., Tilanus, H.W., Janssen, H.L. & Boonstra, A. Abundant numbers of regulatory T cells localize to the liver of chronic hepatitis C infected patients and limit the extent of fibrosis. *Journal of hepatology* **52**, 315-321 (2010).
319. Sziksz, E. *et al.* Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of inflammation* **2015**, 764641 (2015).
320. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A. & Hymowitz, S.G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annual review of immunology* **29**, 71-109 (2011).
321. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1875-1886 (2003).
322. Ramsdell, F. & Ziegler, S.F. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nature reviews. Immunology* **14**, 343-349 (2014).
323. Curotto de Lafaille, M.A. & Lafaille, J.J. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* **30**, 626-635 (2009).
324. Bin Dhuban, K. *et al.* Coexpression of TIGIT and FCRL3 identifies Helios+ human memory regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 3687-3696 (2015).
325. Huber, S. *et al.* Th17 cells express interleukin-10 receptor and are controlled by Foxp3(-) and Foxp3+ regulatory CD4+ T cells in an interleukin-10-dependent manner. *Immunity* **34**, 554-565 (2011).
326. Chinen, T. *et al.* An essential role for the IL-2 receptor in Treg cell function. *Nature immunology* **17**, 1322-1333 (2016).
327. Cao, X. *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635-646 (2007).
328. Okoye, I.S. *et al.* MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* **41**, 89-103 (2014).
329. Liu, Z. *et al.* Immune homeostasis enforced by co-localized effector and regulatory T cells. *Nature* **528**, 225-230 (2015).

330. Etesam, Z. *et al.* Altered Expression of Specific Transcription Factors of Th17 (RORgammat, RORalpha) and Treg Lymphocytes (FOXP3) by Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Multiple Sclerosis. *Journal of molecular neuroscience* : MN **60**, 94-101 (2016).
331. Ratajczak, P. *et al.* Th17/Treg ratio in human graft-versus-host disease. *Blood* **116**, 1165-1171 (2010).
332. Langhans, B. *et al.* Regulatory CD4+ T cells modulate the interaction between NK cells and hepatic stellate cells by acting on either cell type. *Journal of hepatology* **62**, 398-404 (2015).
333. Langhans, B. *et al.* Intrahepatic IL-8 producing Foxp3(+)CD4(+) regulatory T cells and fibrogenesis in chronic hepatitis C. *Journal of hepatology* **59**, 229-235 (2013).
334. Andolfi, G. *et al.* Enforced IL-10 Expression Confers Type 1 Regulatory T Cell (Tr1) Phenotype and Function to Human CD4+ T Cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 1778-1790 (2012).
335. Pot, C., Apetoh, L., Awasthi, A. & Kuchroo, V.K. Induction of regulatory Tr1 cells and inhibition of T(H)17 cells by IL-27. *Seminars in immunology* **23**, 438-445 (2011).
336. Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nature medicine* **19**, 739-746 (2013).
337. Fabre, T., Kared, H., Friedman, S.L. & Shoukry, N.H. IL-17A Enhances the Expression of Profibrotic Genes through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-Dependent Manner. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **193**, 3925-3933 (2014).
338. Sugimoto, R. *et al.* Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **25**, 420-428 (2005).
339. Weng, H.L. *et al.* The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. *Hepatology* **50**, 230-243 (2009).
340. Weng, H., Mertens, P.R., Gressner, A.M. & Dooley, S. IFN-gamma abrogates profibrogenic TGF-beta signaling in liver by targeting expression of inhibitory and receptor Smads. *Journal of hepatology* **46**, 295-303 (2007).
341. Dessein, A. *et al.* Interleukin-13 in the skin and interferon-gamma in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunological reviews* **201**, 180-190 (2004).

342. Li, S. *et al.* Hepatitis C virus-specific T cell-derived transforming growth factor beta is associated with slow hepatic fibrogenesis. *Hepatology* (2012).
343. Zhang, L.J., Zheng, W.D., Shi, M.N. & Wang, X.Z. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 1918-1923 (2006).
344. Zhang, L., Wang, X., Zheng, W. & Shi, M. The effects of interleukin-10 on the expression of Fas and FasL in rat hepatic stellate cells. *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* **2**, 611-616 (2006).
345. Louis, H. *et al.* Repeated concanavalin A challenge in mice induces an interleukin 10-producing phenotype and liver fibrosis. *Hepatology* **31**, 381-390 (2000).
346. Zrioual, S. *et al.* Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 3112-3120 (2009).
347. Arrese, M., Cabrera, D., Kalergis, A.M. & Feldstein, A.E. Innate Immunity and Inflammation in NAFLD/NASH. *Digestive diseases and sciences* **61**, 1294-1303 (2016).
348. Yang, L. *et al.* Transforming growth factor beta signaling in hepatocytes participates in steatohepatitis through regulation of cell death and lipid metabolism in mice. *Hepatology* **59**, 483-495 (2014).
349. Molofsky, A.B. *et al.* Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of experimental medicine* **210**, 535-549 (2013).
350. Ricardo-Gonzalez, R.R. *et al.* IL-4/STAT6 immune axis regulates peripheral nutrient metabolism and insulin sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 22617-22622 (2010).
351. Zhao, L. *et al.* Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PloS one* **6**, e18909 (2011).
352. Li, J. *et al.* Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PloS one* **7**, e39307 (2012).
353. Raychaudhuri, S.K., Saxena, A. & Raychaudhuri, S.P. Role of IL-17 in the pathogenesis of psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. *Clinical rheumatology* **34**, 1019-1023 (2015).
354. Fujita, H. The role of IL-22 and Th22 cells in human skin diseases. *Journal of dermatological science* **72**, 3-8 (2013).

355. Mehrotra, P. *et al.* IL-17 mediates neutrophil infiltration and renal fibrosis following recovery from ischemia reperfusion: compensatory role of natural killer cells in athymic rats. *American journal of physiology. Renal physiology* **312**, F385-f397 (2017).
356. Peng, X. *et al.* IL-17A produced by both gammadelta T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction. *The Journal of pathology* **235**, 79-89 (2015).
357. Lin, S., Yang, X., Liang, D. & Zheng, S.G. Treg cells: a potential regulator for IL-22 expression? *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 474-480 (2014).
358. Tedesco, D. *et al.* CD4+ Foxp3+ T cells promote aberrant immunoglobulin G production and maintain CD8+ T-cell suppression during chronic liver disease. *Hepatology* **65**, 661-677 (2017).
359. Riezu-Boj, J.I. *et al.* Hepatitis C virus induces the expression of CCL17 and CCL22 chemokines that attract regulatory T cells to the site of infection. *Journal of hepatology* **54**, 422-431 (2011).
360. Mucida, D. *et al.* Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science (New York, N.Y.)* **317**, 256-260 (2007).
361. Huang, Z., van Velkinburgh, J.C., Ni, B. & Wu, Y. Pivotal roles of the interleukin-23/T helper 17 cell axis in hepatitis B. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* **32**, 894-901 (2012).
362. Tan, Z. *et al.* IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **191**, 1835-1844 (2013).
363. Brembilla, N.C. & Chizzolini, C. T cell abnormalities in systemic sclerosis with a focus on Th17 cells. *European cytokine network* **23**, 128-139 (2012).
364. Yan, S., Wang, L., Liu, N., Wang, Y. & Chu, Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunology and cell biology* **90**, 421-428 (2012).
365. Wilson, M.S. *et al.* Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *The Journal of experimental medicine* **207**, 535-552 (2010).
366. Nair, D.G., Miller, K.G., Lourenssen, S.R. & Blennerhassett, M.G. Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-Rbeta. *J Cell Mol Med* **18**, 444-454 (2014).

367. Wang, X. *et al.* Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* **127**, 1174-1188 (2004).
368. Yang, Y. *et al.* Histone deacetylase 9 plays a role in the antifibrogenic effect of astaxanthin in hepatic stellate cells. *The Journal of nutritional biochemistry* **40**, 172-177 (2017).
369. Kim, K. *et al.* Interleukin-22 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via MAP3K8 activation. *Carcinogenesis* **35**, 1352-1361 (2014).
370. Xue, J., Nguyen, D.T. & Habtezion, A. Aryl hydrocarbon receptor regulates pancreatic IL-22 production and protects mice from acute pancreatitis. *Gastroenterology* **143**, 1670-1680 (2012).
371. Sonnenberg, G.F., Fouser, L.A. & Artis, D. Functional biology of the IL-22-IL-22R pathway in regulating immunity and inflammation at barrier surfaces. *Advances in immunology* **107**, 1-29 (2010).
372. Donnelly, R.P., Sheikh, F., Kotenko, S.V. & Dickensheets, H. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *Journal of leukocyte biology* **76**, 314-321 (2004).
373. Chiu, Y.S., Wei, C.C., Lin, Y.J., Hsu, Y.H. & Chang, M.S. IL-20 and IL-20R1 antibodies protect against liver fibrosis. *Hepatology* **60**, 1003-1014 (2014).
374. Monteleone, I., MacDonald, T.T., Pallone, F. & Monteleone, G. The aryl hydrocarbon receptor in inflammatory bowel disease: linking the environment to disease pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology* **28**, 310-313 (2012).
375. Xue, J. *et al.* Aryl Hydrocarbon Receptor Ligands in Cigarette Smoke Induce Production of Interleukin-22 to Promote Pancreatic Fibrosis in Models of Chronic Pancreatitis. *Gastroenterology* **151**, 1206-1217 (2016).
376. Wolk, K. *et al.* IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *European journal of immunology* **36**, 1309-1323 (2006).
377. Bourbonnais, E. *et al.* Liver fibrosis protects mice from acute hepatocellular injury. *Gastroenterology* **142**, 130-139 e134 (2012).
378. Jiang, R. *et al.* Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology* **54**, 900-909 (2011).
379. Dyring-Andersen, B., Skov, L. & Zachariae, C. Targeting IL-17 with ixekizumab in patients with psoriasis. *Immunotherapy* **7**, 957-966 (2015).

380. Li, P., Zheng, Y. & Chen, X. Drugs for Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds to Anti-TNF Biologics. *Front Pharmacol* **8**, 460 (2017).
381. Withers, D.R. *et al.* Transient inhibition of ROR-gammat therapeutically limits intestinal inflammation by reducing TH17 cells and preserving group 3 innate lymphoid cells. *Nature medicine* **22**, 319-323 (2016).
382. Dapito, D.H. *et al.* Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer cell* **21**, 504-516 (2012).
383. Wang, K. & Karin, M. Tumor-Elicited Inflammation and Colorectal Cancer. *Advances in cancer research* **128**, 173-196 (2015).
384. Cochaud, S. *et al.* IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Scientific reports* **3**, 3456 (2013).
385. Kirchberger, S. *et al.* Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *The Journal of experimental medicine* **210**, 917-931 (2013).
386. Fuchs, A. & Colonna, M. Innate lymphoid cells in homeostasis, infection, chronic inflammation and tumors of the gastrointestinal tract. *Current opinion in gastroenterology* **29**, 581-587 (2013).
387. Li, P. *et al.* Th17 related cytokines in acute myeloid leukemia. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **17**, 2284-2294 (2012).
388. Lim, C. & Savan, R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine & growth factor reviews* **25**, 257-271 (2014).
389. Tournier, C. The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes Cancer* **4**, 397-400 (2013).
390. (!!! INVALID CITATION !!! 348).
391. Kryczek, I. *et al.* IL-22(+)CD4(+) T cells promote colorectal cancer stemness via STAT3 transcription factor activation and induction of the methyltransferase DOT1L. *Immunity* **40**, 772-784 (2014).

Annexe I : Contributions du candidat (publications annexes)

Author's contribution to the manuscript "Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C"

Conceived and designed the experiments: Hassen Kared (H.K.), Thomas Fabre (T.F.), Julie Bruneau (J.B.) and Naglaa Shoukry (N.H.S.). T.F. conceived and designed qPCR and gene-silencing experiments. Performed the experiments: H.K., T.F. and Nathalie Bédard (N.B.). T.F. performed qPCR and silencing experiments. Analyzed the data: H.K., T.F. (qPCR), N.B., J.B., N.H.S. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.B. and N.H.S. Wrote the paper: H.K., T.F. and N.H.S. Patient recruitment and follow-up: J.B.

Annexe II : Publications supplémentaires

Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C

(PloS Pathogens, 2013)

Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C

Hassen Kared¹, Thomas Fabre^{1,2}, Nathalie Bédard¹, Julie Bruneau^{1,3}, Naglaa H. Shoukry^{1,4*}

1 Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Hôpital St-Luc, Montréal, Québec, Canada, **2** Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, **3** Département de médecine familiale, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, **4** Département de médecine, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Abstract

Loss of CD4 T cell help correlates with virus persistence during acute hepatitis C virus (HCV) infection, but the underlying mechanism(s) remain unknown. We developed a combined proliferation/intracellular cytokine staining assay to monitor expansion of HCV-specific CD4 T cells and helper cytokines expression patterns during acute infections with different outcomes. We demonstrate that acute resolving HCV is characterized by strong Th1/Th17 responses with specific expansion of IL-21-producing CD4 T cells and increased IL-21 levels in plasma. In contrast, viral persistence was associated with lower frequencies of IL-21-producing CD4 T cells, reduced proliferation and increased expression of the inhibitory receptors T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing-molecule-3 (Tim-3), programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) on HCV-specific CD8 T cells. Progression to persistent infection was accompanied by increased plasma levels of the Tim-3 ligand Galectin-9 (Gal-9) and expansion of Gal-9 expressing regulatory T cells (Tregs). *In vitro* supplementation of Tim-3^{high} HCV-specific CD8 T cells with IL-21 enhanced their proliferation and prevented Gal-9 induced apoptosis. siRNA-mediated knockdown of Gal-9 in Treg cells rescued IL-21 production by HCV-specific CD4 T cells. We propose that failure of CD4 T cell help during acute HCV is partially due to an imbalance between Th17 and Treg cells whereby exhaustion of both CD4 and CD8 T cells through the Tim-3/Gal-9 pathway may be limited by IL-21 producing Th17 cells or enhanced by Gal-9 producing Tregs.

Citation: Kared H, Fabre T, Bédard N, Bruneau J, Shoukry NH (2013) Galectin-9 and IL-21 Mediate Cross-regulation between Th17 and Treg Cells during Acute Hepatitis C. *PLoS Pathog* 9(6): e1003422. doi:10.1371/journal.ppat.1003422

Editor: Michael Bevan, University of Washington, United States of America

Received: January 7, 2013; **Accepted:** April 30, 2013; **Published:** June 20, 2013

Copyright: © 2013 Kared et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work is supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) (MOP-106468 and HEO-115696), Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) AIDS and Infectious Disease Network (Réseau SIDA-MI) and the National Institute on Drug Abuse (NIDA) funded International Collaboration of Incident HIV and Hepatitis C in Injecting Cohorts (InC3) study (R01DA031056). HK received post-doctoral fellowships from the Université de Montréal (Bourse Michel Saucier) and CIHR, TF received a graduate student fellowship from the Université de Montréal (Foundation of Dr. Gabriel Marquis). NHS and JB hold Chercheur Boursier salary awards from the FRQS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: naglaa.shoukry@umontreal.ca

Introduction

The outcome of acute hepatitis C virus (HCV) infection towards spontaneous resolution or persistent viremia is dictated by the magnitude, breadth and quality of the virus-specific CD4 and CD8 T cell responses [1,2]. The essential role of CD4 helper T cells in mediating spontaneous viral clearance was demonstrated by several observations. First, the loss of CD4 helper T cell proliferative responses during acute HCV was associated with viral recurrence and the development of chronic infection [3,4]. Second, broad HCV-specific CD4 T cell responses are induced early in most acutely infected individuals but they undergo progressive loss of IL-2 production and diminished proliferation as infections progress towards viral persistence [5–8]. Third, CD4 T cell depletion in the chimpanzee model of HCV infection led to persistent low level viremia, the loss of CD8 function and the development of escape mutations in targeted CD8 cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes [9]. These observations strongly suggest that CD4 helper T cells are critical in sustaining the functions of HCV-specific CD8 T cells. However, the underlying helper signals and the mechanisms of CD4 T cell failure remain elusive.

T cell exhaustion has been proposed as a mechanism underlying the dysfunction of HCV-specific CD4 and CD8 T cells during acute infection. The over-expression of inhibitory receptors like T cell immunoglobulin and mucin-domain-containing-molecule-3 (Tim-3), programmed death 1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and 2B4 was observed on HCV-specific CD8 T cells in the blood and liver of individuals developing chronic HCV infection (reviewed in [10]). Blockade of these inhibitory pathways restored proliferation and cytokine production by HCV-specific CTLs [10]. The differential level of expression of these inhibitory receptors on virus-specific T cells and their respective ligands in certain tissues may contribute to various levels of exhaustion. For example, higher levels of exhaustion and apoptosis are observed in the liver where greater levels of the PD-1 ligand-1 (PDL-1) and the Tim-3 ligand Galectin-9 (Gal-9) are expressed [11–16]. Using MHC class II tetramers, Raziorrouh et al. have observed the increased expression of PD-1 and CTLA-4 on virus-specific CD4 T cells from patients with chronic HCV infection [17]. Blocking the PD-1 pathway restored the proliferation of HCV-specific CD4 helper T cells and the production of the Th1 cytokines interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor

Author Summary

In this study, we investigated the mechanisms underlying failure of the CD4 helper T cell response during acute hepatitis C infection. We demonstrate that this failure is primarily due to loss of IL-21-producing CD4 T cells in individuals who progress towards chronic infection. This is accompanied by exhaustion of virus-specific cytotoxic CD8 T cells through upregulation of the exhaustion markers Tim-3, PD-1 and CTLA-4, higher plasma levels of the Tim-3 ligand Galectin-9 (Gal-9) and increased frequency of Gal-9 producing regulatory T cells (Tregs). *In vitro* supplementation with IL-21 rescued HCV-specific CD8 T cells from Gal-9 induced apoptosis. Blocking Gal-9 expression in Tregs restored IL-21 production by virus-specific CD4 helper T cells. Altogether, our results suggest that failure of CD4 T cell help during acute HCV may be partially mediated by an imbalance between IL-21-producing CD4 T cells and Treg cells whereby exhaustion of both CD4 and CD8 T cells through the Tim-3/Gal-9 pathway is counteracted by IL-21.

alpha (TNF- α) [17]. Whether this exhausted phenotype affects the production of other helper cytokines and mediators of CD4 T cell help was not investigated.

Other possible mechanisms of T cell failure include inhibition of proliferation by Tregs or imbalance between the different CD4 helper T cell subsets (e.g. Th1, Th2, Th17) during the progression of HCV infection. Increased Treg frequencies were observed in chronic HCV infection [18,19]. Tregs can have a direct inhibitory effect on virus-specific CD4 and CD8 T cells through production of the immuno-modulatory cytokines IL-10 and transforming growth factor beta (TGF- β) [17] or through expression of Gal-9 as observed during human immunodeficiency virus (HIV) infection [20]. Another subset that has become increasingly important is Th17 cells that produce a variety of cytokines including IL-17A, IL-21 and IL-22. IL-17A-producing CD4 and CD8 T cells are highly enriched in the liver [21–23] and HCV-specific Th17 cells were detected in the peripheral blood during chronic HCV infection [24]. In addition, a temporal association was observed between increased virus-specific IL-17 responses and spontaneous recovery from recurrent hepatitis C in a liver transplant recipient [25]. Th17 cells were also associated with the control of several bacterial and viral infections [26] and are a potential source of IL-21 that has been recently identified as a major helper cytokine during chronic viral infection. Studies in the mouse model of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) have demonstrated that IL-21 is required to sustain proliferation and effector functions of virus-specific CD8 T cells [27–29]. Similarly, data from HIV-infected individuals have demonstrated that IL-21 is associated with viral control and slower disease progression [30–32]. However, the role of Th17 cells and that of IL-21 as a helper cytokine during acute HCV infection were not studied.

In this study, we performed a longitudinal analysis of CD4 helper T cell function and interaction between CD4 and CD8 T cells during acute HCV infection in individuals with spontaneous resolution vs persistent viremia. We specifically focused on IL-21 producing Th17 cells and the means by which Tregs control helper activity of CD4 T cells. We demonstrate a delicate balance between IL-21-producing Th17 cells and Gal-9 producing Tregs. This balance may favor either exhaustion or survival of HCV-specific CD4 and CD8 T cells during acute HCV infection.

Results

Preferential expansion of virus-specific IL-21-producing Th17 cells during acute resolving HCV

The first goal of this study was to longitudinally examine and compare the magnitude and functional profile of HCV-specific CD4 T cells during acute HCV infections with different outcomes. However, the very low frequency of virus-specific CD4 T cells and the limited availability of HCV MHC class II tetramers prevented us from performing direct *ex vivo* analysis of these cells. Thus, we developed an assay combining carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) proliferation and intracellular cytokine staining (ICS) to determine the cytokine profile of HCV-specific CD4 T cells (Supplementary Figure S1A). This is a qualitative rather than a quantitative assay that provides a general overview of the quality and function of HCV-specific CD4 T cells during different stages of infection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were depleted of CD25⁺ cells before stimulation to limit inhibition of antigen-specific proliferation by Tregs and facilitate detection of HCV-specific T cells activated during the *in vitro* stimulation. Treg-depleted-PBMCs from HCV patients were labelled with CFSE and stimulated with HCV recombinant proteins in a standard 6 day CFSE proliferation assay as described in Materials and Methods and Supplementary Figure S1A. Virus-specific CD4 T cells were identified by the dilution of CFSE staining coupled with the up-regulation of CD25, used as an early activation marker. FACS plots from a representative proliferation assay are presented in Supplementary Figure S1B. At the end of the proliferation on day 6, cells were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin in a standard ICS assay to reveal their cytokine profile by gating on proliferating (CFSE^{low}) cells. Due to the fact that proliferation and PMA/ionomycin induce down-modulation of CD4, HCV-specific CD4 T cells were defined by gating on CD3⁺CD8^{neg} T cells and examining the cytokines produced by CFSE^{low} cells. We monitored the production of the Th1 cytokine: IFN- γ and TNF- α as well as the Th17 cytokines IL-17A and IL-21. Representative FACS analysis plots for the ICS assay are presented in Supplementary Figure S2.

We used this CFSE/ICS assay to examine the functional profile of HCV-specific CD4 T cells in a cohort of injection drug users (IDUs) during acute HCV infection progressing towards either spontaneous resolution (SR) or chronic infection (CI). Patients were recruited and followed as described in Materials and Methods. A summary of the patients' characteristics and demographics is presented in Table 1. Two time- points were tested: i) early acute phase (10 wks \pm 1 wk post estimated date of infection (PEI)) and ii) late acute phase of infection (30 wks \pm 6 wks PEI). As previously described [4,33–35] NS3- and NS4-specific proliferative responses were significantly higher in SR than CI patients during early acute HCV infection (Supplementary Figure S1C). Examining the cytokine profile of HCV-specific CD4 T cells demonstrated specific expansion of Th17 (IL-17A- and IL-21-producing) and Th1 (IFN- γ - and TNF- α - producing) cells in SR patients as compared to CI patients in response to stimulation with NS3 and NS4 during both early and late acute infection (Figure 1).

To validate the Th17 lineage of the IL-17A- and IL-21-producing CD4 T cells, we monitored the overall expansion of Th17 cells defined as CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺ [36,37]. We observed a specific increase in the frequency of Th17 cells in SR patients (SR median value = 13.25%, pre-infection median value = 6.18% (p < 0.0001)), but not in CI patients or patients with long-term chronic HCV (CI median value = 6.315%, chronic HCV median value = 4.89% (p = 0.0006)) (Supplementary Figure S3A). We then sorted CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺ CD4 T cells from

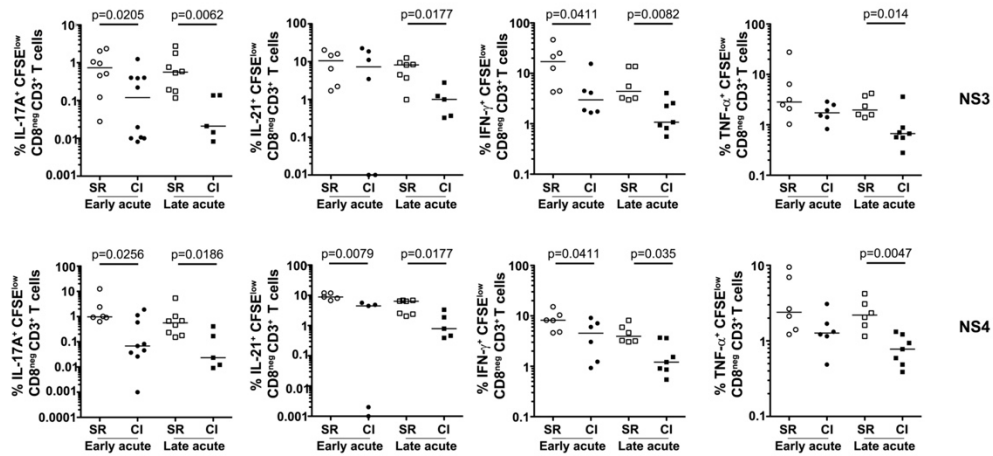


Figure 1. Increased frequency of NS3 and NS4-specific CD4 T cells producing Th17 and Th1 cytokines during acute resolving HCV. CD25-depleted PBMC from patients with acute HCV infection (SR or CI) were stained with CFSE and stimulated with 1 μ g/ml of HCV-recombinant proteins (NS3 or NS4). After 6 days of culture, cells were washed and re-stimulated with PMA/ionomycin as described in Materials and Methods to reveal the cytokine profile by ICS. Cells were gated on viable CD3⁺CD8⁺CD3⁺ T cells to define the percent of IL-17A⁺, IL-21⁺, IFN- γ ⁺ or TNF- α ⁺-producing CFSE^{low} cells. Data is presented as percent specific cytokine production after subtraction of background corresponding to un-stimulated cells. Samples from SR (n = 8-5) and CI (n = 10-5) patients were studied. Samples were not available for some patients at every time point or exhibited low proliferation. Samples from five SR and five CI patients were examined at all the time points tested. P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test.

doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g001

the peripheral blood of long-term HCV spontaneous resolvers or chronic patients (Supplementary Figure S3B) and the examined the expression of the Th17 lineage-specific transcription factors RORc and c-MAF (Supplementary Figure S3C). RORc was highly expressed in CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺ CD4 T cells as compared to the CD161^{neg} CD4 T cells thus validating their Th17 lineage. However, c-MAF mRNA was specifically up-regulated in Th17 cells from resolvers (Supplementary Figure S3C). CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺ CD4 T cells expressed significantly higher levels of IL-17A and IL-21 as compared to CD161^{neg} CD4 T cells upon stimulation with PMA/ionomycin (data not shown). Altogether, these results confirm the specific expansion of IL-17A⁺IL-21⁺ Th17 CD4 T cells during acute resolving HCV. This is the first description of HCV-specific Th17 cells during acute HCV infection and suggests that these cells and the cytokines they produce may play an important role in spontaneous clearance of HCV.

Specific increase in plasma levels of IL-21 during the late acute phase in acute resolving HCV

In order to assess the role of Th17 cytokines during acute HCV infection, we monitored levels of IL-17A and IL-21 in the plasma of acute HCV patients. SR patients (n = 12) were characterized by an early Th17 response (Figure 2A). Plasma levels of IL-17A were significantly higher at the early acute time point (median value = 23.1 pg/ml) in comparison to healthy donors (HD) (n = 18, p = 0.0001), or to CI patients (n = 14, p = 0.0055). Plasma IL-17A levels remained elevated in SR patients during the late acute phase of HCV infection (median value = 23.9 pg/ml, n = 8), as compared to healthy donors (p = 0.002) and to CI patients (p = 0.0274, n = 9). IL-21 displayed a different pattern of expression. Plasma levels were comparable in SR (n = 12) and CI patients (n = 22) during the early acute phase but increased significantly during the late acute phase in SR patients (median

Table 1. Characteristics and demographics of HCV patients studied.

Patient group	Number	Male Gender (%)	Median Age (range)	Genotype 1/3/ND ^a	Mean estimated time post infection at recruitment (days)
Acute→Spontaneous Resolution (SR)	13	10/13 (77)	29 (20–43)	4/3/6	43.4
Acute→Chronic evolution (CI)	24	21/24 (87)	30 (18–48)	14/9/1	43.2
HCV Resolver (R)	8	7/8 (87)	42 (24–50)	ND ^a	N/A ^b
HCV Chronic (C)	27	22/27 (81)	37 (20–60)	ND ^a	ND ^a

^aND: Not determined.

^bN/A: Not applicable.

doi:10.1371/journal.ppat.1003422.t001

value = 212 pg/ml, $n=21$) as compared to CI patients (median value = 79.1 pg/ml, $p=0.0007$, $n=19$) and healthy donors (median value = 95 pg/ml, $p=0.0026$, $n=17$) (Figure 2A). This is consistent with results in the literature suggesting that IL-21 is more crucial during the memory than the primary phase of antiviral responses [27–29].

Plasma IL-21 levels correlate with the frequency of HCV-specific CD8 T cells

IL-21 can exert its helper effect through enhancing survival and proliferation of virus specific-CD8 T cells and preventing their exhaustion and/or apoptosis by persistent antigenic stimulation. Hence, we examined if the enhanced production of IL-21 during acute HCV influences the frequency of HCV-specific CD8 T cells. Indeed, we could establish a positive correlation between the plasma levels of IL-21 and the frequency of HCV-specific CD8 T cells detected by a panel of 7 MHC class I tetramers ($n=28$; $r=0.49$ and $p=0.0053$) (Figure 2B). These results suggest that IL-

21 provides some form of help in the maintenance of virus-specific CD8 T cell responses during acute HCV.

Different patterns of HCV-specific CD8 T cell exhaustion

Several studies have previously demonstrated that HCV-specific CD8 T cells up-regulate the expression of different exhaustion markers including PD-1, Tim-3 and CTLA-4 during persistent viral replication and progression towards chronic infection. Expression of such markers and their different combinations were associated with different levels of functional impairment in the antiviral properties of HCV-specific CD8 T cells [16,38,39]. To evaluate the role of IL-21 in modulating T cell exhaustion, we first sought to determine the combined expression profile of the exhaustion markers PD-1, Tim-3, CTLA-4 and the memory marker CD127 on virus-specific CD8 T cells directly *ex vivo* during acute HCV ($n=9$). Based on the levels of Tim-3 expression we were able to define three distinct patterns: Tim-3^{neg} for no exhaustion Tim-3^{low} for partial exhaustion and Tim-3^{high} for a

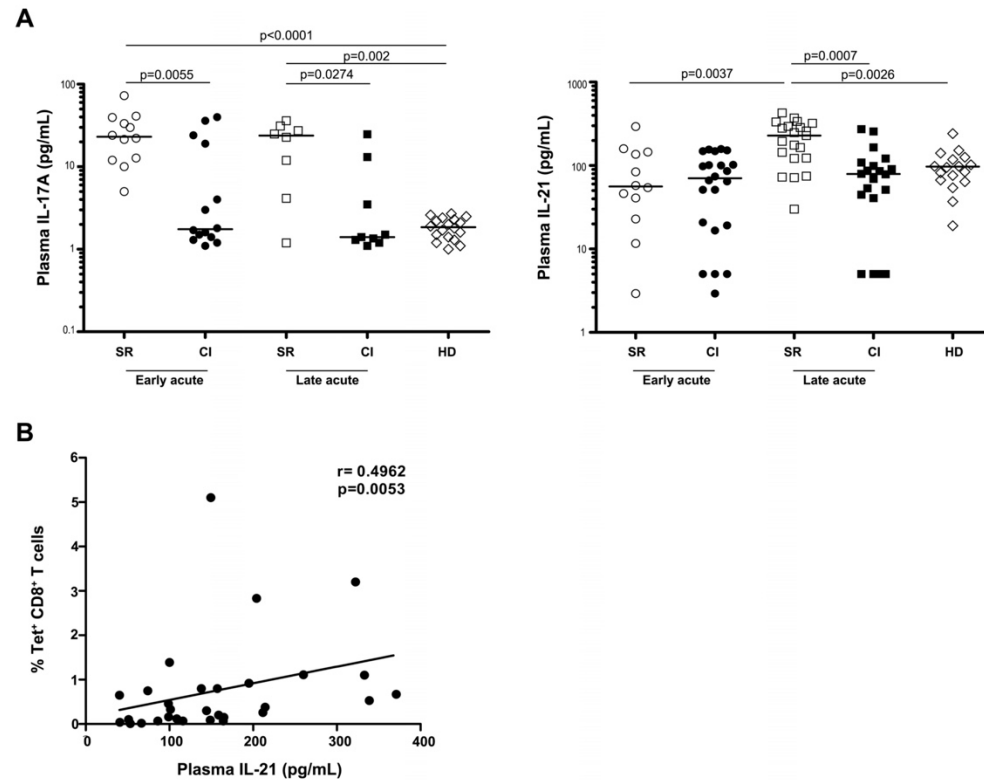


Figure 2. Plasma levels of IL-21 correlate with frequency of HCV-specific CD8 T cells. (A) Increased plasma levels of IL-21 during acute resolving HCV. Plasma levels of the Th17 cytokines IL-17A and IL-21 were measured by ELISA at the indicated time points in SR ($n=8-12$) and CI ($n=8-22$) patients or healthy donors (HD) ($n=17$). (B) Frequency of HCV-specific CD8 T cells correlates with plasma IL-21 levels. The frequency of HCV-specific CD8 T cells was measured using the following HLA class I tetramers (A1/NS3-1436, A2/NS3-1073, A2/NS3-1406, A2/NS5b-2594, B7/Core-41, B8/NS3-1395 and B27/NS5b-2841) and IL-21 levels were measured in paired plasma samples from 28 acute HCV patients. Correlation was tested using the Spearman correlation test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g002

fully exhausted phenotype. Tim-3^{neg} cells were mostly detected in SR patients (n = 4) and were found to be negative for the exhaustion markers PD-1 and CTLA-4 but expressed high levels of the memory marker CD127, associated with poly-functional T cells [40]. In contrast, Tim-3^{low} and Tim-3^{high} cells were detected in CI patients during acute HCV (n = 7). Tim-3^{low} cells were PD-1^{high}CTLA-4^{neg} and expressed intermediate levels of CD127. Tim-3^{high} CD8 T cells were PD-1^{high}CTLA-4^{high} but CD127^{neg} (Figure 3A). These diverse expression patterns suggest different exhaustion statuses based on the increased expression of Tim-3, PD-1 and CTLA-4 and the reduced expression of CD127. Indeed, we observed a reduction in the proliferative capacity of HCV-specific cells in response to cognate HCV peptides with increased expression of Tim-3 (Supplementary Figure S4). Given that the frequency of HCV-specific T cells correlated with plasma levels of IL-21, we hypothesized that IL-21 may preserve the functions and limit the exhaustion of HCV-specific T cells and enhance their survival. We examined the correlation between the frequency of exhausted T cells (PD-1⁺Tim-3⁺HCV-tetramer⁺ CD8 T cells) and the plasma levels of IL-21. We established a negative correlation between these two parameters (Figure 3B, p = 0.0005, n = 11). This suggests that the frequency and the functionality of HCV-specific CD8 T cells may be dependent on IL-21, a T-helper cytokine.

Increased plasma levels of the Tim-3 ligand Galectin-9 during acute HCV

Tim-3 has recently emerged as a major determinant of the functional status of HCV-specific T cells [16,39]. The inhibitory effect of Tim-3 during the majority of chronic viral infections is dependent on interaction with its main ligand Gal-9 [15,20,41,42]. Consequently, we decided to quantify the levels of Gal-9 in plasma during acute HCV infections with different outcomes. Gal-9 was specifically higher in CI (n = 13) as compared to SR (n = 11) patients during the early and late acute phases of HCV (p = 0.0009 and p = 0.0277, respectively) or as compared to healthy donors (n = 10, p < 0.0001). Gal-9 was also significantly elevated in the plasma of long-term HCV chronic patients (n = 8) as compared to healthy donors (p = 0.0003) (Figure 3C).

Expansion of Galectin-9-expressing CD39⁺ Tregs during acute HCV with chronic evolution

To further dissect the mechanisms contributing to the loss of the helper T cell response and, consequently, the inhibition of the CD8 T cell antiviral function, we examined the specific emergence of suppressive Tregs during acute HCV infections progressing to chronicity. First, we examined the frequency of peripheral CD4⁺ Tregs using the classical markers CD25^{high} CD127^{low} and FoxP3⁺. We observed a higher frequency of Tregs in CI patients during the late acute phase of HCV (n = 9) as compared to pre-infection (p = 0.0077, n = 12), SR (p = 0.0206, n = 8) and long-term chronic HCV patients (p = 0.0301, n = 28) (Figure 4A). In depth phenotypic characterization demonstrated an increase in the frequency of Tregs co-expressing CTLA-4 and the ecto-enzyme CD39 in CI patients during the late acute phase of HCV infection (p = 0.0491 *vs* pre-infection; p = 0.0104 *vs* SR and p = 0.0019 *vs* HD) (Figure 4B). As previously described, this subset of Tregs possesses a high suppressive potential, notably the inhibition of Th17 cells [43]. Thus, we sought to determine if the Treg/Th17 ratio is altered during acute HCV infection as observed during simian immunodeficiency virus (SIV) infection [44]. An imbalance in the ratio of CD39⁺ CTLA-4⁺ Tregs and of CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺

CD4 T cells was observed during late acute HCV infection (Figure 4C, p = 0.0006, n = 8 for SR and CI patients).

Recent data in HIV patients has demonstrated that Tregs can be a source of Gal-9 production [20]. Given the expansion of CD39⁺ Tregs and the increase in plasma levels of Gal-9 in CI patients, we hypothesized that this subset may be a source of Gal-9 in CI patients. To test our hypothesis, CD39⁺ and CD39^{neg} Tregs from chronic HCV patients were sorted by FACS. The quantification of gene expression by real-time PCR demonstrated that CD39⁺ Tregs (grey symbols) expressed higher levels of Gal-9 than CD39^{neg} Tregs (black symbols) in chronic HCV patients (p = 0.0007, n = 10) (Figure 4D). Furthermore, we established a positive correlation between the expression of Gal-9 and the mean fluorescence intensity (MFI) of FoxP3 (p = 0.004) and CTLA-4 (p < 0.0001) (Figure 4E). In summary, we observed a strong association between expression of CTLA-4, CD39 and Gal-9 in FoxP3⁺ Tregs. This was coupled with the expansion of this T cell population during late acute HCV with a chronic evolution and the temporal decrease in HCV-specific Th17 cells in the same patients. These two observations suggest a fine balance between inflammatory and regulatory cells that may influence the outcome of the infection.

Exhaustion as a potential mechanism for failure of IL-21-producing HCV-specific CD4 helper T cells

We have demonstrated that progression to chronic HCV infection is associated with a shift from Th1/Th17 virus-specific CD4 T cells to Gal-9-expressing Tregs. This led to a failure in the maintenance of CD4 T cells which produce a key helper cytokine, IL-21. This prompted us to investigate if the reduced frequency of IL-21 producing Th17 cells and therefore, the reduced levels of IL-21 in the plasma could be the mechanism restricting CD4 T cell help in acute infections with chronic evolution. IL-21 production could be limited directly through exhaustion of IL-21 producing Th17 cells or indirectly through modulation of Th17 cell function and cytokine producing capacity by inhibitory Tregs. Given that the exhaustion of HCV-specific Th17 cells could not be evaluated directly *ex vivo* because of a lack of appropriate HCV MHC class II tetramers, we investigated whether IL-17A and/or IL-21 could be restored upon the blockade of several inhibitory pathways in 6 patients during the late acute phase of HCV infection (30 wks ± 6 wks PEI). As described above, we used the combined CFSE/ICS assay to monitor the restoration in proliferation and to determine the functional profile of HCV-specific CD4 T cells following stimulation with the HCV NS4 antigen in the presence of isotype control antibodies or of neutralizing antibodies directed against PD-L1, CTLA-4 and Tim-3. We used this triad of blocking molecules to optimize the functional restoration of exhausted T cells. At the end of the 6 days CFSE proliferation assay, cells were stimulated with PMA/ionomycin to assess the intracellular production of cytokines. The restoration in cytokine production upon blockade of the inhibitory pathways is depicted in Figure 5A. Blocking the inhibitory pathways slightly enhanced the proliferation of HCV-specific CD4 T cells in response to NS3 and NS4 (data not shown). Nevertheless, this blockade led to a significant increase in the percent of NS4-specific proliferating T cells which produce the Th17 cytokines, IL-17A and IL-21 (p = 0.0078 and p = 0.0039, respectively) (Figure 5B) and the Th1 cytokines, IFN-γ and TNF-α (p = 0.0078 and p = 0.0039, respectively) (Figure 5C). Similar results were observed upon NS3 stimulation (data not shown). Restoration was also tested in an additional group of 6 patients who had HCV-specific CD4 responses during the early acute phase that became undetectable during the late acute phase.

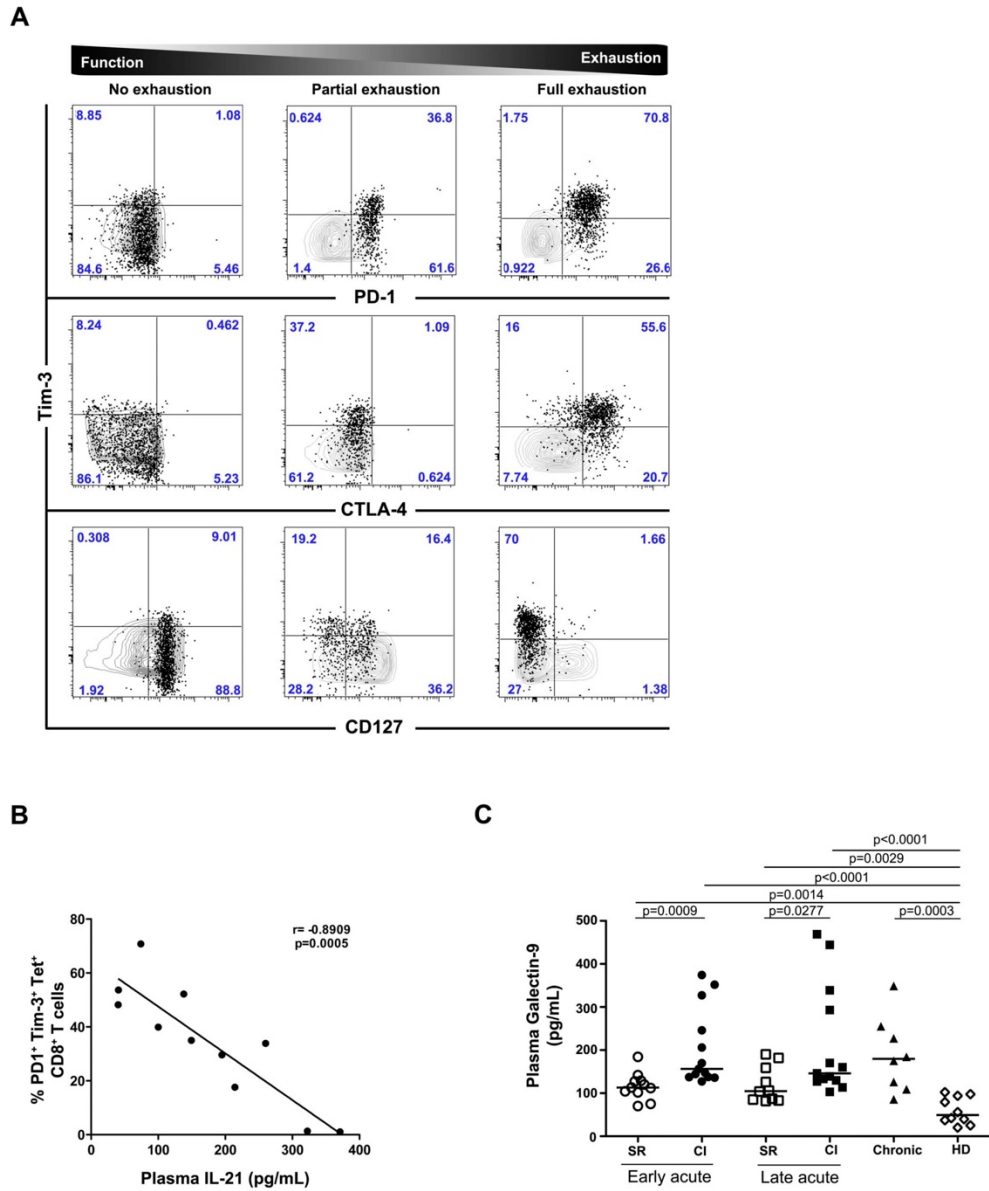


Figure 3. Exhaustion of HCV-specific CD8 T cells and increased Galectin-9 levels during acute HCV with chronic evolution. (A) Level of expression of Tim-3 defines differential exhaustion statuses of HCV-specific CD8 T cells during acute infection. Expression of PD-1, CD127, CTLA-4 and Tim-3 on HCV tetramer⁺ (dot plot) or total CD8 T cells (contour plot) in SR (at day 22, left) or in CI patients (at days 62 and 51, middle and right, respectively). Data are representative of 11 different patients analyzed corresponding to all 3 categories. (B) Exhaustion of HCV-specific CD8 T cells correlates negatively with plasma IL-21 levels. The co-expression of PD-1 and Tim-3 at the surface of HCV-specific CD8 T cells was measured using the panel of 7 HCV HLA class I tetramers and IL-21 levels were measured in paired plasma samples from 11 acute HCV patients as described in Materials and Methods and Figure 2. Correlation was tested using the Spearman correlation test. (C) Increased Galectin-9 levels in plasma during acute HCV

infection with chronic evolution. Gal-9 was quantified in plasma by ELISA at the indicated time points during acute HCV infection in SR (n = 11) and CI (n = 13) patients, long-term chronic HCV patients (n = 8) or healthy donors (HD) (n = 10). P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g003

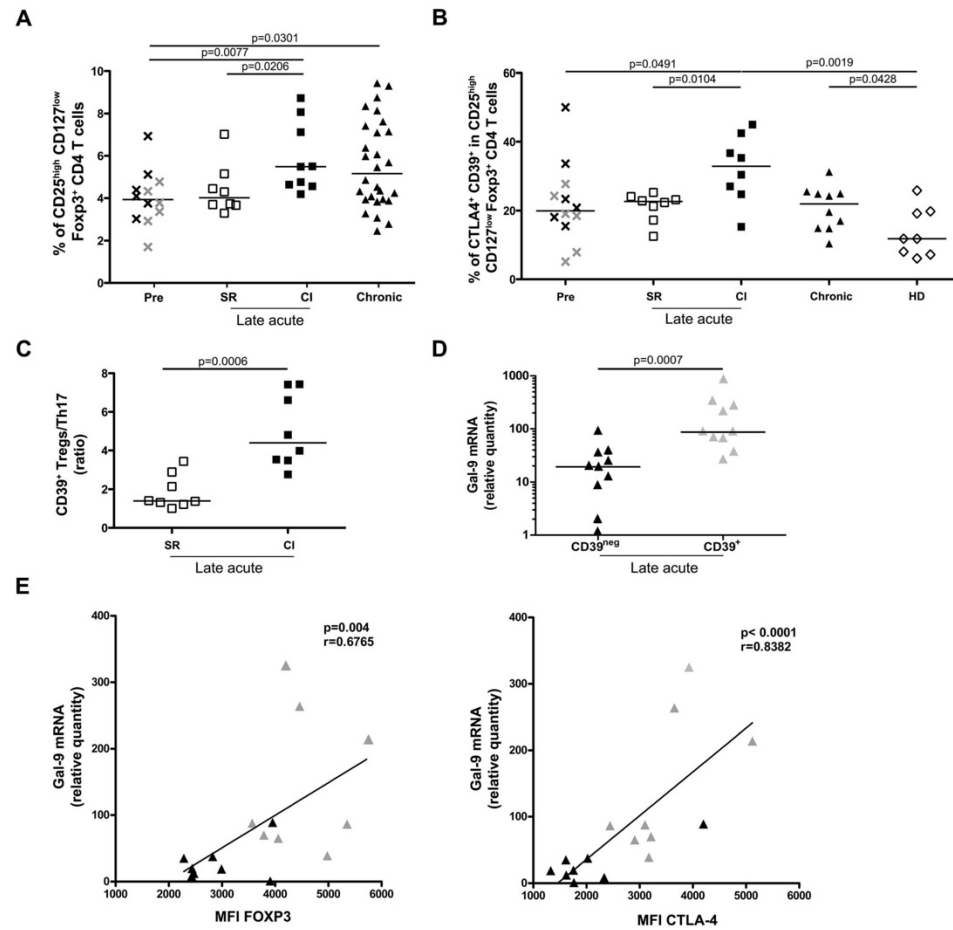


Figure 4. Expansion of Gal-9⁺ Tregs during acute HCV infection with chronic evolution. (A) Increased frequency of Tregs in CI patients during late acute HCV. Regulatory T cells were identified *ex vivo* as CD127^{low}CD25^{high}FoxP3⁺ CD4 T cells in PBMCs from HCV patients at pre-infection (n = 12, grey symbols represent SR and black symbols represent CI), late acute (n = 8 for SR, n = 9 for CI) and long-term chronic HCV patients (n = 22). P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test. (B) Increased frequency of CD39⁺ CTLA-4⁺ Tregs in CI patients during late acute HCV. Tregs were defined as CD127^{low}CD25^{high}FoxP3⁺ CD4 T cells in pre-infection samples (n = 12, grey symbols represent SR and black symbols represent CI), late acute phase in SR (n = 8) and CI (n = 8) patients, long-term HCV chronic patients (n = 10) and healthy donors (n = 8). P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test. (C) Imbalance between CD39⁺CTLA-4⁺ Tregs and Th17 cells during acute HCV infection. The ratio between the frequencies of CD39⁺CTLA-4⁺ Tregs and CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺ CD4 T cells was calculated during late acute HCV infection in SR and CI patients (n = 8). P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test. (D) CD39⁺ Tregs express Galectin-9 in HCV infected patients. Gal-9 mRNA expression in CD39⁺ (grey triangles) and CD39^{neg} (black triangles) FACS-sorted Tregs from HCV patients was measured by real-time PCR and normalized to 18S mRNA expression. Relative expression was calculated relative to the expression of *LGALS9* in FACS-sorted CD127^{high}CD25^{neg}CD4 T cells (purity > 98%). Gal-9 mRNA expression was higher in CD39⁺ than CD39^{neg} Tregs (p < 0.01) (n = 10). P-values were calculated using a two-tailed Mann Whitney U test. (E) CD39⁺ CTLA-4⁺ Tregs express the highest levels of Galectin-9. CD39⁺ (grey triangle) and CD39^{neg} (black triangle) Tregs were sorted from chronic HCV patients (n = 8) and stained for expression of FoxP3 and CTLA-4. Gal-9 mRNA expression in sorted cells was evaluated by real-time PCR and normalized to 18S mRNA expression. Relative expression was calculated relative to expression of *LGALS9* in FACS-sorted CD127^{high}CD25^{neg}CD4 T cells (purity > 98%). Correlation with FoxP3 and CTLA-4 expression was performed using Spearman correlation test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g004

Neutralizing the inhibitory pathways did not restore proliferation or cytokine production by CD4 T cells in this group suggesting that immune restoration is dependent on the maintenance of a minimal frequency of HCV-specific T cells (data not shown). Altogether, these data suggest that HCV-specific Th17 cells are exhausted during acute HCV with chronic evolution and that there is a narrow window of opportunity where exhaustion can be reversed via interference with the implicated inhibitory pathway(s).

IL-21 rescues proliferation of exhausted HCV-specific CD8 T cells

To confirm the key helper role of IL-21 during acute HCV, we investigated whether exogenous supplementation of IL-21 can rescue the proliferative capacity of exhausted HCV-specific T cells. The addition of IL-21 to a 6 day proliferation assay stimulated with the cognate HCV peptide led to a significant expansion of tetramer-positive cells in all patient samples collected at the early acute time point ($n = 7$; $p = 0.0379$). Although IL-21 enhanced proliferation of all HCV-specific CD8 T cells, its effect was more prominent on Tim-3^{low} and Tim-3^{high} cells (Figure 6A).

IL-21 rescues HCV-specific CD8 T cells from Galectin-9 induced apoptosis

We have demonstrated that HCV-specific CD8 T cells can develop different levels of exhaustion according to the level of expression of Tim-3. Furthermore, we demonstrated that progression to chronic HCV-infection is associated with lower plasma levels of IL-21, increased Gal-9 and increased frequencies of Gal-9 expressing Tregs. Gal-9 can induce apoptosis of T cells upon interaction with its ligand Tim-3 [41] and may thus contribute to the inhibition of Tim-3⁺ HCV-specific CD8 T cells. So, we hypothesized that IL-21 may rescue HCV-specific cells from Gal-9-induced apoptosis. The anti-apoptotic effect of IL-21 was tested during a short-term exposure of HCV-specific T cells expressing different levels of Tim-3 to Gal-9. PBMCs collected from SR or CI patients during acute HCV ($n = 12$) were stimulated with Gal-9; the irrelevant ligand Galectin-3 (Gal-3) (used as a negative control) or Staurosporin, an inhibitor of protein kinase C (PKC) (used as a positive control). Apoptosis was assessed by examining the co-expression of Annexin-V and caspase 3 in total CD8 and HCV-tetramer⁺ T cells. Representative data of the responses from 5 patients with different patterns of Tim-3 expression (Tim-3^{high} ($n = 2$), Tim-3^{low} ($n = 2$) and Tim-3^{neg} ($n = 1$)) are shown in Figure 6B. Spontaneous apoptosis was higher directly *ex vivo* in Tim-3^{high} cells as compared to Tim-3^{low} and Tim-3^{neg} cells. Furthermore, the addition of Gal-9 but not Gal-3 triggered apoptosis in 1.13 to 77.2% (median value 26.6%) of HCV tetramer⁺ CD8 T cells from all HCV patients. Cell death was found to be more pronounced in patients with higher levels of T cell exhaustion (Figure 6B). The addition of IL-21 reduced this Tim-3 mediated apoptosis to 3.66 to 68.4% (median value 20.75%) ($p = 0.0098$), which is similar to the non-specific apoptosis induced by Gal-3 (Figure 6C). This data suggest that IL-21 may enhance the survival of HCV-specific CD8 T cells *in vivo* by down-modulation of the Gal-9/Tim-3-induced apoptosis.

Knockdown of Galectin-9 reduces Treg-mediated inhibition of IL-21 production

We have demonstrated the implication of the Gal-9/Tim-3 pathway in the functional inhibition of both HCV-specific CD4 and CD8 T cells and that IL-21 may reverse this inhibitory effect. In addition, we have demonstrated the expansion of Gal-9-expressing Tregs during acute HCV with chronic evolution. Thus,

we hypothesized that Tregs may contribute to inhibiting HCV-specific IL-21 production not only through the production of the classical Treg immuno-modulatory cytokines like TGF- β or IL-10, but also through the activation of the Gal-9/Tim-3 inhibitory pathway. In order to investigate this hypothesis, we performed a combined CFSE/ICS in the presence of regulatory T cells transfected with siRNA-specific for the Gal-9 gene (*LGALS9*) or control siRNA (scramble sequence) (Supplementary Figure S5A). The efficiency of gene knockdown was evaluated by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) after transfection with specific or scrambled siRNA (Supplementary Figure S5B). Tregs were added to the cultures at a ratio of 1:4 (Tregs:CD25-depleted PBMCs) as described by Elahi et al [20]. The addition of Tregs transfected with scrambled siRNA to cultures inhibited the proliferation of HCV-specific T cells in the samples from CI patients collected during the early acute phase. The production of IFN- γ and IL-21 by HCV-specific CD4 T cells (CD3⁺CD8^{neg}) was also reduced by nearly 80% in comparison to cultures without Tregs (Figure 7A, B). In contrast, Tregs transfected with siRNA specific to *LGALS9* reduced the Treg-mediated inhibition of HCV-specific CD4 T cells secreting IFN- γ and IL-21 ($p = 0.0391$ and $p = 0.0078$ respectively). The frequencies of HCV-specific IL-17A- and TNF- α -producing CD4 T cells, were not altered by the silencing of Gal-9. However, the number of virus-specific Th17 cells was too low in these CI patients to establish definitive conclusions.

Altogether, these data suggest that the proliferation of HCV-specific T cells secreting IL-21 may be partially controlled by Gal-9⁺CD39⁺ Tregs during acute HCV infection in CI patients. The delicate balance in frequencies between this cell subset and IL-21-producing Th17 cells may be one of the determinants of the outcome of acute HCV.

Discussion

In this study, we demonstrated an important role for IL-21 as a major helper cytokine during acute HCV infection by limiting the T cell dysfunction induced by the Gal-9/Tim-3 interaction. We have demonstrated a direct correlation between higher levels of IL-21 production and cell proliferation, as well as cell survival and the inhibition of exhaustion of HCV-specific CD8 T cells. Moreover, our results have identified three different mechanisms of CD4 helper T cell failure during acute HCV infections with chronic evolution. First, the exhaustion of HCV-specific helper T cells may lead to decreased IL-21 production and failure to sustain efficient CTL responses. Second, an imbalance between inflammatory (Th17) and regulatory (Treg) CD4 T cells may have a direct inhibitory effect on HCV-specific CTL responses. Third, we have identified CD39⁺ Tregs as a potential source of Gal-9 during chronic HCV infection and demonstrated that Gal-9-expressing Tregs can directly inhibit proliferation and IL-21 production by HCV-specific CD4 T cells. These mechanisms combined may limit CD4 T cell help, trigger exhaustion and apoptosis of HCV-specific T cells and favor virus persistence.

The helper role of IL-21 during acute HCV can be mediated through direct and indirect effects. IL-21 acts directly to prevent exhaustion [27–29], and to enhance the cytotoxic capacity of virus-specific CTLs through the up-regulation of perforin [45–47] and granulysin [48]. Also, it sustains the proliferation and survival of virus-specific memory CTLs [49] and decreases senescence and susceptibility to apoptosis through the modulation of caspase-3 expression [50]. Indirectly, IL-21 production by Th17 cells favors their development by increasing the expression of the IL-23 receptor (IL-23R) and thus enhancing the sensitivity to this Th17-polarizing cytokine [51,52]. IL-21 also inhibits the differentiation

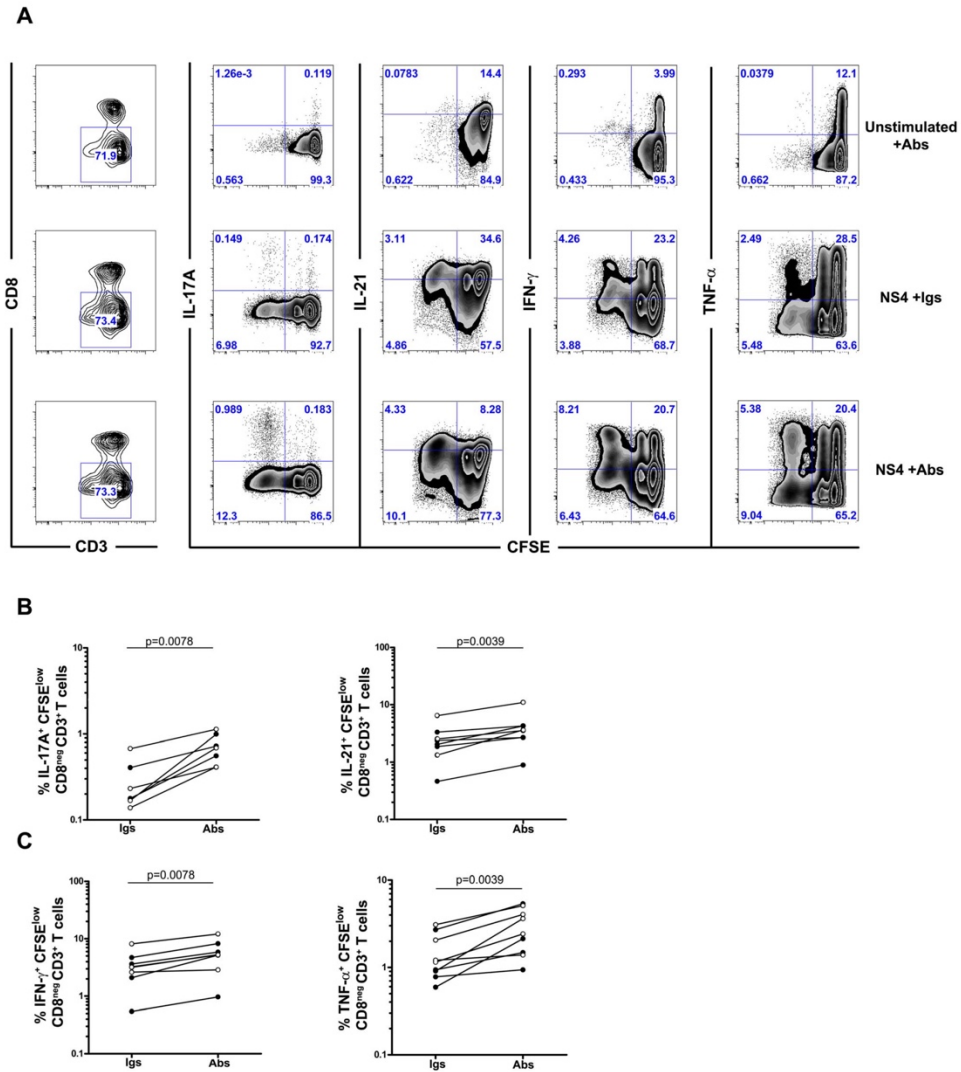


Figure 5. Restoration of HCV-specific IL-17A and IL-21 production by blocking multiple inhibitory pathways. (A) Representative FACS plot demonstrating enhanced production of Th17 and Th1 cytokines by HCV NS4-specific CD4 T cells upon antibody blockade. CD25^{neg} PBMCs from acute HCV patients were stained with CFSE and stimulated with 1 μ g/ml of HCV NS4 recombinant protein in the presence of control Igs (IgG1, Ig2a) or blocking antibodies against PD-L1, CTLA-4 and Tim-3 (10 μ g/ml each). After 6 days of culture, cells were washed and re-stimulated with PMA/ionomycin to detect production of Th17 (IL17A, IL-21) and Th1 (IFN- γ and TNF- α) cytokines by ICS as described in Materials and Methods. Cells are gated on CD3⁺CD8^{neg} lymphocytes (left panels). (B, C) Enhanced cytokine expression upon antibody blockade in the SR (open symbols, n = 3–5) and CI patients (closed symbols, n = 3–5). Data is represented as percent cytokine expressing CFSE^{low} cells within the CD3⁺CD8^{neg} lymphocyte gate. P-values were calculated using Wilcoxon signed rank test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g005

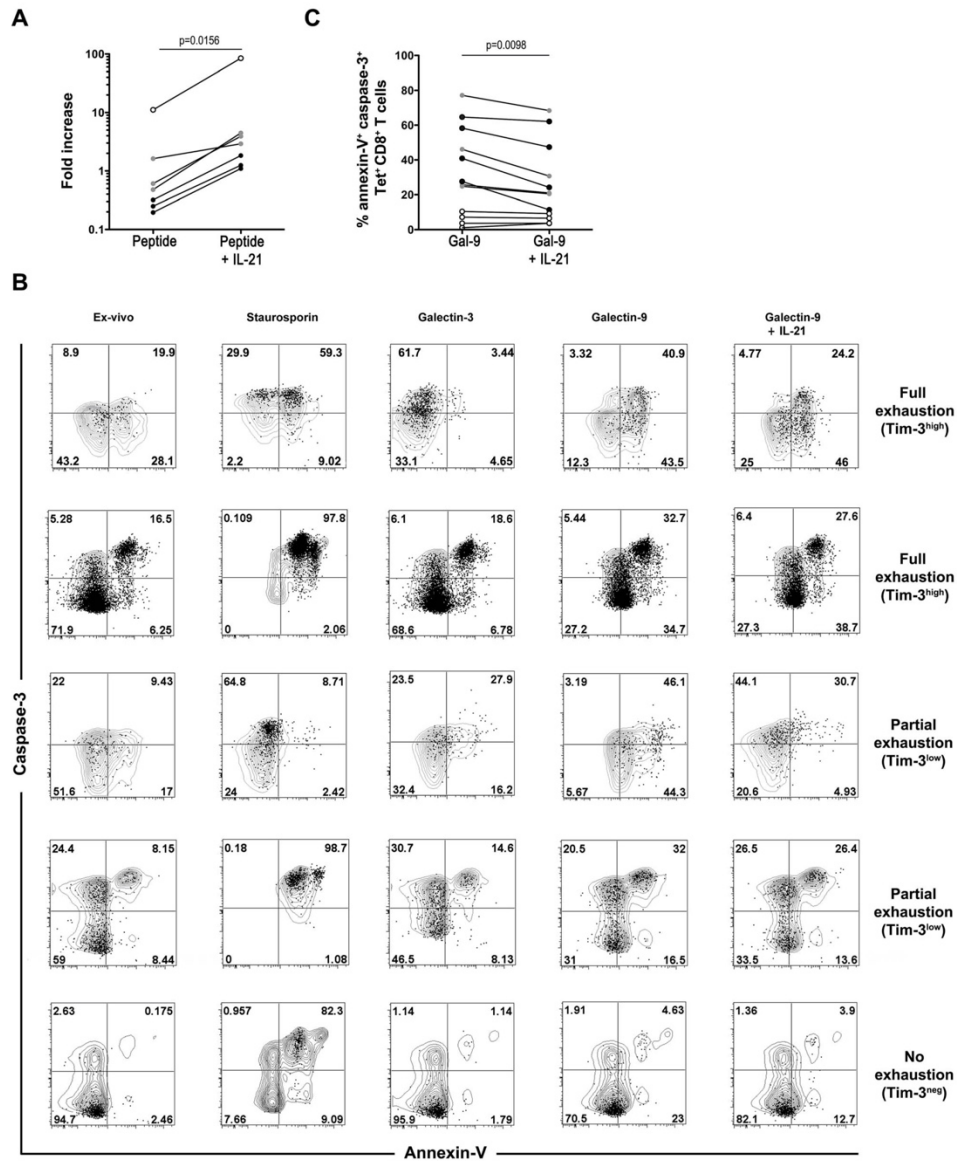


Figure 6. IL-21 enhances proliferation and limits Galectin-9 induced apoptosis in Tim-3^{high} HCV-specific CD8 T cells. (A) IL-21 enhances expansion of HCV-specific CD8 T cells in a Tim-3-dependent manner. PBMCs from acute HCV patients were stimulated with their cognate peptide epitopes corresponding to the HCV MHC class I tetramers used, in the presence or absence of IL-21. Patients were classified according to Tim-3 expression on HCV tetramer⁺ CD8⁺ T cells as: Tim-3^{neg} (open circles), Tim-3^{low} (grey circles) and Tim-3^{high} (closed circles). Fold expansion was calculated by dividing the frequency of HCV tetramer⁺ CD8⁺ T cells after *in vitro* expansion by the frequency measured directly *ex vivo*. P-values were calculated using Wilcoxon signed rank test. (B) IL-21 counteracts Galectin-9-induced apoptosis. PBMCs were incubated for 4 hours in the presence of Staurosporin (1 μ M), a protein kinase C (PKC) inhibitor (used as a positive control for induction of apoptosis), Gal-3 (negative control) or Gal-9 (1 μ M), in the presence or absence of IL-21. Cells were then stained with HCV tetramers and antibodies against cell surface markers. Apoptosis was measured by surface staining with Annexin V followed by fixation and permeabilization, before intracellular staining for caspase-3. Representative data of

PBMCs from patients during acute HCV expressing high (top), low (middle) or negative (bottom) levels of Tim-3 on the surface of HCV-tetramer+ CD8 T cells and corresponding to different levels of exhaustion as described in Figure 3 (n = 2 for full exhaustion, n = 2 for partial exhaustion, and n = 1 for no exhaustion). Patients tested were all in the early acute phase (day 22–124). (C) IL-21 counteracts Galectin-9-induced apoptosis of HCV-specific CD8 T cells. Gal-9-induced apoptosis in the presence or absence of IL-21 was measured by the co-expression of caspase-3 and Annexin V on HCV-specific tetramer+ CD8 T cells expressing different levels of Tim-3 during early acute HCV infection (day 22–124) (n = 12) as described in Figure 6B. Tim-3^{neg} (open circles), Tim-3^{low} (grey circles) and Tim-3^{high} (closed circles). P-values were calculated using Wilcoxon signed rank test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g006

of Tregs by interfering with FoxP3 expression [53–55]. Moreover, it can counteract Treg-mediated suppression by inhibiting T cell IL-2 production, which leads to the impairment of Treg homeostasis through IL-2 deprivation [56].

We have observed a specific increase in the frequency of IL-21-producing Th17 cells, identified as CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺CD4⁺ T cells, during acute resolving HCV. The limited expansion of this subset seen in acute infections with chronic evolution can be due to its exhaustion status. Indeed, we have demonstrated that blocking the PD-1/Tim-3 and CTLA-4 inhibitory pathways can rescue IL-21 production. Another possibility is the modulation of the inhibitory effect of Tim-3 via human leukocyte antigen B (HLA-B)-associated transcript 3 (Bat3) [57]. We have observed lower expressions of Bat3 in Th17 cells from chronically infected HCV patients when compared to SR patients (data not shown). This is similar to features of T cell exhaustion during chronic HIV infection as well as in a mouse model of cancer [57].

IL-21-producing Th17 cells may preferentially home to the liver. Several studies have reported an increase in the frequency of Th17 cells in the livers of patients with chronic liver diseases, including infections with HBV and HCV [23,58,59]. Furthermore, the expression of CD161 on liver-resident HCV-specific IL-17-producing CD8 T cells (Tc17 cells) was found to be tightly linked to the expression of CXCR6, a liver homing chemokine receptor [60]. Due to ethical constraints that restrict any liver biopsies during acute HCV infection, we examined the homing potential of Th17 cells from SR and CI patients by evaluating the expression of the homing receptors CCR5, CXCR3 and CXCR6. However, we did not observe any significant differences between the two groups (data not shown). This result does not exclude the possibility that such liver homing cells were not detected because they are no longer in circulation. Similarly, we could not assess the contribution of other IL-21-producing cellular populations, such as follicular helper T cells which are mainly found in the lymph nodes and NKT cells which are mainly found in the liver.

We have observed three levels of expression of the inhibitory receptor Tim-3 on HCV-specific CD8 T cells. The combination of Tim-3 with PD-1, CTLA-4 and CD127 identified different degrees of functional impairment: un-exhausted (Tim-3^{neg}PD-1^{neg}CTLA-4^{neg}CD127^{high}), partially exhausted (Tim-3^{low}PD-1^{high}CTLA-4^{dim}CD127^{dim}) and fully exhausted (Tim-3^{high}PD-1^{high}CTLA-4^{high}CD127^{neg}) HCV-specific CD8 T cells. Such a hierarchical model of exhaustion was proposed to explain the progressive loss of virus-specific CD8 T cell functions in LCMV [61] and HCV infections [10,38,39]. Although we did not observe any significant differences in the expression of CD160 (data not shown), other inhibitory receptors such as 2B4, LAG-3 and KLRG1 may also be critical in defining the exhaustion level of HCV-specific T cells [38,62,63]. Moreover, the level of expression may also be affected by the host's HLA genotype. Recent data have demonstrated that HIV patients carrying the protective HLA alleles (HLA-B27 and HLA-B57) exhibited limited up-regulation of Tim-3 at the surface of HIV-specific CD8 T cells after cognate epitope stimulation [20]. In contrast, patients carrying the less protective alleles (including HLA-A3) exhibited higher up-regulation of Tim-3 and were more susceptible to functional impairment.

Interestingly, HLA-B27 has been associated with a higher rate of spontaneous resolution in acute HCV infection [64,65] and it is possible that it may play a similar role in limiting T cell exhaustion during acute HCV. Differential up-regulation of inhibitory receptors could be due to variable affinities of the peptide/MHC interactions with the T cell receptors that lead to multiple thresholds of activation.

A blockade of the three inhibitory receptors, PD-1, Tim-3 and CTLA-4, rescued IL-17A and IL-21 production by HCV-specific CD4 T cells. This suggested that these pathways are implicated in helper T cell failure and exhaustion during acute HCV. In addition, it suggested that the hierarchical model of T cell exhaustion, previously observed in CD8 T cells, is also applicable to CD4 T cells. Indeed, gradual and progressive loss of CD4 helper function was observed in HCV infections progressing to chronicity where the earliest function lost was IL-2 production followed by proliferation then IFN- γ production [7]. In the present study, we could not restore CD4 T cell function in patients with chronic evolution where the response was undetectable during the late acute phase suggesting that there is a minimal threshold of T cell frequency and a window of opportunity for immune restoration to succeed. Interestingly, the blocking of all three pathways on exhausted HCV-specific CD8 T cells restored proliferation, but only Tim-3 blockage restored cytotoxic function [39]. Data from HIV and LCMV infections suggest that the level of expression of each inhibitory receptor could also dictate the efficiency of immune restoration upon its blockade [61,66]. Given the difficulty in phenotyping HCV-specific CD4 T cells directly *ex vivo*, further research is still needed to examine the individual contribution of each inhibitory receptor in defining the level of CD4 T cell exhaustion. It is also noteworthy that higher levels of expression of such inhibitory receptors were observed on HCV-specific CD8 T cells in the liver during chronic HCV infection [11–16] and this may limit immune restoration strategies and the immuno-modulatory role of IL-21.

Tregs were expanded during the acute phase of HCV infection in CI patients and may exert a direct inhibitory effect on the function of virus-specific T cells. In addition, we observed a specific expansion of Tregs co-expressing CTLA-4 and CD39. CD39⁺ Tregs were also found to be expanded in HIV [67] and chronic HBV infections [68] and were shown to counteract or inhibit the expansion of Th17 cells during remission of patients with multiple sclerosis [69]. Moreover, a polymorphism in the CD39 gene was recently identified and associated with a slow progression to AIDS in HIV-infected patients [70]. Similar genetic susceptibility may explain the differential induction of CD39⁺ Tregs in HCV-infected patients. Other signals driving cross-regulation between regulatory T cells and IL-21-secreting Th17 CD4 T cells may involve TGF- β [71,72] and/or Notch signaling [73,74]. In summary, HCV infection may disrupt the balance between Th17 cells and Tregs and, therefore, tamper inflammation while diminishing the effector functions of HCV-specific T cells thus facilitating virus persistence [75].

We have observed the preferential expression of Gal-9 by CD39⁺ Tregs which contributes to their suppressive capacity [76,77] through interaction with Tim-3 on the surface of

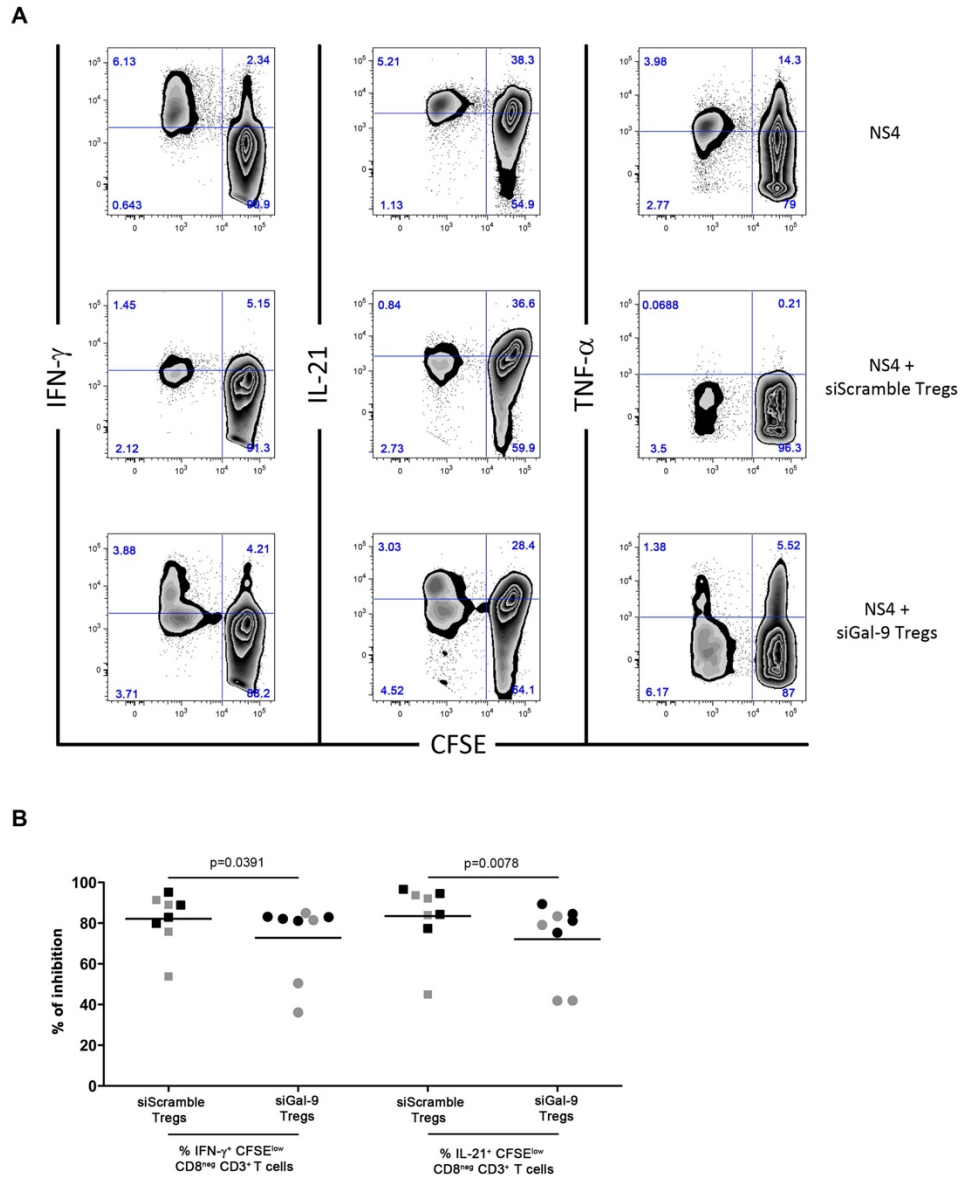


Figure 7. Galectin-9 knockdown limits Treg-mediated inhibition of IFN- γ and IL-21 production by HCV-specific CD4 T cells. (A) Representative combined CFSE/ICS assay demonstrating reduced Treg-mediated inhibition upon knockdown of Gal-9 by siRNA. Plots depict production of IFN- γ , IL-21 and TNF- α by HCV-specific proliferating (CFSE^{low}) T cells in response to stimulation with recombinant HCV NS4 protein. PBMC cultures depleted of Tregs (Top panel) or with addition of Tregs (ratio 1:4, Tregs:CD25-depleted PBMCs) treated with either control siRNA (Middle panel) or *LGALS9* siRNA were stimulated as described in Materials and Methods. Plots are gated on CD3⁺ CD8^{neg} lymphocytes. (B) Percentage of Treg-mediated inhibition of IFN- γ and IL-21 production by HCV-specific T cells upon stimulation with recombinant HCV proteins (NS3: black symbols or NS4: grey symbols) in the presence of Treg cells treated with either control or *LGALS9* siRNA, as described in (A) and Materials and

Methods. The percentage inhibition of cytokine production upon addition of Tregs to the stimulated PBMC cultures was calculated using the following formula: $(\% \text{ CFSE}^{\text{low}}\text{cytokine}^+\text{CD8}^{\text{neg}} \text{ T cells in absence of Tregs} - \% \text{ CFSE}^{\text{low}}\text{cytokine}^+\text{CD8}^{\text{neg}} \text{ T cells in presence of Tregs})/\% \text{ CFSE}^{\text{low}}\text{cytokine}^+\text{CD8}^{\text{neg}} \text{ T cells in absence of Tregs} \times 100$. P-values were calculated using Wilcoxon signed rank test. doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g007

exhausted T cells as recently seen in HIV infection [20]. It is important to note that there are other sources of Gal-9 *in vivo*, specifically Kupffer cells in the liver that may contribute to the increase in apoptosis of liver-resident T cells [15]. We demonstrated a direct link between inhibition of HCV-specific T cell function and the expression of Gal-9 by Tregs during acute HCV infection. A delicate balance between IL-21 and Gal-9 can control survival, exhaustion and apoptosis of HCV-specific T cells and could be a major determinant of infectious outcome.

We propose a model where HCV-specific CD4 and CD8 T cells are induced early during acute HCV infection but multiple mechanisms could contribute to failure of the immune response during the late acute phase. First, failure to expand IL-21-producing Th17 cells leads to diminished survival and function of HCV-specific CD8 T cells. Second, failure to control viral replication leads to the exhaustion of both virus-specific CD4 and CD8 T cells due to the up-regulation of different inhibitory receptors including PD-1, Tim-3 and CTLA-4. T cell exhaustion further aggravates the situation as IL-21 becomes limited, especially in the liver where HCV-specific CD8 T cells become dysfunctional and more susceptible to apoptosis. Finally, to counteract liver inflammation, Tregs are induced and act to further inhibit expansion of Th17 CD4 T cells while producing Gal-9 which can lead to the apoptosis of Tim-3 expressing CD4 and CD8 T cells. Polymorphism in the CD39 gene and the capacity of different HLA alleles to up-regulate inhibitory receptors may be the tipping point in determining the level of exhaustion and the outcome of infection in HCV patients (Figure 8).

Materials and Methods

Ethics statement, study subjects and clinical follow-up

HCV acutely infected subjects were recruited among high-risk HCV-seronegative IDUs participating in the Montreal Hepatitis C Cohort (HEPCO) at St. Luc hospital of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal as previously described [40,78]. This study was approved by the institutional ethics committee (SL05.014). All participants signed informed consent forms upon enrolment and experiments were performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Participants were followed at scheduled 3-month intervals with a maximum duration of 22 weeks between visits. Acute infection was defined as either (i) detection of positive HCV RNA in the absence of HCV antibodies, followed by sero-conversion; (ii) a positive HCV antibody test following a previous negative test in the presence of positive HCV RNA; or (iii) a positive HCV antibody and RNA test within 3 months of a high-risk exposure. All patients tested negative for HIV and HBV. The estimated time of infection at recruitment was defined as the median time (in weeks) between the last negative test and first positive HCV RNA or antibody test. Spontaneous viral resolution (SR, $n = 13$) or chronic infection (CI, $n = 24$) was defined as the absence or the presence of HCV RNA at 24 weeks post-estimated time of infection (PEI), respectively. Two time points were studied for acutely infected patients: early acute ($10 \text{ wks} \pm 1 \text{ wk PEI}$) and late acute ($30 \text{ weeks} \pm 6 \text{ weeks PEI}$). Two additional categories of patients were studied: long-term HCV spontaneous resolvers (R) ($n = 8$), defined as HCV RNA negative and antibody positive at two consecutive tests >60 days

apart, and long-term HCV chronically infected patients (C) ($n = 27$), defined as HCV RNA and antibody positive at recruitment with no prior negative test data. Healthy controls ($n = 18$) were also studied. The characteristics and demographics of the study participants are summarized in Table 1. HLA typing was performed as previously described [79].

HCV RNA testing and quantification

Qualitative HCV RNA tests were performed using an automated COBAS Ampliprep/COBAS Amplicor HCV test, version 2.0 (sensitivity, 50 IU/ml) (Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, NJ). HCV genotyping was done using standard sequencing for the NS5B region. Both tests were performed by the Laboratoire de Santé Publique du Québec (St-Anne-de-Belleuve, QC, Canada) as part of the clinical follow-up of patients.

ELISA assays

The concentrations of IL-17A and IL-21 were determined in plasma samples collected in EDTA and culture supernatants using commercial ELISA kits (eBioscience, San Diego, CA), according to the manufacturer's protocols. The lower detection limits of the kits are 4 and 31 pg/ml, respectively. The concentration of Gal-9 in plasma was determined using a commercial ELISA kit (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China), according to the manufacturer's protocol. The lower detection limit of the kit is 7.8 pg/ml.

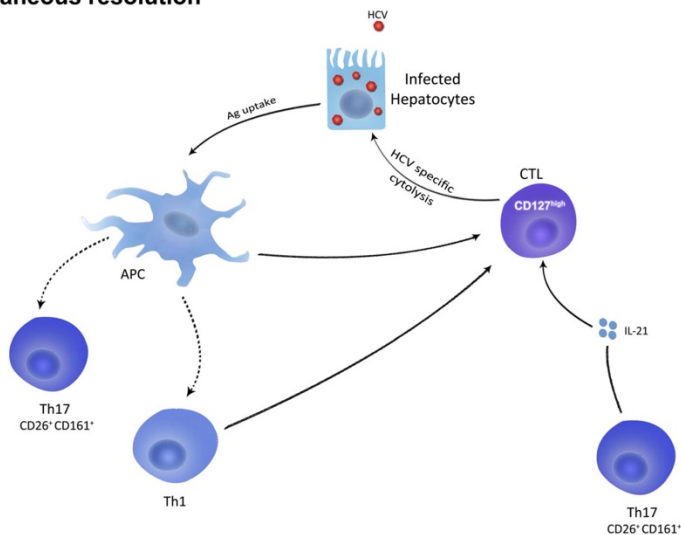
Peptides and peptide-HLA class I tetramers

Peptides were synthesized by Sheldon biotechnology Centre, McGill University, (Montreal, QC, Canada). MHC class I tetramers were synthesized by either the National Immune Monitoring Laboratory (NIML) (Montréal, QC, Canada) or the NIH Tetramer Core Facility (Emory University, Atlanta, GA) and are as follows: HLA-A1-restricted HCV NS3 peptide aa 1436 to 1444 (ATDALMTGY) (A1/NS3-1436), HLA-A2-restricted HCV NS3 peptide aa 1073 to 1081 (CINGVCWTV) (A2/NS3-1073), HLA-A2-restricted HCV NS3 peptide aa 1406 to 1415 (KLVALGINAV) (A2/NS3-1406), HLA-A2-restricted HCV NS5b peptide aa 2594 to 1415 (A2/NS5b-2594), HLA-B7-restricted HCV core peptide aa 41 to 49 (GPRLGVRAT) (B7/core-41), HLA-B8-restricted HCV NS3 peptide aa 1395 to 1403 (HSKCKCDEL) (B8/NS3-1395) and HLA-B27-restricted HCV NS5b peptide aa 2841 to 2849 (ARMILMTHF) (B27/NS5b-2841).

Flow cytometry antibodies and reagents

Directly conjugated antibodies against the following surface molecules were used: CD4-PerCP (clone SK3), CD8-APC-H7 (clone SK1), CD25-PE or -PE-Cy7 (clone M-A251), CD26-FITC (Clone L272), CD161-PE-Cy5 (clone DX12), CCR5-FITC (clone 2D7), CCR6-PE (clone 11A9) and PD-1-FITC (clone MIH4) (all from BD Biosciences, San Jose, CA); CD39-PE or -PECy7 (clone eBioA1), CD127-eFluor 450 (clone eBioRDR5), CD160-Alexa 647 (clone BY55) (eBioscience); CD3-ECD (clone UCHT1) (Beckman Coulter, Marseille, France); Tim-3-PE or -PerCP (clone 344823) and CXCR6-PE (clone 56811) (R&D Systems, Minneapolis, MN). The following intracellular antibodies were used: CTLA-4-APC (clone BNI3), caspase-3-Alexa 647 (clone C92-065), TNF- α -Alexa 700 (clone Mab11) and IFN- γ -FITC (clone 25723) all from BD Biosciences; IFN- γ -eFluor 450 (clone 4SB3), IL-17A-Alexa 647 (clone eBio64-

A. Spontaneous resolution



B. Chronic evolution

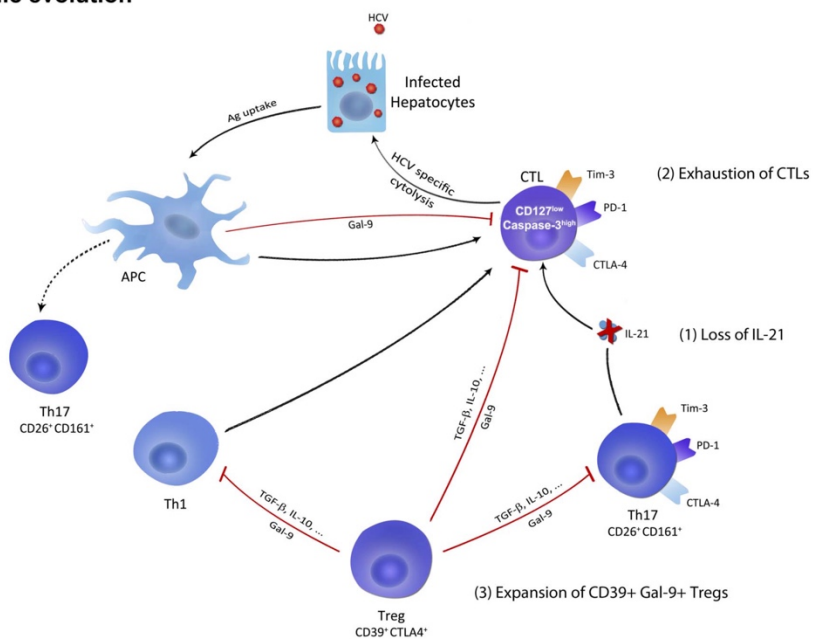


Figure 8. Proposed model for role of Galectin-9 and IL-21 during acute HCV infection. (A) HCV infection of hepatocytes and antigen uptake and presentation by liver-resident and circulating antigen presenting cells (APCs) prime HCV-specific CTLs and helper CD4 T cells including

Th1 and Th17 cells. Function and survival of HCV-specific CTLs are sustained by increased production of IL-21 by Th17 cells during the late acute phase of spontaneously resolving HCV infection. (B) In patients with chronic evolution, multiple inhibitory mechanisms cooperate to induce failure of the immune response and facilitate viral persistence. (1) HCV-specific Th17 cells produce less IL-21 thus compromising CTL survival and function. (2) HCV-specific CTLs become exhausted and up-regulate exhaustion molecules like Tim-3, PD-1 and CTLA-4 and become more susceptible to apoptosis that is aggravated by lack of sufficient IL-21. (3) CD39⁺ Tregs are increased in frequency and may directly inhibit Th17 cells and Tim-3-expressing CTLs via Gal-9-mediated apoptosis or through classical mechanisms including cellular contact and immuno-modulatory cytokines like IL-10 and TGF- β . doi:10.1371/journal.ppat.1003422.g008

DEC17), IL-21-PE (clone cBio3A3-N2) and FoxP3-Alexa 488 (clone PCH101) (eBioscience). Live cells were identified using Aqua Live/Dead Fixable Dead Cell Stain Kit according to the manufacturer's protocol (Life Technologies, Burlington, ON). "Fluorescence minus one" control stains were used to determine background levels of staining. Multiparameter flow cytometry was performed using a standard BD LSR II instrument equipped with blue (488 nm), red (633 nm), and violet (405 nm) lasers (BD Biosciences), to systematically perform 11-9 color staining using the FACSDiva software (Version 5.0.3) (BD Biosciences). Compensation was performed with single fluorochromes and BD CompBeads (BD Biosciences). Biexponential transformation was applied during the analysis of data files using FlowJo software, version 9.4.11 for Mac (Tree Star, Inc., Ashland, OR).

Cell separation

Tregs were isolated using CD25 Microbeads II (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) and the purity was assessed by flow cytometry. CD4 T cells were purified by negative selection using a CD4 T Cell Isolation kit II (Miltenyi Biotec), according to the manufacturer's instructions.

Sorting experiments

All sorts were performed using the FACS Aria II Instrument (BD Biosciences) employing FACSDiva software (Version 5.0.3). For Th17 progenitor cells, purified CD4 T cells were labeled and sorted according to viability and the expression of CD3, CD4, CD127, CD161, CCR6 and CD26. CD127^{low} Tregs were excluded from the sort by gating on CD127^{high} CD4 T cells. Two populations were collected: CD127^{high}CD161^{neg} or CD127^{high}CD161^{high}CCR6^{hi}CD26^{hi} CD4 T cells. Sorted cells were stimulated for 48 hours with anti-CD3/anti-CD28 before mRNA extraction and RT-PCR. For the purification of Tregs, CD4 T cells were isolated, labeled and sorted according to viability and the expression of CD3, CD4, CD127, CD25 and CD39. Three populations were collected: effector T cells (CD25^{neg}CD127^{hi}), CD39⁺ Tregs (CD127^{low}CD25^{high}CD39⁺) and CD39^{neg} Tregs (CD127^{low}CD25^{high}CD39^{neg}). Sorted cells were washed, and immediately lysed to extract mRNA as described below or fixed using a Foxp3 Staining Buffer Set (eBiosciences) to perform the intracellular staining of FoxP3 and CTLA-4, according to the manufacturer's instructions.

Multiparametric phenotypic characterization of HCV-specific T cells

All flow cytometry assays were performed on cryo-preserved samples. For the phenotype analysis, 2×10^6 PBMCs were stained with freshly prepared tetramer-PE for 30 minutes at room temperature and washed in fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (1 \times phosphate-buffered saline [PBS], 1% fetal bovine serum [FBS], 0.02% NaN₃). Samples were then stained with surface antibodies for 30 minutes at 4°C, washed twice in FACS buffer, and fixed in FACS Fix buffer (1 \times PBS, 1% formaldehyde).

Intracellular cytokine staining

Cells were stimulated with PMA/ionomycin (50 ng/ml and 1 μ g/ml, respectively). Following 2 hours of stimulation, 5 μ g/ml

of brefeldin A and 5 μ g/ml of monensin sodium salt were added, and cells were incubated for a total of 16 hours. Cells were washed with FACS buffer, stained for viability and cell surface antigens, fixed and permeabilized using a FoxP3 buffer solution (eBioscience). Then, the cells were stained with anti-IL-17A, anti-IL-21 and anti-IFN- γ antibodies for 30 minutes and washed twice in Perm buffer (eBioscience). For the analysis, cells were gated on viable CD3⁺ CD8⁻ T cells.

CFSE proliferation assays

CD25-depleted PBMCs were re-suspended in PBS at 20×10^6 cells/ml and stained with 0.5 μ M CFSE (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) for 8 minutes at room temperature. The reaction was stopped with human serum. Cells were washed three times in PBS and then re-suspended at 2×10^6 cells/ml in warm RPMI (Life Technologies), 10% FCS (R-10) medium. CFSE-labeled cells were stimulated for 6 days with or without 1 μ g/ml of the HCV-recombinant proteins NS3 and NS4 (Feldan, Quebec, QC, Canada) in the presence of 200 ng/ml of anti-CD28/-CD49d (Fastimmune, BD bioscience) at 37°C and 5% CO₂. Recombinant human IL-2 (20 IU/ml) (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, MD) was added on day 3. Some assays were performed in the presence of blocking antibodies against PD-L1 (clone MIH1, eBioscience), CTLA-4 (Clone BNI3, BD biosciences) and Tim-3 (Clone F38-2E2, Biolegend) at 10 μ g/ml each or in the presence of IgG1 and IgG2a isotype control antibodies. On day 6, cells were directly stained with surface antigens as described above or stimulated by PMA/ionomycin to assess cytokine secretion by HCV-specific T cells, identified by CFSE^{low} expression.

HCV epitope-specific proliferation assay

PBMCs were stimulated with 10 μ g/ml of the cognate HCV peptide for 6 days in the presence or absence of IL-21 (20 ng/ml). HCV-specific cells were identified as HCV tetramer⁺CD8⁺ T cells. Fold expansion was calculated by dividing the frequency of HCV tetramer⁺CD8⁺ T cells after *in vitro* expansion by the frequency measured directly *ex vivo*.

Ex vivo apoptosis assay

PBMCs were incubated for 4 hours with varying concentrations of Gal-9 or Gal-3 (1 μ M each) in R-10. Cells were then stained for surface markers and the specific HCV-tetramers followed by Annexin V staining using Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD biosciences). Cells were fixed and permeabilized with FoxP3 specific buffer (eBioscience) followed by intracellular staining with the anti-caspase-3 antibody.

Relative quantification of Th17 specific transcription factor mRNA by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted using Real-Time Ready Cell Lysis kit (Roche, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using Transcriptor Universal cDNA Master (Roche). Real-time PCR amplification was performed using commercial primers (Qiagen,

Toronto, ON, Canada) for RORc (Assay ID QT00097888, Gene bank accession number NM_005060) or c-MAF (QT00023618, NM_005360) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in combination with the LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche). Transcription factor gene expression was quantified with the Advanced Relative Quantification method provided by the manufacturer and normalized with 28S mRNA expression. Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 detection system (Roche).

Relative quantification of Galectin-9 mRNA by RT-PCR

Total RNA was extracted and reverse transcribed as described above. Real-time PCR amplification was performed using the pre-developed assay-on-demand gene expression set for the Gal-9 gene (*LGALS9*) (Assay ID Hs00247135_m1, Gene bank accession number NM_009587.2, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the Human 18S endogenous control (HS_99999901, Gene bank accession number X03205.1, Applied Biosystems) using the Taqman Universal PCR Master Mix. The quantification of Gal-9 mRNA expression was calculated with the absolute method provided by the manufacturer and expressed in Tregs relative to the expression in CD127^{hi}CD25^{neg} effector T cells. Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 detection system (Roche).

Small interfering RNA transduction

For the silencing of *LGALS9*, we performed RNA interference experiments on isolated Treg cells according to the manufacturer's protocol by using *Silencer* siRNA Transfection II Kit (Ambion, Applied Biosystems). Knockdown of *LGALS9* in Treg cells was confirmed by qRT-PCR as shown in Supplementary Figure S5. Control Treg cells received a scrambled siRNA. Cells were allowed to recover in R-10 complete media (RPMI, 10% FCS) at 37°C for 5 hours then used in the co-culture assay.

Co-culture assay

The combined CFSE/ICS assays were performed as described above in the presence of Tregs added at a ratio of 1:4 (Tregs:CD25-depleted CFSE labeled PBMCs). The percentage inhibition of cytokine production upon addition of Tregs to the stimulated PBMC cultures was calculated using the following formula: (percentage CFSE^{low} cytokine⁺CD8^{neg} T cells in absence of Tregs – percentage CFSE^{low} cytokine⁺CD8^{neg} T cells in presence of Tregs)/percentage CFSE^{low} cytokine⁺CD8^{neg} T cells in absence of Tregs × 100.

Statistical analysis

All analyses were performed using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney U rank sum test was performed to compare the median values between two groups. The Wilcoxon signed rank test was performed to compare the median values between two paired groups. Correlations were determined by the Spearman rank test. P-values < 0.05 were considered significant.

Supporting Information

Figure S1 Enhanced proliferation of HCV-specific CD4 T cells during acute resolving HCV infection. (A) Schematic representation of CFSE/ICS assay. PBMCs were depleted of CD25⁺ cells then labelled with CFSE and stimulated with HCV NS3 or NS4 recombinant proteins (1 µg/ml) during 6 days. Un-stimulated and SEB-stimulated cells were used as negative and positive controls, respectively. At the end of day 6,

cells were stimulated with PMA/ionomycin for 18 hours with addition of brefeldin A and monensin to reveal their cytokine expression pattern. HCV-specific CD4 T cells were identified by the dilution of CFSE coupled with the up-regulation of CD25 within the CD3⁺CD8^{neg} lymphocyte gate. (B) Representative figure of CFSE proliferation assay in an SR as a CI patient. CD25-depleted PBMCs were stained with CFSE and stimulated with HCV NS3 or NS4 recombinant proteins (1 µg/ml) during 6 days. Un-stimulated and SEB-stimulated cells were used as negative and positive controls, respectively. Cells were gated on CD3⁺CD8^{neg} lymphocytes. Antigen-specific T cells were identified as CD25^{high}CFSE^{low} CD4 T cells. (C) Stimulation Index (SI) of HCV-specific CD4 T cells at the indicated time points was calculated using the following formula: % CD25^{high}CFSE^{low} (HCV specific)/% CD25^{high}CFSE^{low} (Un-stimulated). (TIF)

Figure S2 Representative figure of combined CFSE proliferation/intracellular cytokine staining (ICS) assay. To characterize the cytokine profile of HCV-specific CD4 T cells, CD25-depleted PBMC from patients with acute HCV were stained with CFSE and stimulated with 1 µg/ml of HCV-recombinant proteins (NS4). After 6 days of culture, cells were washed and re-stimulated with PMA/ionomycin in presence of brefeldin A/monensin to reveal the cytokine profile by ICS as described in Materials and Methods and Figure S1A. Cells were gated on viable CD3⁺CD8^{neg} lymphocytes for analysis of the percent of cytokine⁺CFSE^{low} cells. (TIF)

Figure S3 Increased frequency of Th17 cells during acute resolving HCV. (A) Increased frequency of IL-21-secreting Th17 cells in SR patients during acute infection. PBMCs from HCV infected patients collected at pre-infection and late acute HCV as well as PBMCs from long-term chronic patients were stained to evaluate the frequency of Th17 T cells defined as CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺CD4 T cells. For pre-infection samples, grey symbols represent SR and black symbols represent CI patients. (B) Representative FACS plot for the identification of IL-21-secreting Th17 cells as CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺CD4 T cells. Purified CD4 T cells were first gated on CD127^{high} cells to exclude Tregs and then gated on CD161^{high} cells and then based on co-expression of CD26 and CCR6 to define the Th17 population. (C) Characterization of IL-21-producing Th17 cells by specific expression of Th17 transcription factors. CD161^{neg} and CD161^{high}CCR6⁺CD26⁺CD4 T cells were sorted from HCV long-term resolvers (R) (n = 5) or chronic (C) (n = 4) patients. Cells were stimulated for 48 hours with anti-CD3/anti-CD28 and gene expression of RORc or c-MAF was evaluated using specific commercial primers and normalized to 28S mRNA expression. (TIF)

Figure S4 Reduced proliferative capacity of Tim-3^{high} cells. PBMCs from acute HCV patients were stimulated with their cognate peptide epitopes corresponding to the HCV MHC class I tetramers used as described in Materials and Methods. Patients were classified according to Tim-3 expression on HCV tetramer⁺CD8⁺T cells as: Tim-3^{neg} (open circles), Tim-3^{low} (grey circles) and Tim-3^{high} (closed circles). Data is presented as the frequency of HCV tetramer⁺CD8⁺T cells directly *ex-vivo* and after *in vitro* stimulation and expansion by the cognate peptide. (TIF)

Figure S5 Co-culture assay. (A) Representative model of Treg co-culture in CFSE/ICS assay. Combined CFSE/ICS assays were performed as described in Materials and Methods and Figure

S1 in the presence of Tregs added at a ratio of 1:4 (Tregs:CD25-depleted CFSE-labeled PBMC). Tregs were transduced with scrambled, GAPDH or *LGALS9* siRNA. **(B)** Silencing of Galectin-9 expression in regulatory T cells from HCV chronic patients. The efficiency of knockdown of Gal-9 expression in Tregs following transfection of *LGALS9* siRNA was assessed by quantitative RT-PCR. Purified CD25⁺ CD4⁺ T cells were transfected with scrambled, GAPDH or *LGALS9* siRNA. The mRNA was isolated and GAPDH or *LGALS9* gene expression was normalized to 18S mRNA expression ($p < 0.01$). (TIF)

References

- Rehermann B (2009) Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 119: 1745–1754.
- Bowen DG, Walker CM (2005) Adaptive immune responses in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Nature* 436: 946–952.
- Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH, Schraut WW, et al. (1999) Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4⁺ T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 117: 933–941.
- Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, et al. (1995) Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346: 1006–1007.
- Day CL, Lauer GM, Robbins GK, McGovern B, Wurcel AG, et al. (2002) Broad Specificity of Virus-Specific CD4⁺ T-Helper-Cell Responses in Resolved Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 76: 12584–12595.
- Schulze Zur Wiesch J, Cluffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasprowitz V, Nolan BE, et al. (2012) Broadly directed virus-specific CD4⁺ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med* 209: 61–75.
- Semmo N, Day CL, Ward SM, Lucas M, Harcourt G, et al. (2005) Preferential loss of IL-2-secreting CD4⁺ T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology* 41: 1019–1028.
- Lucas M, Ulsenheimer A, Pfifferot K, Heeg MH, Gaudieri S, et al. (2007) Tracking virus-specific CD4⁺ T cells during and after acute hepatitis C virus infection. *PLoS ONE* 2: e4649.
- Grakoui A, Shoukry NH, Woollard DJ, Han JH, Hanson HL, et al. (2003) HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302: 659–662.
- Callendret B, Walker C (2011) A siege of hepatitis: immune boost for viral hepatitis. *Nat Med* 17: 252–253.
- Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Ohdsen K, et al. (2008) Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8⁺ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol* 82: 9808–9822.
- Radziewicz H, Dunham RM, Grakoui A (2009) PD-1 tempers Tregs in chronic HCV infection. *J Clin Invest* 119: 450–453.
- Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Oldhoff K, Valiga ME, et al. (2009) Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8⁺ T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 5: e1000313.
- Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, et al. (2008) Functional restoration of HCV-specific CD8⁺ T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134: 1927–1937. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.054
- Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, Smith M, Niki T, et al. (2010) A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PLoS ONE* 5: e9504.
- Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, et al. (2009) Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J Virol* 83: 9122–9130.
- Raziorrouh B, Ulsenheimer A, Schraut W, Heeg M, Kurtschew P, et al. (2011) Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4⁺ T cells in patients with chronic infection. *Gastroenterology* 141: 1422–1431. doi:10.1053/j.gastro.2011.04.026
- Chang KM (2007) Regulatory T cells in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45: 327–330.
- Mangold T, Raccanelli V (2007) T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect Dis* 7: 804–813.
- Elahi S, Dinges WL, Lejarcegui N, Laing KJ, Collier AC, et al. (2011) Protective HIV-specific CD8⁺ T cells evade Treg cell suppression. *Nat Med* 17: 989–995.
- Billerbeck E, Kang YH, Walker L, Lockstone H, Grafmueller S, et al. (2010) Analysis of CD161 expression on human CD8⁺ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3006–3011.
- Grafmueller S, Billerbeck E, Blum HE, Neumann-Haefelin C, Thimme R (2012) Differential antigen specificity of hepatitis C virus-specific interleukin 17- and interferon gamma-producing CD8⁺ T cells during chronic infection. *J Infect Dis* 205: 1142–1146.
- Foster RG, Golden-Mason L, Rutebemberwa A, Rosen HR (2012) Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Dig Dis Sci* 57: 381–389.
- Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, Moran B, Hegarty JE, et al. (2008) Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J Immunol* 181: 4485–4494.
- Seetharam AB, Borg BB, Subramanian V, Chapman WC, Crippin JS, et al. (2011) Temporal association between increased virus-specific Th17 response and spontaneous recovery from recurrent hepatitis C in a liver transplant recipient. *Transplantation* 92: 1364–1370.
- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2009) IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27: 485–517.
- Frohlich A, Kisielow J, Schmitz I, Freigang S, Shamshiev AT, et al. (2009) IL-21R on T cells is critical for sustained functionality and control of chronic viral infection. *Science* 324: 1576–1580.
- Elsaesser H, Sauer K, Brooks DG (2009) IL-21 is required to control chronic viral infection. *Science* 324: 1569–1572.
- Yi JS, Du M, Zajac AJ (2009) A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science* 324: 1572–1576.
- Chevalier MF, Julg B, Pyo A, Flanders M, Ranasinghe S, et al. (2011) HIV-1-specific interleukin-21+ CD4⁺ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8⁺ T cell function. *J Virol* 85: 733–741.
- Jannello A, Boulassel MR, Samarani S, Debbeche O, Tremblay C, et al. (2010) Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study. *J Immunol* 184: 114–126.
- Yue FY, Lo C, Sakhdari A, Lee EY, Kovacs CM, et al. (2010) HIV-specific IL-21 producing CD4⁺ T cells are induced in acute and chronic progressive HIV infection and are associated with relative viral control. *J Immunol* 185: 498–506.
- Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, et al. (1997) Immunodominant CD4⁺ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 71: 6011–6019.
- Lauer GM, Barnes E, Lucas M, Timm J, Ouchi K, et al. (2004) High resolution analysis of cellular immune responses in resolved and persistent hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 127: 924–936.
- Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, et al. (2005) Broad repertoire of the CD4⁺ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol* 175: 3603–3613.
- Cosmi L, De Palma R, Santarlasci V, Maggi E, Capone M, et al. (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4⁺ T cell precursor. *J Exp Med* 205: 1903–1916.
- Bengsch B, Seigel B, Flecken T, Wolanski J, Blum HE, et al. (2012) Human Th17 Cells Express High Levels of Enzymatically Active Dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J Immunol* 188: 5438–5447.
- Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, et al. (2010) Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8⁺ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* 6: e1000947.
- McMahon RH, Golden-Mason L, Nishimura MI, McMahon BJ, Kemper M, et al. (2010) Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* 120: 4546–4557.
- Badr G, Bedard N, Abdel-Hakem MS, Trautmann L, Willems B, et al. (2008) Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J Virol* 82: 10017–10031.
- Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, et al. (2005) The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6: 1245–1252.
- Leitner J, Rieger A, Pickl WF, Zlabinger G, Grabmeier-Pfistershammer K, et al. (2013) TIM-3 Does Not Act as a Receptor for Galectin-9. *PLoS Pathog* 9: e1003253.
- Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, et al. (2009) CD39+Foxp3+ regulatory T cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol* 183: 7602–7610.

44. Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma ZM, Proll S, et al. (2009) Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection. *PLoS Pathog* 5: e1000295.
45. White L, Krishnan S, Strbo N, Liu H, Kolber MA, et al. (2007) Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV). *Blood* 109: 3873–3880.
46. Parmigiani A, Pallin MF, Schmidmayerova H, Lichtenheld MG, Pahwa S (2011) Interleukin-21 and cellular activation concurrently induce potent cytotoxic function and promote antiviral activity in human CD8 T cells. *Hum Immunol* 72: 115–123.
47. Spolski R, Leonard VJ (2008) Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 26: 57–79.
48. Hogg AE, Bowick GC, Herzog NK, Cloyd MW, Endsley JJ (2009) Induction of granulysin in CD8+ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1. *J Leukoc Biol* 86: 1191–1203.
49. Allard EL, Hardy MP, Leignadier J, Marquis M, Rooney J, et al. (2007) Overexpression of IL-21 promotes massive CD8+ memory T cell accumulation. *Eur J Immunol* 37: 3069–3077.
50. Sabagh L, Kaech SM, Bourbonniere M, Woo M, Cohen LY, et al. (2004) The selective increase in caspase-3 expression in effector but not memory T cells allows susceptibility to apoptosis. *J Immunol* 173: 5425–5433.
51. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, Min R, Shenderov K, et al. (2007) IL-6 programs TH17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8: 967–974.
52. Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, et al. (2007) IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* 448: 484–487.
53. Nurieva R, Yang XO, Martinez G, Zhang Y, Panopoulos AD, et al. (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* 448: 480–483.
54. Li Y, Yee C (2008) IL-21 mediated Foxp3 suppression leads to enhanced generation of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 111: 229–235.
55. Littman DR, Rudensky AY (2010) Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140: 845–858.
56. Atrtridge K, Wang CJ, Wardzinski L, Kenefeck R, Chamberlain JL, et al. (2012) IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* 119: 4656–4664.
57. Raagachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, et al. (2012) Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med* 18(9):1394–400.
58. Ge J, Wang K, Meng QH, Qi ZX, Meng FL, et al. (2010) Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *J Clin Immunol* 30: 60–67.
59. Zhang JY, Zhang Z, Lin F, Zou ZS, Xu RN, et al. (2010) Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 51: 81–91.
60. Northfield JW, Kasprovicz V, Lucas M, Kersting N, Bengsch B, et al. (2008) CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology* 47: 396–406.
61. Blackburn SD, Shim H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, et al. (2009) Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10: 29–37.
62. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, et al. (2007) Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27: 670–684.
63. Schlaphoff V, Lanemann S, Suneetha PV, Jaroszewicz J, Grabowski J, et al. (2011) Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog* 7: e1002045.
64. Neumann-Haefelin C, McKiernan S, Ward S, Viazov S, Spangenberg HC, et al. (2006) Dominant influence of an HLA-B27 restricted CD8+ T cell response in mediating HCV clearance and evolution. *Hepatology* 43: 563–572.
65. Dazert E, Neumann-Haefelin C, Bressanelli S, Fitzmaurice K, Kort J, et al. (2009) Loss of viral fitness and cross-recognition by CD8+ T cells limit HCV escape from a protective HLA-B27-restricted human immune response. *J Clin Invest* 119: 376–386.
66. Porichis F, Kwon DS, Zupkosky J, Tighe DP, McMullen A, et al. (2011) Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. *Blood* 118: 965–974.
67. Schulze Zur Wiesch J, Thomsen A, Hartjen P, Toth I, Lehmann C, et al. (2011) Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J Virol* 85: 1287–1297.
68. Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y (2012) Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. *BMC Immunol* 13: 17.
69. Peelen E, Damoiseaux J, Smolders J, Knippenberg S, Menheere P, et al. (2011) Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39+ regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J Neuroimmunol* 240–241: 97–103.
70. Nikolova M, Carriere M, Jenabian MA, Limou S, Younas M, et al. (2011) CD39/adenosine pathway is involved in AIDS progression. *PLoS Pathog* 7: e1002110.
71. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, et al. (2002) Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 196: 255–260.
72. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235–238.
73. Kared H, Adle-Biasette H, Fois E, Masson A, Bach JF, et al. (2006) Jagged2-expressing hematopoietic progenitors promote regulatory T cell expansion in the periphery through notch signaling. *Immunity* 25: 823–834.
74. Keerthivasan S, Sulciman R, Lawlor R, Roderick J, Bates T, et al. (2011) Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation. *J Immunol* 187: 692–701.
75. Barnaba V (2010) Hepatitis C virus infection: a “liaison a trois” amongst the virus, the host, and chronic low-level inflammation for human survival. *J Hepatol* 53: 752–761.
76. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204: 1257–1265.
77. Mandapathil M, Hildorfer B, Szczepanski MJ, Czystowska M, Szajnlik M, et al. (2010) Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* 285: 7176–7186.
78. Cox AL, Page K, Bruncau J, Shoukry NH, Lauer GM, et al. (2009) Rare birds in North America: acute hepatitis C cohorts. *Gastroenterology* 136: 26–31.
79. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, et al. (2003) HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198: 1909–1922.

Immunology of the Liver

(Encyclopedia of Immunobiology, Volume 5, 2016)

Immunology of the Liver

Thomas Fabre and Naglaa H Shoukry, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada; and Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract

The liver is an important metabolic organ with unique immunological properties. As a secondary lymphoid organ, the liver contains several populations of antigen-presenting cells including classical dendritic cells, but also hepatocytes, Kupffer cells, endothelial cells, and hepatic stellate cells that are able to uptake, process, and present antigens. Constantly exposed to self- and foreign antigen carried by gut-derived blood, the architecture and immune regulatory environment in the liver favor tolerance rather than activation of innate and adaptive immune responses. This tolerogenic environment is exploited by several hepatotropic pathogens to establish persistent infections with long-term liver damage. Here, we will discuss the functions of hepatic immune cells, the balance between tolerance versus activation, mechanisms facilitating the persistence of hepatotropic pathogens, and how immune responses influence the onset and progression of liver disease.

Introduction

The liver is the largest vital organ in the body and it plays a dual role as the major site of complex metabolic processes and detoxification. It is therefore constantly being exposed to foreign antigens derived from nutrients and toxins that could induce local inflammatory responses that need to be tolerated. At the same time, it is exposed to a multitude of foodborne and bloodborne pathogens that require activation of a rapid innate and adaptive immune response to prevent dissemination of such pathogens. The essence of the immunologic function of the liver is immune surveillance and striking this balance between tolerance and activation. In this article, we will describe the function of innate and adaptive liver immune cells, the balance between tolerance and activation, immunity to selected hepatotropic pathogens and how they exploit the tolerogenic environment of the liver to their own benefit, and finally the role of the immune system in the development and progression of chronic liver disease.

Immunological Anatomy of the Liver

Anatomy of the Liver Sinusoid

Blood is delivered to the liver by the hepatic artery (20%) and the portal vein (80%) (Crispe, 2011). Each minute, 30% of the total volume of blood passes through the liver. The organization of the liver sinusoid network contributes to its capacity for metabolite uptake and immune surveillance. Liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) constitute a physical barrier between blood and hepatocytes. LSECs are implicated in the recognition and uptake of pathogens, antigen presentation, cross-presentation, and induction of tolerance (Crispe, 2011). The liver sinusoid is fenestrated. LSECs have fenestrations of 100 nm diameter that facilitate the passage of nutrients and different molecules in the gap between LSECs and hepatocytes named the space of Disse

(Wisse et al., 1985; Wisse, 1970). This space helps in slowing down the flow of plasma to improve uptake of metabolites and toxins by hepatocytes and facilitates interaction of lymphocytes with antigen-presenting cells (APCs). Hepatic stellate cells (HSCs) are located at the interface between hepatocytes and LSECs, they store retinoic acid and contribute to liver immunity through modulation of innate and adaptive immune responses (Geerts, 2001; Friedman et al., 1992; Yamada et al., 1987). Finally, immune sentinel cells, such as liver-resident macrophages (Kupffer cells (KCs)) and neutrophils, traffic within the liver sinusoids to sense and eliminate pathogens (Bouwens et al., 1986; Freudenberg et al., 1982).

Immune Cell Composition of the Liver

The liver is composed of parenchymal cells or hepatocytes representing 70–80% and nonparenchymal cells (NPCs) representing 20–30% of liver cells (Figure 1). NPCs have a unique immune cell composition comprised of APCs, and innate and adaptive lymphocytes (Doherty and O'farrelly, 2000; Racanelli and Rehermann, 2006).

Kupffer Cells

KCs are liver-resident macrophages representing 20% of NPCs. They are located in the liver sinusoids primarily around the portal tracts where they can clear endotoxin from the blood (Bilzer et al., 2006; Bouwens et al., 1986). KCs express major histocompatibility complex class I (MHC-I), class II (MHC-II), and costimulatory molecules, such as CD80 and CD86, and therefore can present antigens and prime naïve CD8 T cells (Lohse et al., 1996). KC can be either M1 (proinflammatory) or M2 (anti-inflammatory) macrophages (Saha et al., 2015; Sica et al., 2014). The balance between M1 and M2 macrophages plays an important role during liver injury and repair (Dey et al., 2014; Sica et al., 2014; Dal-Secco et al., 2015). KCs also produce large amounts of IL-10 and TGF- β that contribute to the tolerogenic environment in the liver (Crispe, 2014).

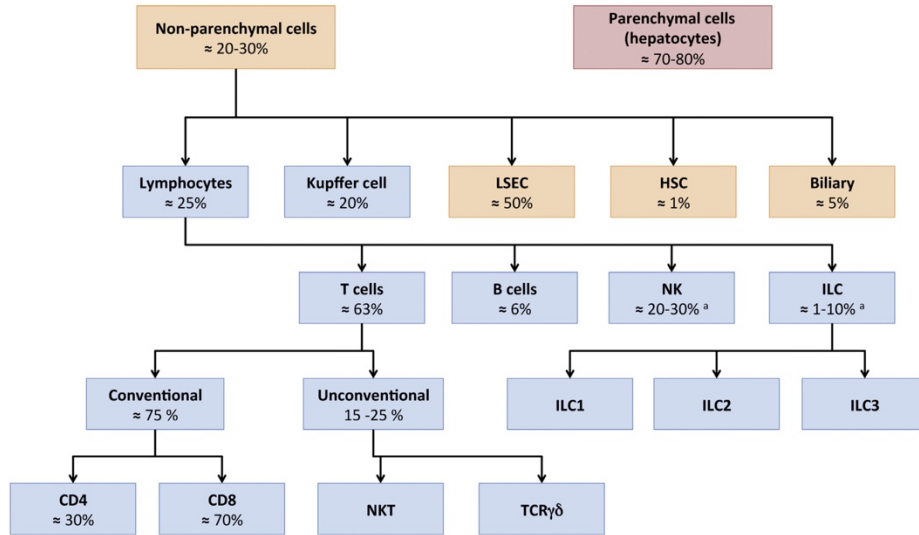


Figure 1 Cellular composition of the liver. Parenchymal cells in red (hepatocytes) represent the vast majority of cells in the liver. Nonparenchymal cells represent up to 30% of total liver cells; they are composed of immune cells (blue) and other liver-resident cells (orange). Lymphocytes of the liver are composed of natural killer (NK) cells, natural killer T cells, innate lymphoid cells (ILCs), T cells and B cells. Numbers represent the estimated frequency of each population relative to the total number of cells. Percentages indicated are percent of parent population. Figure adapted from Racanelli, V., Rehermann, B., 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54–S62.

^aPrevious studies have estimated that NK cells represent 30% of the liver lymphocytes, however, recent work has demonstrated that a significant percentage of these cells are ILCs type I.

Natural Killer Cells

Natural killer (NK) cells are enriched in the liver (15–30%) as compared to the peripheral blood (5–15%) (Racanelli and Rehermann, 2006). Intrahepatic NK cells contribute to immune surveillance as they can kill infected or precarcinogenic cells. They also play an important role during liver injury and repair as they can influence the balance between pro- and anti-inflammatory responses and directly inhibit liver fibrosis via killing of profibrogenic activated HSCs (see below) (Zhang and Friedman, 2012; Melhem et al., 2006).

Natural Killer T Cells

Natural killer T (NKT) cells are unconventional T cells that include classical and nonclassical subsets. Classical NKT cells (also known as type I or invariant NKT cells) are generated in the thymus and have a unique $V\alpha 24$, $V\beta 11$ T cell receptor (TCR) in humans that recognizes lipid antigens presented by CD1d, a nonpolymorphic MHC class I-like molecule (Kronenberg, 2005). In contrast, nonclassical NKT can carry either $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$ TCR (Kronenberg, 2005). NKT cells can also produce cytokines with Th1, Th2, or Th17 profile depending on their environment and may thus influence inflammation and liver disease (Swain, 2008).

Dendritic Cells

Liver-resident dendritic cells (DCs) are mostly myeloid DCs (mDCs) and immature as they express low levels of

costimulatory molecules such as CD40, CD80, and CD86 and thus favor tolerance rather than activation of T cells under normal conditions (Jenne and Kubes, 2013; Crispe, 2014, 2011). Interaction between LSECs and liver-resident DCs contributes to maintaining a tolerogenic state in DCs (Schildberg et al., 2008). DCs can uptake and process antigens. This allows them to sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by various pattern recognition receptors (PRRs). Following antigen uptake and sensing, liver-resident DCs mature as they gain the capacity to migrate to the draining lymph nodes where they can transfer antigens and prime T cell responses (Jenne and Kubes, 2013; Crispe, 2014). The liver also contains plasmacytoid DCs (pDCs) that are the most potent IFN-producing cells in the body (Crispe, 2011) and are further recruited upon infection with hepatotropic pathogens (Feng et al., 2015) where they secrete type I and type III interferons in response to stimulation of Toll-like receptors (TLR)-7 and/or TLR-9 that recognize single-stranded RNA and bacteria-derived CpG motifs, respectively (Feng et al., 2015; Takahashi et al., 2010). Hence, both mDCs and pDCs play a key role in priming antigen-specific responses and tolerance.

Innate Lymphoid Cells

Innate lymphoid cells (ILCs) are innate immune cells that lack antigen specificity and are of lymphoid origin. They represent the innate immune counterparts of adaptive CD4 helper

T cells. They are subdivided based on their cytokine profile into ILC1, ILC2, and ILC3 with Th1-, Th2-, and Th17-like profiles, respectively (Eberl et al., 2015). The liver is primarily enriched in the ILC1 population that was previously confused with NK cells as they both secrete IFN- γ . However, recent gene expression studies demonstrated that liver ILC1 have a different transcriptomic profile as compared to liver-resident NKs (Robinette et al., 2015). The function of ILCs during pathogenic conditions in the liver is not well understood.

Adaptive T Lymphocytes and B Lymphocytes

The liver contains a higher frequency of CD8 T cells resulting in a reversed CD4:CD8 ratio as compared to the peripheral blood (Racanelli and Rehermann, 2006). The liver is also enriched in CD4, CD8 double positive and double negative T cells and $\gamma\delta$ T cells (Racanelli and Rehermann, 2006). Similar to the gut, the liver is enriched in Th17 cells, a subset of CD4 T cells producing inflammatory cytokines with antimicrobial properties such as IL-17 and IL-22 that may also have proinflammatory (IL-17) or hepatoprotective (IL-22) properties (Zenewicz et al., 2007; Foster et al., 2012; Lafdil et al., 2010). Finally, the liver has a low frequency of B cells (6%) as compared to the blood (Racanelli and Rehermann, 2006).

Tolerance versus Activation in the Liver

Liver tolerance was discovered when MHC-mismatched (allogeneic) livers were successfully grafted in pigs, whereas allografts of other organs like kidney, skin, and lungs were rejected (Calne et al., 1969). As discussed above, the liver contains many APCs including LSECs, KCs, and DCs that are important in immune surveillance. These APCs can capture and present self- and foreign antigens and have the unique capacity to partially prime pathogen-specific T cells while inducing tolerance to self-antigens (Crispe, 2011). In this section, we will discuss the mechanisms controlling the balance between activation and tolerance.

Antigen Presentation by Tolerogenic APCs

KCs, HSCs, hepatocytes, and LSECs can present self- and foreign antigens to naïve CD4 and CD8 T cells passing through the liver. Hepatocytes can also present antigens and contact lymphocytes in the sinusoid through the fenestration of the endothelium (Crispe, 2011). However, these cells express low levels of costimulatory molecules (signal 2) and cytokines important for T cells activation such as IL-12 (signal 3) (Crispe, 2011). Liver-resident DCs can present antigens but due to their immature phenotype and lack of CD4 T cell help, this results in generation of short-lived suboptimal CD8 T cells as compared to T cells primed by lymph node-resident DCs (Bowen et al., 2004; Schildberg et al., 2008). Furthermore, liver-resident APCs express high levels of inhibitory ligands such as programmed death-ligand 1 (PD-L1) and galectin-9 that can interact with their cognate exhaustion molecules programmed cell death-1 (PD-1) and T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3 (Tim-3), respectively (Crispe, 2011; Mengshol et al., 2010; Crispe, 2014). The expression of these ligands is upregulated during inflammation. PD-1 and Tim-3 are highly expressed on activated

T cells and cognate interaction with their ligands in the liver inhibits their effector functions and induces cell death (Golden-Mason et al., 2007; Radziewicz et al., 2007).

Tolerance via Immune Regulatory Cytokines and Molecules

Several cellular populations like KCs and LSECs contribute to tolerance through the secretion of anti-inflammatory cytokines such as TGF- β and IL-10 that inhibit T cell effector functions (Crispe, 2014). Liver-resident DCs and KCs also produce indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase (IDO), an enzyme involved in the first step of tryptophan catabolism to generate kynurenine, an immunosuppressive product that limits proliferation of antigen-specific T cells (Popov and Schultze, 2008; Crispe, 2014). Together this immune regulatory environment and tolerogenic APCs promote the generation of regulatory T cells (Tregs), which contribute to hepatic tolerance through secretion of anti-inflammatory cytokines and expression of inhibitory ligands (Chen et al., 2003; Dangi et al., 2012; Ichikawa et al., 2011; Li et al., 2008).

Break of Hepatic Tolerance and Activation of T Cells

Inflammatory and danger signals (e.g., proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, apoptotic bodies) and PAMPs released during an infection shift the balance toward activation rather than tolerance through activation and maturation of liver-resident DCs (Racanelli and Rehermann, 2006). Some matured DCs will uptake and present antigen locally where they will prime an early effector T cell response while others will uptake antigens, migrate to the lymph nodes, and prime antigen-specific CD4 and CD8 T cell responses (Barbier et al., 2012; Racanelli and Rehermann, 2006). Priming in the lymph nodes is critical to generating fully functional antigen-specific T cells (Bowen et al., 2004). Lymph node-primed T cells will then migrate back to the liver to eliminate the infection (Racanelli and Rehermann, 2006). It was recently reported that injection of TLR-9 ligands in mice induced a unique immune structure known as intrahepatic myeloid cell aggregates for T cell population expansion that supports massive nonantigen-dependent proliferation of CD8 T cells. Inflammatory monocytes cluster together to create an organized nonperfused structure with high expression of costimulatory molecules important for the expansion of effector cells (Huang et al., 2013). The presence and relevance of such structures in immunologic functions of human livers remain to be determined (Knolle et al., 2015).

Elimination of Effector T Cells

Following clearance of systemic infections, residual activated effector T cells are eliminated from the circulation via the liver. The LSECs constitutively express the intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 that mediate specific trapping of activated T cells in the liver in absence of local inflammatory signals (Parker and Picut, 2012; John and Crispe, 2004; Mehal et al., 1999). This was demonstrated by liver retention of activated but not resting cells after perfusion with a mixed immune cell population (Mehal et al., 1999). Trapped CD8 T cells may expand transiently but then undergo

apoptosis (John and Crispe, 2004). Activated effector T cells express the activation/exhaustion molecules PD-1 and Tim-3 that mediate T cell death upon binding their respective ligands PD-L1 and galectin-9 that are highly expressed in the liver (Mengshol et al., 2010). Trapped T cells can also be eliminated through lack of stimulatory signals (cytokines and costimulatory molecules) that mediate their survival in the liver.

Immunity to Hepatotropic Pathogens

The fenestrated endothelium protects the liver parenchyma from infection by foodborne or bloodborne pathogens. Although KCs and neutrophils are very efficient in immune surveillance (Jenne and Kubes, 2013), hepatotropic pathogens have evolved to exploit the liver metabolic pathways and tolerogenic environment to establish infection. Clearance of the infection is dependent on shifting the balance from tolerance to activation. Some foodborne pathogens like hepatitis A virus and hepatitis E virus are quickly cleared from the liver with limited long-term damage; other pathogens are able to establish persistence and chronic liver disease (Protzer et al., 2012; Lanford et al., 2011). Pathogen-related factors including the mode of infection, number of infected hepatocytes, and pathogen-specific immune evasion mechanisms are critical to shifting this balance. Similarly, host-related factors like age, gender, coinfections, and genetic polymorphisms are important in this process. In this section, we will discuss the immune response against representative persistent hepatotropic pathogens that cause significant morbidity, mortality, and liver disease worldwide.

Malaria

Malaria is a mosquito-borne parasite from the *Plasmodium* family. It utilizes the liver for part of its life cycle in humans known as the liver or pre-erythrocytic stage. Parasites are delivered in the skin as sporozoites following mosquito bite and migrate rapidly into the bloodstream to the liver where they establish infections in hepatocytes in the form of parasitophorous vacuoles (Bertolino and Bowen, 2015; Protzer et al., 2012). The pre-erythrocytic stage is very brief, lasting for less than a week and is asymptomatic. During that stage, malaria takes advantage of the tolerogenic environment of the liver to mature into merozoites that are released in the liver sinusoid where they infect red blood cells and enter the symptomatic erythrocytic stage (Sturm et al., 2006). The pre-erythrocyte asymptotic cycle is considered the rate-limiting stage before the parasite completes its life cycle and is the target of ongoing vaccine development against malaria. Plasmodium RNA released inside hepatocytes is sensed by the intracellular retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptor melanoma differentiation-associated protein 5 and induces a type I IFN response (Liehl et al., 2014; Haque and Engwerda, 2014). This IFN response recruits circumsporozoite protein (CSP)-specific CD8 T cells that are able to control the infection. Priming of CSP-specific CD8 T cells occurs in the draining lymph nodes of the skin but not in the liver (Chakravarty et al., 2007). The delay in recruiting these cells to the liver gives the parasite the opportunity to infect hepatocytes and complete its transformation into merozoites. Production

of IFN- γ and TNF along with cytotoxic activity is required for the elimination of malaria in both animals and humans (Van Braeckel-Budimir and Harty, 2014). Interestingly, CSP-specific CD8 T cells require help from IL-4-producing CD4 T cells (Carvalho et al., 2002; Morrot et al., 2005). In addition to the delay in recruiting CSP-specific T cells to the liver, *Plasmodium* spp. can also escape this response because of the low number of sporozoite-infected hepatocytes and the rapid release of merozoites (Bertolino and Bowen, 2015). Indeed, vaccination studies have demonstrated that prolonged antigen presentation is required for optimal CD8 T cell responses (Cockburn et al., 2010) and protection was associated with their recruitment to the liver in high numbers (Schmidt et al., 2008; Bertolino and Bowen, 2015).

Hepatitis C Virus

Hepatitis C virus (HCV) is a positive single-stranded RNA virus. HCV is transmitted via contaminated blood (Hoofnagle, 2002) and replicates primarily in hepatocytes. The majority of individuals acutely infected with HCV (~70%) develop persistent viremia and chronic liver disease while some (~30%) are able to spontaneously clear the virus.

Infected hepatocytes sense HCV RNA through PRRs such as TLR-3, protein-kinase R (PKR), and RIG-I. TLR-3 signals through TIR domain-containing adapter inducing IFN- β (TRIF), while PKR and RIG-I use the mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) culminating in production of type I (IFN α and IFN β) and type III (IFN λ 1, IFN λ 2 and IFN λ 3) interferons, expression of interferon-stimulated genes (ISGs), and creation of an antiviral state (Horner and Gale, 2013; Thomas et al., 2012; Marukian et al., 2011; Figure 2). A genetic polymorphism in the IFN λ 3 region can predict the efficacy of such response and spontaneous resolution of acute HCV (Heim and Thimme, 2014). Several HCV proteins target the IFN signaling pathways at different levels (Horner and Gale, 2013). The viral protease NS3/4A cleaves TRIF and MAVS, whereas the CORE, E2, and NS5A proteins can inhibit IFN signaling through interaction with the JAK/STAT pathway (Taylor et al., 1999; Foy et al., 2005; Taguchi et al., 2004; Figure 3). Viral RNA can also be transferred to liver-resident pDCs through exosomes and stimulate IFN secretion (Dreux et al., 2012). ISGs also include chemokines that can recruit NK cells and T cells to the liver. NK cells are activated early, irrespective of infectious outcome, and exhibit a biased profile with increased cytotoxicity and reduced cytokine production (Shoukry et al., 2011). Cognate interaction between NK cells and DCs is important to enhance the antigen-presenting capacity of DCs and may play an indirect role in enhanced HCV-specific T cell responses (Pelletier et al., 2010; Shoukry et al., 2011; Figure 2).

Despite early induction of ISGs in the liver, HCV-specific CD4 and CD8 T cell responses are delayed and appear around 6–8 weeks postinfection. This may reflect the failure to prime HCV-specific T cells in the liver because of its tolerogenic environment; delay in antigen uptake by liver-resident DCs and their migration to the lymph node to prime HCV-specific T cells that then migrate to the liver (Dey et al., 2014) and/or the ability of the virus to evade innate immune responses that are meant to break tolerance within the liver (Abdel-Hakeem

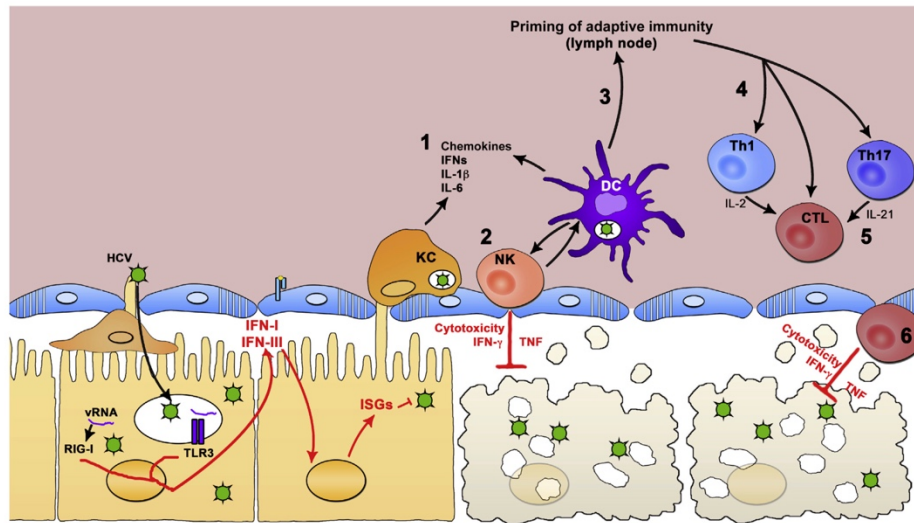


Figure 2 Successful immune response to hepatotropic pathogens. In this figure, hepatitis C virus (HCV) is used as an example of hepatotropic infection. Infected hepatocytes sense viral RNA and induce an antiviral IFN response. Kupffer cells (KCs) phagocytose pathogens and produce proinflammatory cytokines, chemokines, and IFNs (1). Proinflammatory cytokines and IFNs activate NK cells. NK cells kill infected cells using cytotoxic granules and FAS/FASL interactions (2). NK cells interact with dendritic cells (DCs); this cross talk leads to maturation and activation of both NK and DCs leading to secretion of antiviral IFN- γ and proinflammatory cytokines (2). Activated DCs uptake viral particles and migrate to draining lymph node to prime antigen-specific T cells (3). Pathogen-specific CD4 helper and cytotoxic CD8 T cells (CTLs) migrate to the liver in response to the local inflammatory response and production of chemokines (4). Th1 and Th17 cells provide helps to CTLs through secretion of IL-2 and IL-21 (5). CTLs eliminate infected cell by direct killing through granzyme and secretion of IFN- γ (6).

and Shoukry, 2014). Decline in HCV viral load is temporally associated with appearance of HCV-specific CD8 T cells (Thimme et al., 2001; Lechner et al., 2000). Spontaneous resolution is associated with the generation of a broad (targeting multiple viral epitopes) CD4 and CD8 T cell response of high frequency (magnitude) and the ability to secrete multiple cytokines and high cytotoxic activity (polyfunctional) (reviewed in Abdel-Hakeem and Shoukry, 2014). Depletion studies in the chimpanzee model have confirmed the essential and complementary roles of CD4 and CD8 T cells in resolution of HCV infection (Shoukry et al., 2003; Grakoui et al., 2003). A major characteristic of persistent HCV infection is the loss of CD4 T cell help. This facilitates loss of function of virus-specific CD8 T cells and their exhaustion. CD4 T cell help may be mediated through the secretion of cytokines such as IL-2 and IL-21 (Figure 2). IL-21-producing HCV-specific Th17 cells were detectable early during acute infection and correlated with the frequency of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) (Kared et al., 2013). IL-21 also rescued HCV-specific T cells from exhaustion mediated by the Tim-3/galectin-9 pathway (Kared et al., 2013). In individuals who fail to clear acute HCV infection, virus-specific CD8 T cells progressively lose function and upregulate several exhaustion markers (PD-1, Tim-3, and cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4)) and become prone to apoptosis (Park and Rehermann, 2014; Abdel-Hakeem and Shoukry, 2014;

Figure 3). Eventually, HCV-specific CD8 T cells become difficult to detect in the peripheral blood and accumulate in the liver as they maintain a highly exhausted phenotype (Kroy et al., 2014; Abdel-Hakeem and Shoukry, 2014). Chronic infection is also associated with a shift toward immune regulation with increased frequencies of Tregs (Kared et al., 2013; Park and Rehermann, 2014; Manigold and Racanelli, 2007). While such Tregs may have a beneficial role in reducing liver inflammation due to the infection, they cause the collateral damage of dampening the HCV-specific T cell response and facilitate viral persistence (Figure 3). HCV can also establish persistence through escape mutations in epitopes targeted by CD8 T cells. Emergence of escape mutations is facilitated by lack of CD4 T cell help (Grakoui et al., 2003). Although neutralizing antibodies against HCV typically appear later than T cell responses, recent data suggest that HCV can also mutate to escape neutralizing antibody responses (Abdel-Hakeem and Shoukry, 2014). In addition, cell-to-cell transmission through tight junctions between hepatocytes may help the virus avoid antibody-mediated neutralization (Protzer et al., 2012).

Hepatitis B Virus

Hepatitis B virus (HBV) is a DNA virus, and a member of the hepadnavirus family. It is transmitted through contaminated blood, sexual contact, and vertical mother-child transmission.

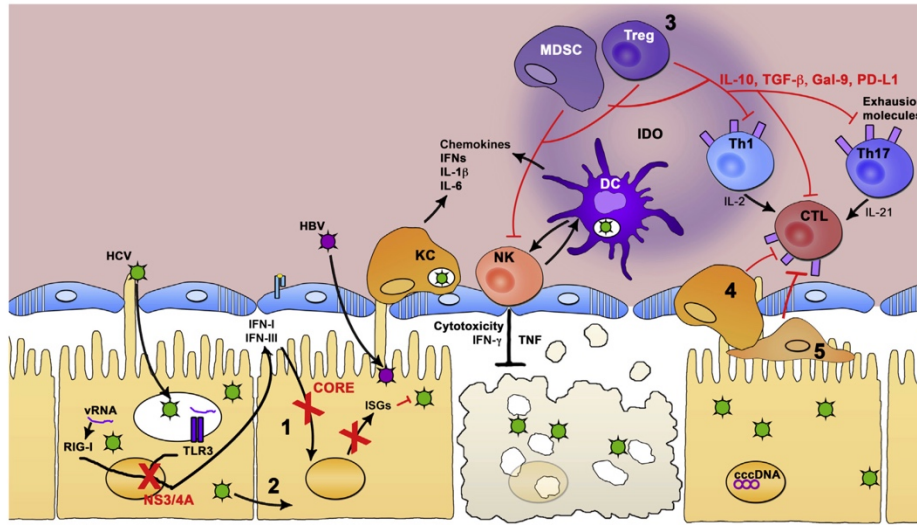


Figure 3 Mechanisms facilitating persistence of hepatotropic pathogens. Pathogen-derived proteins (in this example, NS3/4A and CORE from HCV) block the IFN response by cleavage of adapter molecules important for the transduction of IFN and through inhibition of IFNs signaling (1). Viral particles hide from the immune system by using cell-to-cell infection (HCV in green) (2). HBV (in purple) has the unique ability to avoid recognition by innate sensor and to persist hidden in the nucleus as cccDNA. The reduced or absent IFN response leads to late and inefficient priming of DCs with tolerogenic phenotype. Early during infection immune regulatory cells, myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and Tregs are induced (3). Adaptive immune cells express high level of exhaustion molecules (programmed cell death-1, Tim-3, and cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4). MDSCs and Tregs induce exhaustion and apoptosis of adaptive immune cells through secretion of IL-10, TGF- β , IDO, galactin-9, and expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) (3). KCs also induced exhaustion through secretion of IL-10 and expression of PD-L1. Activated hepatic stellate cells contribute to exhaustion of CTLs through upregulating the expression of PD-L1 in response to persistent inflammation (5).

With the exception of infection at birth, acute HBV infection is mostly self-resolved. However, HBV cannot be completely cleared, but it persists in the form of covalently closed circular DNA (cccDNA) in the nucleus of infected cells and can be reactivated under conditions of immune suppression (Nassal, 2015). Acute HBV infection usually goes undetected. The virus is able to evade innate immune sensing in the liver inducing very limited type I IFN responses *in vivo* and has thus been termed a 'stealth virus' (Wieland et al., 2004; Figure 3). Furthermore, interaction of the HBV capsid with TLR2 and TLR4 expressed by KCs; LSECs, and liver DCs induces the production of IL-6 and the immunomodulatory cytokine IL-10 that may inhibit the functions of NK and T cells (Cooper et al., 2005; Hosel et al., 2009; Rehermann, 2013). NK cells are activated during acute HBV but are functionally suboptimal. NK cells remain activated during chronic HBV infection and biased toward cytotoxicity and may act to control liver fibrosis (Rehermann, 2013; Schuch et al., 2014). Control of HBV infection is achieved primarily by CD8 T cells through antiviral cytokine (IFN- γ and TNF)-mediated noncytolytic mechanisms (Thimme et al., 2003; Wieland et al., 2004). The B cell response and generation of neutralizing antibodies are critical in HBV infection. Loss of B cells induced by the drug rituximab leads to reactivation of the virus (Garcia-Rodriguez et al., 2008). Finally, the large amounts of antigens (HBsAgs) found in the

blood are targeted by neutralizing antibodies instead of the virus leading to viral escape (Protzer et al., 2012). Similar to HCV, chronic HBV infection is characterized by loss of CD4 T cell help and exhaustion of HBV-specific CD8 T cells through upregulation of the inhibitory receptors PD-1, Tim-3, and CTLA-4 and interaction with their cognate ligands that are highly expressed in the liver (Rehermann, 2013; Schuch et al., 2014). HBV-specific CD8 T cells are also prone to Bcl2-interacting mediator-mediated apoptosis (Lopes et al., 2008). Finally, myeloid-derived suppressor cells, a heterogeneous population of myeloid-derived immune cells with strong suppressive properties, and Tregs further enhance the capacity of HBV to persist in the liver (Kong et al., 2014; Pallett et al., 2015; Manigold and Racanelli, 2007; Figure 3).

Immune-Induced Liver Pathologies

Liver fibrosis or scarring of the liver occurs due to chronic hepatic injury and inflammation induced by toxins, autoimmune disorders, and pathogens. This scarring may progress gradually to end-stage liver disease known as cirrhosis and in certain situations to liver cancer known as hepatocellular carcinoma (Zhang and Friedman, 2012; Hernandez-Gea and Friedman, 2011). In this section, we will discuss the immune

mechanisms involved in induction and progression of such pathologies.

The first step in liver fibrosis is the activation and proliferation of HSCs (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Activated HSCs undergo myoblastic transformation and produce excessive amounts of extracellular matrix (ECM) components, notably type I collagen. Altered matrix degradation leads to accumulation of ECM resulting in stiffness and progressive loss of hepatic functions (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). Liver-resident innate and adaptive immune cells can control activation of HSCs (Hernandez-Gea et al., 2012). For example, during chronic viral hepatitis, apoptotic bodies are released from infected hepatocytes and are sensed by KCs and HSCs. This induces secretion of proinflammatory cytokines and chemokines like IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF, as well as growth factors important for tissue repair such as TGF- β and platelet-derived growth factor (Hernandez-Gea and Friedman, 2011). TGF- β is the master fibrogenic signal driving the production of collagen type I and ECM by HSCs (Seki et al., 2007; Tahashi et al., 2002; Ueki et al., 1998). TGF- β is in turn regulated by other cytokines (e.g., IL-10) and infiltrating lymphocytes producing such cytokines. Proinflammatory cytokines act on activated HSCs to maintain their profibrogenic profile. During acute injury, this fibrogenic process acts as a repair mechanism to maintain the liver's architecture and function. Following viral clearance or elimination of the causative injury, inflammation is diminished and the level of IL-10, an anti-inflammatory and antifibrogenic cytokine, is elevated. IL-10 is mainly produced by macrophages with an M2 (anti-inflammatory) phenotype and contributes to elimination of activated HSCs through apoptosis (Louis et al., 1998; Mentink-Kane et al., 2011; Zhang et al., 2006). If the injury persists, the level of IL-10 remains low and profibrogenic cytokines remain highly expressed in the liver microenvironment.

NK cells have an antifibrotic effect as they can directly eliminate activated HSCs (Melhem et al., 2006). However, with persistent inflammation, NK cell function is inhibited and they become trapped in the ECM, which prevents direct killing of activated HSCs (Zhang and Friedman, 2012).

Th1 CD4 T cells contribute to hepatic inflammation but have antifibrotic properties as they secrete IFN- γ , which inhibits activation of HSCs (Baroni et al., 1996). On the other hand, Th2 cells are profibrogenic as secretion of IL-4 and IL-13 by these cells leads to direct activation of HSCs and enhanced TGF- β production by macrophages (Barron and Wynn, 2011; Chiamonte et al., 1999). IL-17-producing Th17 cells also have profibrogenic properties and their frequency is increased in fibrotic liver during HBV infection (Zhang et al., 2010). IL-17 can directly activate HSCs, increase the production of chemokines important for the recruitment of proinflammatory cells, and enhance signaling of the major profibrotic cytokines TGF- β (Fabre et al., 2014; Zhang et al., 2010; Zhao et al., 2010; Meng et al., 2012). Another Th17 cytokine, IL-22 seems to have a dual role where it can be hepatoprotective but is also associated with development of liver cancer (Zenewicz et al., 2007; Lafdil et al., 2010; Lim and Savan, 2014). Finally, Tregs have antifibrotic properties as they secrete IL-10 (Louis et al., 1998). Novel therapeutics targeting liver-resident lymphocytes and the cytokines they produce may prove to be an interesting

novel therapeutic avenue for liver fibrosis and to prevention of liver cancer (Sabat et al., 2014).

Conclusion

The liver is a secondary immune organ with a unique structure and immune cell composition where antigen processing, presentation, and priming of antigen-specific T cells are possible. Due to the lack of proper costimulatory molecules, lack of CD4 T cell help and abundance of immune regulatory cytokines and molecules, tolerance is favored under normal conditions. This tolerogenic environment is exploited by several hepatotropic pathogens to establish persistence within the host. A combination of pathogen-related and host-related factors is probably what tip the balance toward activation versus tolerance in some but not all infections. Acute inflammation induces tissue repair fibrogenic signals but persistent inflammation leads to different pathogenic forms of liver disease.

See also: Anatomy and Microanatomy of the Immune System: Effector T Lymphocyte Migration to and Within Non-Lymphoid Tissues; Microanatomy and Immunity in the Liver; Roles of Chemokines in Immune Cell Trafficking to Lymphoid Tissues. **Cells of the Innate Immune System:** Dendritic Cells and Dendritic Cell Subsets; ILC2 in Immunity; Kupffer Cells in Immunity; Natural Killer Cells; The Role of Invariant NKT Cells in Immunity. **Cytokines and Their Receptors:** IL-10; Interferon α/β ; Interferon γ : An Overview of Its Functions in Health and Disease; Interleukin-17 Family; New Interferons; TGF β . **Immunity to Bacterial, Parasitic and Fungal Infections:** Malaria, Immunity, and Immunopathology. **Immunity to Viral Infections:** Activation of CD8 T Lymphocytes during Viral Infections; Protective and Pathogenic T Cell Responses to Virus Infections; Sensors of Viral Infection. **T Cell Activation:** Conventional Dendritic Cells: Identification, Subsets, Development, and Functions; Modification of T Cell Functions at Sites of Infection and Inflammation; Recirculating and Resident Memory CD8⁺ T Cells; Th1 Cells; Th17 and Th22 Cells; The Differentiation and Function of Th2 and Th9 Cells; Treg Cells. **Transplantation:** Transplantation Immunology: Kidney and Liver.

References

- Abdel-Hakeem, M.S., Shoukry, N.H., 2014. Protective immunity against hepatitis C: many shades of gray. *Front. Immunol.* 5, 274.
- Barbier, L., Tay, S.S., Moguffog, C., Triccas, J.A., Mccaughan, G.W., Bowen, D.G., Bertolino, P., 2012. Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *J. Hepatol.* 57, 352–358.
- Baroni, G.S., D'Ambrosio, L., Curto, P., Casini, A., Mancini, R., Jezequel, A.M., Benedetti, A., 1996. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis. *Hepatology* 23, 1189–1199.
- Barron, L., Wynn, T.A., 2011. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300, G723–G728.
- Bertolino, P., Bowen, D.G., 2015. Malaria and the liver: immunological hide-and-seek or subversion of immunity from within? *Front. Microbiol.* 6, 41.
- Bilzer, M., Roggel, F., Gerbes, A.L., 2006. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int.* 26, 1175–1186.

- Bouwens, L., Baekeland, M., De Zanger, R., Wisse, E., 1986. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 6, 718–722.
- Bowen, D.G., Zen, M., Holz, L., Davis, T., Mccaughan, G.W., Bertolino, P., 2004. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J. Clin. Invest.* 114, 701–712.
- Caine, R.Y., Sells, R.A., Pena, J.R., Davis, D.R., Millard, P.R., Herbertson, B.M., Binns, R.M., Davies, D.A., 1969. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 223, 472–476.
- Carvalho, L.H., Sano, G., Hafalla, J.C., Morrot, A., Curotto de Lafaille, M.A., Zavala, F., 2002. IL-4-secreting CD4⁺ T cells are crucial to the development of CD8⁺ T-cell responses against malaria liver stages. *Nat. Med.* 8, 166–170.
- Chakravarty, S., Cockburn, I.A., Kuk, S., Overstreet, M.G., Sacchi, J.B., Zavala, F., 2007. CD8⁺ T lymphocytes protective against malaria liver stages are primed in skin-draining lymph nodes. *Nat. Med.* 13, 1035–1041.
- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., Wahl, S.M., 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁺ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.
- Chiaramonte, M.G., Donaldson, D.D., Cheever, A.W., Wynn, T.A., 1999. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest.* 104, 777–785.
- Cockburn, I.A., Chen, Y.C., Overstreet, M.G., Lees, J.R., van Rooijen, N., Farber, D.L., Zavala, F., 2010. Prolonged antigen presentation is required for optimal CD8⁺ T cell responses against malaria liver stage parasites. *PLoS Pathog.* 6, e1000877.
- Cooper, A., Tal, G., Lider, O., Shaul, Y., 2005. Cytokine induction by the hepatitis B virus capsid in macrophages is facilitated by membrane heparan sulfate and involves TLR2. *J. Immunol.* 175, 3165–3176.
- Crispe, I.N., 2011. Liver antigen-presenting cells. *J. Hepatol.* 54, 357–365.
- Crispe, I.N., 2014. Immune tolerance in liver disease. *Hepatology* 60, 2109–2117.
- Dal-Secco, D., Wang, J., Zeng, Z., Kolaczowska, E., Wong, C.H., Petri, B., Ransohoff, R.M., Charo, I.F., Jenne, C.N., Kubes, P., 2015. A dynamic spectrum of monocytes arising from *in situ* reprogramming of CCR2⁺ monocytes at a site of sterile injury. *J. Exp. Med.* 212, 447–456.
- Dangi, A., Sumpster, T.L., Kimura, S., Stolz, D.B., Murase, N., Raimondi, G., Vodovotz, Y., Huang, C., Thomson, A.W., Gandhi, C.R., 2012. Selective expansion of allogeneic regulatory T cells by hepatic stellate cells: role of endotoxin and implications for allograft tolerance. *J. Immunol.* 188, 3667–3677.
- Dey, A., Allen, J., Hankey-Giblin, P.A., 2014. Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages. *Front. Immunol.* 5, 683.
- Doherty, D.G., O'Farrelly, C., 2000. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol. Rev.* 174, 5–20.
- Dreux, M., Garaigorta, U., Boyd, B., Decembre, E., Chung, J., Whitten-Bauer, C., Wieland, S., Chisari, F.V., 2012. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. *Cell Host Microbe* 12, 558–570.
- Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J.P., McKenzie, A.N., 2015. Innate lymphoid cells. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. *Science* 348, aaa6566.
- Fabre, T., Kared, H., Friedman, S.L., Shoukry, N.H., 2014. IL-17A enhances the expression of profibrotic genes through upregulation of the TGF-beta receptor on hepatic stellate cells in a JNK-dependent manner. *J. Immunol.* 193, 3925–3933.
- Feng, Z., Li, Y., Mcknight, K.L., Hensley, L., Lanford, R.E., Walker, C.M., Lemon, S.M., 2015. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A viruses. *J. Clin. Invest.* 125, 169–176.
- Foster, R.G., Golden-Mason, L., Rutebemberwa, A., Rosen, H.R., 2012. Interleukin (IL)-17/IL-22-producing T cells enriched within the liver of patients with chronic hepatitis C viral (HCV) infection. *Dig. Dis. Sci.* 57, 381–389.
- Foy, E., Li, K., Sumpster Jr., R., Loo, Y.M., Johnson, C.L., Wang, C., Fish, P.M., Yoneyama, M., Fujita, T., Lemon, S.M., Gale Jr., M., 2005. Control of antiviral defenses through hepatitis C virus disruption of retinoic acid-inducible gene-1 signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2986–2991.
- Freudenberg, M.A., Freudenberg, N., Galanos, C., 1982. Time course of cellular distribution of endotoxin in liver, lungs and kidneys of rats. *Br. J. Exp. Pathol.* 63, 56–65.
- Friedman, S.L., Rockey, D.C., McGuire, R.F., Maher, J.J., Boyles, J.K., Yamasaki, G., 1992. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 15, 234–243.
- García-Rodríguez, M.J., Canales, M.A., Hernández-Maraver, D., Hernández-Navarro, F., 2008. Late reactivation of resolved hepatitis B virus infection: an increasing complication post rituximab-based regimens treatment? *Am. J. Hematol.* 83, 673–675.
- Geerts, A., 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21, 311–335.
- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J.A., Castelblanco, N., Rosen, H.R., 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J. Virol.* 81, 9249–9258.
- Grakoui, A., Shoukry, N.H., Woollard, D.J., Han, J.H., Hanson, H.L., Ghayeb, J., Murthy, K.K., Rice, C.M., Walker, C.M., 2003. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* 302, 659–662.
- Haque, A., Engwerda, C., 2014. Hepatocytes break the silence during liver-stage malaria. *Nat. Med.* 20, 17–19.
- Heim, M.H., Thimme, R., 2014. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *J. Hepatol.* 61, S14–S25.
- Hernandez-Gea, V., Friedman, S.L., 2011. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 425–456.
- Hernandez-Gea, V., Ghiassi-Nejad, Z., Rozenfeld, R., Gordon, R., Fiel, M.J., Yue, Z., Czaja, M.J., Friedman, S.L., 2012. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues. *Gastroenterology* 142, 938–946.
- Hoofnagle, J.H., 2002. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 36, S21–S29.
- Horner, S.M., Gale Jr., M., 2013. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nat. Med.* 19, 879–888.
- Hosel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjukusumo, R., Esser, K., Arzberger, S., Kirschning, C.J., Langenkamp, A., Falk, C., Buning, H., Rose-John, S., Protzer, U., 2009. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 50, 1773–1782.
- Huang, L.R., Wohleber, D., Reisinger, F., Jenne, C.N., Cheng, R.L., Abdullah, Z., Schildberg, F.A., Odenthal, M., Dienes, H.P., van Rooijen, N., Schmitt, E., Garbi, N., Croft, M., Kurts, C., Kubes, P., Protzer, U., Heikenwalder, M., Knolle, P.A., 2013. Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat. Immunol.* 14, 574–583.
- Ichikawa, S., Mucida, D., Tyznik, A.J., Kronenberg, M., Cheroutre, H., 2011. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *J. Immunol.* 186, 5549–5555.
- Jenne, C.N., Kubes, P., 2013. Immune surveillance by the liver. *Nat. Immunol.* 14, 996–1006.
- John, B., Crispe, I.N., 2004. Passive and active mechanisms trap activated CD8⁺ T cells in the liver. *J. Immunol.* 172, 5222–5229.
- Kared, H., Fabre, T., Bedard, N., Bruneau, J., Shoukry, N.H., 2013. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog.* 9, e1003422.
- Knolle, P.A., Botzcher, J., Huang, L.R., 2015. The role of hepatic immune regulation in systemic immunity to viral infection. *Med. Microbiol. Immunol.* 204, 21–27.
- Kong, X., Sun, R., Chen, Y., Wei, H., Tian, Z., 2014. gamma delta T cells drive myeloid-derived suppressor cell-mediated CD8⁺ T cell exhaustion in hepatitis B virus-induced immunotolerance. *J. Immunol.* 193, 1645–1653.
- Kronenberg, M., 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 877–900.
- Kroy, D.C., Ciuffreda, D., Cooperrider, J.H., Tomlinson, M., Hauck, G.D., Aneja, J., Berger, C., Wolski, D., Carrington, M., Wherry, E.J., Chung, R.T., Tanabe, K.K., Elias, N., Freeman, G.J., De Kruyff, R.H., Misdradj, J., Kim, A.Y., Lauer, G.M., 2014. Liver environment and HCV replication affect human T-cell phenotype and expression of inhibitory receptors. *Gastroenterology* 146, 550–561.
- Lafoll, F., Miller, A.M., Ki, S.H., Gao, B., 2010. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell. Mol. Immunol.* 7, 250–254.
- Lanford, R.E., Feng, Z., Chavez, D., Guerra, B., Brasky, K.M., Zhou, Y., Yamane, D., Perelson, A.S., Walker, C.M., Lemon, S.M., 2011. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and persistence of intrahepatic viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11223–11228.
- Lechner, F., Wong, D.K., Dunbar, P.R., Chapman, R., Chung, R.T., Dohrenwend, P., Robbins, G., Phillips, R., Klenerman, P., Walker, B.D., 2000. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.* 191, 1499–1512.
- Li, W., Kuhr, C.S., Zheng, X.X., Carper, K., Thomson, A.W., Reyes, J.D., Perkins, J.D., 2008. New insights into mechanisms of spontaneous liver transplant tolerance: the role of Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Am. J. Transplant.* 8, 1639–1651.
- Liehl, P., Zuzarte-Luis, V., Chan, J., Zillinger, T., Baptista, F., Carapau, D., Konert, M., Hanson, K.K., Carret, C., Lassnig, C., Muller, M., Kalinke, U., Saeed, M., Chora, A.F., Golenbock, D.T., Strobl, B., Prudencio, M., Coelho, L.P., Kappe, S.H., Superti-Furga, G., Pichlmair, A., Vigarío, A.M., Rice, C.M., Fitzgerald, K.A., Barchet, W., Mota, M.M., 2014. Host-cell sensors for Plasmodium activate innate immunity against liver-stage infection. *Nat. Med.* 20, 47–53.

- Lim, C., Savan, R., 2014. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 257–271.
- Lohse, A.W., Knolle, P.A., Bilo, K., Uhrig, A., Waldmann, C., Ibe, M., Schmitt, E., Gerken, G., Meyer Zum Buschenfelde, K.H., 1996. Antigen-presenting function and B7 expression of murine sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells. *Gastroenterology* 110, 1175–1181.
- Lopes, A.R., Kellam, P., Das, A., Dunn, C., Kwan, A., Turner, J., Peppas, D., Gilson, R.J., Gehring, A., Bertolotti, A., Maini, M.K., 2008. Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J. Clin. Invest.* 118, 1835–1845.
- Louis, H., Van Laethem, J.L., Wu, W., Quertinmont, E., Degraef, C., Van den Berg, K., Demols, A., Goldman, M., Le Moine, O., Geerts, A., Deviere, J., 1998. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 28, 1607–1615.
- Manigold, T., Racanelli, V., 2007. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *Lancet Infect. Dis.* 7, 804–813.
- Marukian, S., Andrus, L., Sheahan, T.P., Jones, C.T., Charles, E.D., Ploss, A., Rice, C.M., Dustin, L.B., 2011. Hepatitis C virus induces interferon-lambda and interferon-stimulated genes in primary liver cultures. *Hepatology* 54.
- Mehal, W.Z., Juedes, A.E., Crispe, I.N., 1999. Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J. Immunol.* 163, 3202–3210.
- Melhem, A., Muhanna, N., Bishara, A., Alvarez, C.E., Ilan, Y., Bishara, T., Horani, A., Nassar, M., Friedman, S.L., Safadi, R., 2006. Anti-fibrotic activity of NK cells in experimental liver injury through killing of activated HSC. *J. Hepatol.* 45, 60–71.
- Meng, F., Wang, K., Aoyama, T., Grivennikov, S.I., Paik, Y., Scholten, D., Cong, M., Iwasaki, K., Liu, X., Zhang, M., Osterreicher, C.H., Stickele, F., Ley, K., Brenner, D.A., Kisseleva, T., 2012. Interleukin-17 signaling in inflammatory Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143, 765–776 e1–3.
- Mengshol, J.A., Golden-Mason, L., Arikawa, T., Smith, M., Niki, T., McWilliams, R., Randall, J.A., McMahon, R., Zimmerman, M.A., Rangachari, M., Dobrinskikh, E., Bussion, P., Polyak, S.J., Hirashima, M., Rosen, H.R., 2010. A crucial role for Kupffer cell-derived galectin-9 in regulation of T cell immunity in hepatitis C infection. *PLoS One* 5, e9504.
- Mentink-Kane, M.M., Cheever, A.W., Wilson, M.S., Madala, S.K., Beers, L.M., Ramalingam, T.R., Wynn, T.A., 2011. Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13Ralpha2. *Gastroenterology* 141, 2200–2209.
- Morrot, A., Hafalla, J.C., Cockburn, I.A., Carvalho, L.H., Zavala, F., 2005. IL-4 receptor expression on CD8⁺ T cells is required for the development of protective memory responses against liver stages of malaria parasites. *J. Exp. Med.* 202, 551–560.
- Nassal, M., 2015. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. <http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>.
- Pallett, L.J., Gill, U.S., Quaglia, A., Sinclair, L.V., Jover-Cobos, M., Schurich, A., Singh, K.P., Thomas, N., Das, A., Chen, A., Fusai, G., Bertolotti, A., Cantrell, D.A., Kennedy, P.T., Davies, N.A., Haniffa, M., Maini, M.K., 2015. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. *Nat. Med.* 21, 591–600.
- Park, S.H., Rehermann, B., 2014. Immune responses to HCV and other hepatitis viruses. *Immunity* 40, 13–24.
- Parker, G.A., Picut, C.A., 2012. Immune functioning in non lymphoid organs: the liver. *Toxicol. Pathol.* 40, 237–247.
- Pelletier, S., Drouin, C., Bedard, N., Khakoo, S.I., Bruneau, J., Shoukry, N.H., 2010. Increased degranulation of natural killer cells during acute HCV correlates with the magnitude of virus-specific T cell responses. *J. Hepatol.* 53, 805–816.
- Popov, A., Schultze, J.L., 2008. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* 86, 145–160.
- Protzer, U., Maini, M.K., Knolle, P.A., 2012. Living in the liver: hepatic infections. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 201–213.
- Racanelli, V., Rehermann, B., 2006. The liver as an immunological organ. *Hepatology* 43, S54–S62.
- Radziejewicz, H., Ibegbu, C.C., Fernandez, M.L., Workowski, K.A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H.L., Steinberg, J.P., Masopust, D., Wherry, E.J., Altman, J.D., Rouse, B.T., Freeman, G.J., Ahmed, R., Grakoui, A., 2007. Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J. Virol.* 81, 2545–2553.
- Rehermann, B., 2013. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. *Nat. Med.* 19, 859–868.
- Robinette, M.L., Fuchs, A., Cortez, V.S., Lee, J.S., Wang, Y., Durum, S.K., Giffillan, S., Colonna, M., 2015. Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets. *Nat. Immunol.* 16, 306–317.
- Sabat, R., Ouyang, W., Woik, K., 2014. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat. Rev. Drug Dis.* 13, 21–38.
- Saha, B., Bala, S., Hosseini, N., Kody, K., Szabo, G., 2015. Kruppel-like factor 4 is a transcriptional regulator of M1/M2 macrophage polarization in alcoholic liver disease. *J. Leukoc. Biol.*
- Schildberg, F.A., Hegenbarth, S.I., Schumak, B., Scholz, K., Limmer, A., Knolle, P.A., 2008. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 957–967.
- Schmidt, N.W., Podymingogin, R.L., Butler, N.S., Badovinac, V.P., Tucker, B.J., Barjati, K.S., Lauer, P., Reyes-Sandoval, A., Hultings, C.L., Moore, A.C., Gilbert, S.C., Hill, A.V., Bartholomay, L.C., Harty, J.T., 2008. Memory CD8 T cell responses exceeding a large but definable threshold provide long-term immunity to malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14017–14022.
- Schuch, A., Hoh, A., Thimme, R., 2014. The role of natural killer cells and CD8(+) T cells in hepatitis B virus infection. *Front. Immunol.* 5, 258.
- Seki, E., De Minicis, S., Osterreicher, C.H., Kluwe, J., Osawa, Y., Brenner, D.A., Schwabe, R.F., 2007. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat. Med.* 13, 1324–1332.
- Shoukry, N.H., Grakoui, A., Houghton, M., Chien, D.Y., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Walker, C.M., 2003. Memory CD8⁺ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 197, 1645–1655.
- Shoukry, N.H., Pelletier, S., Chang, K.M., 2011. A view to natural killer cells in hepatitis C. *Gastroenterology* 141, 1144–1148.
- Sica, A., Invernizzi, P., Mantovani, A., 2014. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology* 59, 2034–2042.
- Sturm, A., Amino, R., van de Sand, C., Regen, T., Retzlaff, S., Renneberg, A., Krueger, A., Pollok, J.M., Menard, R., Heussler, V.T., 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* 313, 1287–1290.
- Swain, M.G., 2008. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin. Sci. (Lond.)* 114, 457–466.
- Taguchi, T., Nagano-Fujii, M., Akutsu, M., Kadoya, H., Ohgimoto, S., Ishido, S., Hotta, H., 2004. Hepatitis C virus NS5A protein interacts with 2',5'-oligoadenylate synthetase and inhibits antiviral activity of IFN in an IFN sensitivity-determining region-independent manner. *J. Gen. Virol.* 85, 959–969.
- Tahashi, Y., Matsuzaki, K., Date, M., Yoshida, K., Furukawa, F., Sugano, Y., Matsushita, M., Himeno, Y., Inagaki, Y., Inoue, K., 2002. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 35, 49–61.
- Takahashi, K., Asabe, S., Wieland, S., Garaigorta, U., Gastaminza, P., Isogawa, M., Chisari, F.V., 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 7431–7436.
- Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M., 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107–110.
- Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.M., Steiger, C., Ray, S.C., Chisari, F.V., 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.* 194, 1395–1406.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., Chisari, F.V., 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J. Virol.* 77, 68–76.
- Thomas, E., Gonzalez, V.D., Li, Q., Modi, A.A., Chen, W., Noureddin, M., Rotman, Y., Liang, T.J., 2012. HCV infection induces a unique hepatic innate immune response associated with robust production of type III interferons. *Gastroenterology* 142.
- Ueki, N., Ohkawa, T., Yamamura, H., Takahashi, K., Tsutsui, T., Kawai, Y., Yokoyama, Y., Amuro, Y., Hada, T., Higashino, K., 1998. Induction of calponin-h1 by transforming growth factor-beta1 in cultured human Ito cells, LI90. *Biochim. Biophys. Acta* 1403, 28–36.
- Van Braeckel-Budimir, N., Harty, J.T., 2014. CD8 T-cell-mediated protection against liver-stage malaria: lessons from a mouse model. *Front. Microbiol.* 5, 272.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., Chisari, F.V., 2004. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 6669–6674.
- Wisse, E., 1970. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J. Ultrastruct. Res.* 31, 125–150.
- Wisse, E., de Zanger, R.B., Charels, K., van der Smitsen, P., McCuskey, R.S., 1985. The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology* 5, 683–692.

- Yamada, M., Blaner, W.S., Soprano, D.R., Dixon, J.L., Kjeldbye, H.M., Goodman, D.S., 1987. Biochemical characteristics of isolated rat liver stellate cells. *Hepatology* 7, 1224–1229.
- Zenevich, L.A., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Karow, M., Flavell, R.A., 2007. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 27, 647–659.
- Zhang, D.Y., Friedman, S.L., 2012. Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 56, 769–775.
- Zhang, J.Y., Zhang, Z., Lin, F., Zou, Z.S., Xu, R.N., Jin, L., Fu, J.L., Shi, F., Shi, M., Wang, H.F., Wang, F.S., 2010. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 51, 81–91.
- Zhang, L.J., Zheng, W.D., Shi, M.N., Wang, X.Z., 2006. Effects of interleukin-10 on activation and apoptosis of hepatic stellate cells in fibrotic rat liver. *World J. Gastroenterol.* 12, 1918–1923.
- Zhao, L., Qiu De, K., Ma, X., 2010. Th17 cells: the emerging reciprocal partner of regulatory T cells in the liver. *J. Dig. Dis.* 11, 126–133.

Annexe III : Curriculum Vitae

Education and Training:

April 2013-Present	Ph.D Candidate in Virology and Immunology Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal (Canada) Director: Naglaa H. Shoukry, Ph.D
2010-2013	MSc, Microbiology and Immunology Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal (Canada) Director: Naglaa H. Shoukry, Ph.D
2007-2010	BSc, Molecular Biology, Microbiology, Genetics and Immunology Faculty of Medicine, University of Nice-Sophia Antipolis, Nice (France)

Fellowships, Awards and Honours:

Major Fellowships:

2014-2017	Canadian Institutes for Health Research (CIHR) Doctoral Fellowship – Ranked 1 st HIV priority competition 105000\$
2014-2017	Fonds de recherche en Santé du Québec (FRQS) - Declined Doctoral Fellowship – Ranked 1 st in Category 60000\$

2013-2017 **National CIHR Research Training Program for Hepatitis C (NCRTPHepC)**
Doctoral Fellowship
92000\$

2011-2013 **Excellence fellowship: Fondation Gabriel Marquis**
Master's Fellowship – Ranked 1st
8500\$

2007-2010 **CROUS de Nice**
Bachelor fellowship
10000euro

Other Fellowships:

October 2016 **Training fellowship to attend The liver meeting 2016 (CRCHUM)**
Ranked 3rd, 700\$

June 2014 **CIHR Travel Award to attend The Canadian Poster Competition (CIHR)**
1000\$

December 2014 **Excellence Fellowship (CRCHUM)**
Ranked 1st, 1500\$

December 2013 **Ph.D fellowship (CRCHUM)**
Ranked 4th, 1000\$

October 2013 **Training fellowship to attend The liver meeting 2014 (CRCHUM)**
Ranked 1st, 700\$

Awards:

April 2017 **Best poster presentation prize (CRCHUM)**
19th CRCHUM annual meeting, May 2015, Montréal (CANADA)
500\$

March 2017 **CASL Student Prize Canadian Association for the Study of the
Liver (CASL)**
Canadian Digestive Diseases Week (CDDW) 2017
750\$

March 2017 **Best oral presentation prize Canadian Network on Hepatitis C
(CANHEPC)**
6th Canadian HCV symposium, Banff (Canada)
400\$

January 2017 **Keystone Symposia scholarship National Institute of Diabetes
and Digestive and Kidney Diseases**
Injury, Inflammation and Fibrosis Keystone symposium (2017)
1200\$

August 2016 **Young Investigator travel award (AASLD)**
The Liver Meeting, November 2016, Boston (USA)
1000\$

June 2016	<p>Poster presentation prize Canadian Institutes for Health Research (CIHR)</p> <p>National poster competition for best Ph.D student, June 2016, Winnipeg (CANADA)</p> <p>250\$</p>
May 2016	<p>Eugenio-Rasio Excellence Award (FRQS)</p> <p>Best oral presentation</p> <p>18th CRCHUM annual meeting, May 2016, Montréal (CANADA)</p> <p>1000\$</p>
November 2015	<p>Oral presentation prize (2nd)</p> <p>FRQS AIDS-network student day, November 2015, Montréal (CANADA)</p> <p>300\$</p>
December 2014	<p>Oral presentation prize (2nd)</p> <p>17th CRCHUM annual meeting, May 2015, Montréal (CANADA)</p> <p>500\$</p>
November 2014	<p>Best oral presentation prize</p> <p>FRQS AIDS-network student day, November 2014, Montréal (CANADA)</p> <p>500\$</p>
June 2014	<p>Poster presentation prize Canadian Institutes for Health Research (CIHR)</p>

	National poster competition for best Ph.D student, June 2014, Winnipeg (CANADA) 500\$
March 2014	Poster Presentation Prize (Public's choice) Dept. of Microbiology and Immunology research day, University of Montreal 300\$
December 2013	Best poster presentation prize (CRCHUM) 16 th CRCHUM annual meeting, May 2015, Montréal (CANADA) 500\$
November 2012	Best oral presentation prize FRQS AIDS-network student day, November 2012, Montréal (CANADA) 500\$
November 2011	Oral presentation prize (3rd) FRQS AIDS-network student day, November 2011, Montréal (CANADA) 200\$

Honours and Distinctions:

June 2016	Canadian Institutes for Health Research Silver medal for Ph.D student (CIHR) Top 1% of Ph.D candidate in Canada
-----------	---

- March 2015 **Poster of Distinction, Canadian Digestive Diseases Week (CDDW) and Canadian association for the study of the liver (CASL)**
- June 2014 **Canadian Institutes for Health Research Gold medal for Ph.D student (CIHR)**
Top 0.1% of Ph.D candidate in Canada
- June 2010 **Bachelor honour list (NICE)**
Rank: 7/280

Publications:

Refereed publications:

Fabre T, Flores Molina M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Type III inflammation drives liver fibrosis by regulating TGF- β signalling through activation of MAPKs. *Science Translational Medicine, in revision.*

Hart KM, **Fabre T**, Sciruba JS, Gieseck RL III, Borthwick LA, Vannella KM, Acciani TH, de Queiroz Prado R, Thompson RW, White S, Soucy G, Bilodeau M, Ramalingam TR, Shoukry NH, Wynn TA. Type II immunity is protective in metabolic disease but exacerbates NAFLD 2 collaboratively with TGF- β . *Science Translational Medicine* (2017)

Book Chapters:

Fabre T, Shoukry NH. Immunology of the liver. Encyclopedia of Immunology, Elsevier Ltd. 2016.

Reviewing Activities:

Reviewer for PLOS ONE (since 2016)

Member of the reviewing committee for the 6th Canadian HCV symposium, 2016-2017.

Oral and Poster presentations:

Oral presentations:

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, **Shoukry NH**. Type III Inflammation Drives Liver Fibrosis Progression by Regulating TGF-Beta Signaling Through Activation of Mapks. Immunology 2017, May 2017, Washington DC (USA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Type III Inflammation Drives Liver Fibrosis Progression by Regulating TGF-Beta Signaling Through Activation of Mapks. Injury, Inflammation and Fibrosis Keystone symposium, March 2017, Snowbird (USA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. Canadian Digestive Diseases Week, March 2017, Banff (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. 6th Canadian HCV symposium, March 2017, Banff (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. The liver meeting 2016, November 2016, BOSTON (USA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. Montreal Immunology Meeting, November 2016, Montreal (Canada)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. FRQS-AIDS network day, November 2016, Montreal (Canada)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. 18th CRCHUM annual meeting, May 2016, Montreal (Canada)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. Intrahepatic IL-22 correlates with advanced liver fibrosis and sensitizes HSCs to TGF- β signaling in a p38-dependent manner. Dept. of Microbiology and Immunology research day, March 2016, Montreal (Canada)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. FRQS-AIDS network day, November 2015, Montreal (Canada)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. 17th CRCHUM annual meeting, May 2015, Montreal (Canada)

Fabre, T., Kared, H., Friedman, S.L. & Shoukry, N.H. IL-17A Enhances the Expression of Profibrotic Genes through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-Dependent Manner. 3rd Canadian HCV symposium, February 2014, Toronto (CANADA)

Fabre, T., Kared, H., Friedman, S.L. & Shoukry, N.H. IL-17A Enhances the Expression of Profibrotic Genes through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK-Dependent Manner. AIDS network day, November 2013, Montreal (Canada)

Fabre T, Kared H, Shoukry N.H. Role of Th17 cytokines in the progression of liver fibrosis using an *in vitro* model. AIDS network day, November 2012, Montreal (Canada)

Poster presentations:

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. National CIHR poster competition, June 2016, Winnipeg (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner.

Fibrosis: From basic mechanisms to targeted therapies, Keystone symposia, February 2016, Keystone (USA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner.

5th Canadian HCV symposium, February 2016, Montreal (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. The liver meeting 2015, November 2015, San Francisco (USA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. Montreal Immunology Meeting, November 2015, Montreal (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. 4th Canadian HCV symposium, March 2015, Banff (CANADA)

Fabre T, Flores M, Soucy G, Willems B, Villeneuve JP, Bilodeau M, Shoukry NH. IL-22 enhances TGF-beta pro-fibrotic function in hepatic stellate cells in a p38/MAPK dependent manner. Canadian Digestive Diseases Week (CDDW) 2015, March 2015, Banff (CANADA)

Fabre T, Kared H, Friedman S.L., Shoukry N.H. IL-17A Enhances Liver Fibrosis through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK dependent manner. National CIHR poster competition, June 2014, Winnipeg (CANADA)

Fabre T, Kared H, Friedman S.L., Shoukry N.H. IL-17A Enhances Liver Fibrosis through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK dependent manner. Dept. of Microbiology and Immunology research day, March 2014, Montreal (Canada)

Fabre T, Kared H, Friedman S.L., Shoukry N.H. IL-17A Enhances Liver Fibrosis through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells in a JNK dependent manner. Fibrosis: from Bench to bedside, Keystone symposia, March 2014, Keystone (USA)

Fabre T, Kared H, Friedman S.L., Shoukry N.H. IL-17A Enhances Liver Fibrosis through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells. 16th CRCHUM annual meeting, December 2013, Montreal (CANADA)

Fabre T, Kared H, Friedman S.L., Shoukry N.H. IL-17A Enhances Liver Fibrosis through Upregulation of the TGF-beta Receptor on Hepatic Stellate Cells. The Liver Meeting 2013, November 2013, Washington D.C (USA)

Fabre T, Kared H, Willems B, Wartelle C, Fournier C, Bilodeau M, Shoukry NH. Th17 cytokines enhance liver fibrosis via increased sensitization of hepatic stellate cells to TGF-beta stimulation. The International liver meeting 2013, April 2013, Amsterdam (The Netherlands)

Fabre T, Kared H, Shoukry N.H. Role of Th17 cytokines in the progression of liver fibrosis using an *in vitro* model. 15th CRCHUM annual meeting, december 2012, Montreal (Canada)

Fabre T, Kared H, Shoukry N.H. Role of Th17 cytokines in the progression of liver fibrosis using an *in vitro* model. Dept. of Microbiology and Immunology research day, March 2012, Montreal (Canada)

Fabre T, Kared H, Shoukry N.H. Role of Th17 cytokines in the progression of liver fibrosis using an *in vitro* model. 1st Canadian HCV symposium, February 2012, Montreal (CANADA)

Technical expertise:

. **Cell biology:** Tissue culture, working with primary human cells, working with infectious material (BSL2 and BSL3 conditions), isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), intra-hepatic lymphocytes (IHLs), tumor infiltrating lymphocytes (TILs) and splenocytes from mouse and human samples.

. **Immunology techniques:** Intracellular staining (ICS), proliferation assays (CFSE dilution), using BD LSR II multiparameter flow cytometers, and cell separation/cell sorting using BD FACS Aria. Enzymelinked immunosorbant assays (ELISA), multiplex flow-based quantification of cytokines (Legendplex), differentiation of T cells.

. **Virology techniques:** Extraction of viral RNA.

. **Molecular biology techniques:** PCR, real-time PCR, genotyping, primer design, DNA sequencing, RNA extraction, cloning, using Lasergene[®] software for the analysis of mutations, design of cloning strategies.

. **Histology:** Immunofluorescence staining (IF), immune-histochemistry (IHC), picro-sirius red, Hematoxylin and eosin, Masson's trichrome.

. **Mouse work:** I.P and I.V injections, basic necropsy skills, blood draw, induction of fibrosis using CCL4 and TAA, basic surgery skills, hepatic stellate cells purification.

. **Proteomic techniques:** immunoblotting, and immunoprecipitation.

. **Basic bacteriology and mycology techniques:** bacterial culture, bacterial identification, biochemical reactions and assessment of antimicrobial activity.

. **Microscopy:** Basic epi-fluorescence and confocal microscopy skills.

Additional expertises:

Graph/Statistics software: SigmaPlot and GraphPad Prism.

Scientific analysis software: Lasergene (molecular biology software), analysis using FlowJo[®] and SPICE[®] software (flow cytometry analysis software), analysis of immunofluorescence using FIJI and Visiomorph for advanced quantification of large and complex images.

Design software: Adobe illustrator and Adobe Photoshop CS6.

Student Supervision:

2017 and	Mohamed, Abdelnabi (Ph.d)	Flow cytometry, histology, mouse work microscopy
May-Aug 2016	Ambre, Malarbet (BSc)	Histology, proteomics and cellular biology
2014-2015	Manuel Flores (MSc)	Flow cytometry and cellular biology

Jun-Aug 2012	Phillipe, Willems (MD student)	Cellular biology
Jun-Aug 2011	Phillipe, Willems (Premed)	Molecular biology
Jun-Aug 2011	Yasmine , Youssef (MD student)	Molecular biology

LANGUAGE SKILLS:

English: Excellent, **French** (mother tongue): Fluent

Extracurricular activities:

1. Producing and Directing awareness video for World Hepatitis Day (2016):
<https://www.youtube.com/watch?v=DhqkCeTWN8o>
2. Member of the organizing committee for the Canadian Symposium for Hepatitis C (2016-2017)
3. Canadian Network on Hepatitis C (CANHEPC), Trainees Representative (2016-2017)

