HAL
open science

Le lien entre auto-immunité et immunosurveillance des cancers dans le cas des cholangites et du cholangiocarcinome

Juliette Paillet

To cite this version:

Juliette Paillet. Le lien entre auto-immunité et immunosurveillance des cancers dans le cas des cholangites et du cholangiocarcinome. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL009 . tel-03362701

HAL Id: tel-03362701

https://theses.hal.science/tel-03362701

Submitted on 2 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

université PARIS-SACLAY

Le lien entre auto-immunité et immunosurveillance des cancers dans le cas des cholangites et du cholangiocarcinome

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 Cancérologie : biologie - médecine – santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : UMRS 1138 Métabolisme Cancer et Immunité
Référent : Faculté de médecine

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 29 septembre 2020, par

Juliette PAILLET

Composition du Jury

Vassili SOUMELIS Pr, Institut Saint-Louis (U976)	Président
Sophie CONCHON Dr, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie (U1064)	Rapportrice
Emmanuel DONNADIEU Dr, Institut Cochin (U1016)	Rapporteur
Sébastien APCHER Dr, Gustave Roussy (U1015)	Examinateur
Christine MENETRIER-CAUX Dr, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (U1052)	Examinatrice
Guido KROEMER Pr, Centre de Recherche des Cordeliers (U1138)	Directeur de thèse
Chantal HOUSSET Pr, Centre de recherche Saint-Antoine (U938)	Invitée
Jonathan POL Dr, Centre de Recherche des Cordeliers (U1138)	Invité

Thèse de doctorat

NNT : 2020UPASL009

Sommaire

SOMMAIRE **1**

REMERCIEMENTS **3**

ABRÉVIATIONS **5**

AVANT-PROPOS **9**

INTRODUCTION **10**

I. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE HEPATIQUE 10
- A. Anatomie du foie 10
- B. Micro-anatomie hépatique 12
- C. Fonctions hépatiques 20

II. PATHOLOGIES HEPATIQUES 26
- A. Aperçu des maladies affectant le foie 26
- B. La cholangite biliaire primitive (CBP) 32
- C. La cholangite sclérosante primitve (CSP) 42
- D. Le cholangiocarcinome 50

III. AUTO-IMMUNITE ET INFLAMMATION 56
- A. Phénomène de tolérance immunitaire 56
- B. Mécanismes de l'auto-immunité 65
- C. Mécanismes de l'inflammation 71
- D. Inflammation et risque de cancer 80

IV. CANCER ET CONTEXTE IMMUNITAIRE 84
- A. Mécanisme tumoral et immunosurveillance 84
- B. Réponse immuntaire anti-tumorale 93
- C. Contexte immunitaire du cholangiocarcinome 103
- D. Auto-immunité, cholangites et cancer 114

HYPOTHESES ET OBJECTIFS **120**

RESULTATS **122**

I. RESUME 122

II. ABSTRACT 123

III. RESULTS 124
- A. Establishment and comparison of the two models of cholangitis, PBC and PSC 124
- B. T cell-dependent control of cholangiocarcinoma in PBC but not PSC hosts 125

C. Characteristics of the T cell-mediated anti-CCA immunosurveillance upon PBC 126
IV. FIGURES 129
A. Main figures 129
B. Supplemental figures 139
V. MATERIALS AND METHODS 148
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 160
I. DISCUSSION 160
A. Comparaison des deux modèles murins de cholangites 161
B. Contrôle de la croissance du CC, dépendante des lymphocytes T, après induction de la CBP mais pas de la CSP 162
C. Caractéristique de l'immunosurveillance contre le CC, médiée par les lymphocytes T, au cours de la CBP 165
II. PERSPECTIVES 169
A. Auto-immunité de la CBP et immunosurveillance du CC partagent un même antigène.. 169
B. De l'identification d'une cible thérapeutique aux applications cliniques 170
PUBLICATIONS 173
BIBLIOGRAPHIE 174
ANNEXE 197

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : Sophie Conchon et Emmanuel Donnadieu pour leur rôle de rapporteur ; Sébastien Apcher, Christine Ménétrier-Caux et Vassili Soumelis pour avoir accepté d'être examinateurs. Merci à Chantal Housset pour ses conseils.

Je veux évidemment remercier Guido Kroemer de m'avoir accueillie dans son laboratoire « Métabolisme, Cancer et Immunité ». Il m'a permis de réaliser ce travail de recherche de recherche dans d'excellentes conditions scientifiques. Merci à lui pour ses conseils et l'expérience qu'il a pu m'apporter.

Un immense merci à Jonathan qui m'a encadrée, accompagnée, m'a consacré du temps et sans qui tout ce travail ne serait pas autant abouti. Merci à lui pour l'immense aide qu'il m'a apporté, pour son soutien quand je pensais ne pas y arriver, pour sa patience, pour toutes les connaissances qu'il a pu me transmettre, les conseils pertinents qu'il a su me donner (et ça en fait beaucoup !).

Merci également à Jean-Pierre Couty pour m'avoir guidée avec bienveillance lors de ma soutenance de mi-thèse.

Un merci très spécial à l'association albi, pour leur soutien tout au long de ma thèse et leur apport dans mon sujet de recherche. Leur travail réalisé auprès et pour les patients est tellement nécessaire. Je remercie surtout Angela et Daniel Leburgue, Nicolas Richet et Pierre-Antoine Corret avec qui j'ai échangé en confiance durant ces 4 années.

Et je veux surtout remercier toute l'équipe qui m'a tant apporté humainement. Évoluer au sein d'un laboratoire aussi multiculturel est une chance rare de partage.

Un merci particulier à Sarah qui m'a prise sous son aile lorsque je suis arrivée au laboratoire. Merci à elle pour son aide si précieuse, pour sa grande gentillesse, toutes nos conversations politiques ou un peu moins politiques, à tous les bons moments (ou les pires journées infiltrats) et à notre amitié.

Merci aux filles, à Juliette, pour son panache et pour toutes les conversations, à Franci, pour sa curiosité et sa jovialité, à Elisa, pour son caractère et tous les *tips* si précieux, à Norma, pour sa bonté et son engagement et à tout ce qu'on partage, à Florine, pour son empathie. Merci à elles d'avoir apporté un peu de bonheur durant la thèse, pour le soutien et l'amitié qu'elles ont sus me donner.

Merci à Fatima, pour tous les bons moments passés ensemble, à notre complicité et à toutes ces fois où elle a finalement rallongé son séjour à Paris !

Merci à Sylvie, notre maman du labo, pour sa bienveillance et son brin de folie. Merci à Lynda pour son aide tellement précieuse au quotidien, son extrême gentillesse et sa douceur. Merci à Gautier pour l'aide en bio-informatique et en statistique, pour tous ces débats et tous les apéros. Merci à Mehdi pour son calme et les discussions politiques pertinentes.

Je veux aussi remercier Julie pour sa bonne humeur, son énergie et sa présence durant mon projet. Merci à Maria pour son énergie et tous les échanges (pas forcément scientifiques).

Je remercie également Chiara, Maria C, Isabelle et Erika pour leurs conseils avisés.

Merci à Adrianna, Giulia, Gerasimos, Léa, Allan, Yohann, Valentina, Chema, Adrien, Antoine, Hui, Omar, Wei, Laura, Mojgan, Flora, Manon, Federico, Shaoi, Karla et tous les autres, pour les moments partagés au laboratoire, à la cafet' ou en salle Danton !

Un grand merci également à Paule Opolon, pour sa patiente et toutes les explications lors de l'analyse de mes lames d'histologie. Merci également à tout le personnel des plateformes du CHIC et du CEF au CRC, et du module HCP à Gustave Roussy.

Un merci inconditionnel à mes parents pour leur immense soutient. Ils m'ont donnée la possibilité de faire les études de mon choix et m'ont toujours encouragée en ce sens. A ma maman, pour m'avoir appris le goût des arts graphiques et pour toutes les heures passées au téléphone à me rassurer. A mon frère et mon père pour les discussions, les balades et tout ce qu'on partage. A mes tantes Geneviève et Noëlle qui m'ont transmis leur combativité.

Merci aussi à mes amis du lycée et de l'INSA. A Alicia pour sa tolérance, son oreille attentive et nos longues conversations. A Reem, pour sa générosité, parce qu'elle a su me conseiller et me soutenir lorsque j'en avais besoin, et à tous les moments que nous avons partagés à Lyon puis à Paris.

A Gabriel, merci pour tout ce qu'il m'a apporté au quotidien, son soutien et son affection.

Je remercie toutes les personnes que j'ai pu croiser durant ma thèse, ou mes études, et qui ont contribué de près ou de loin à là où j'en suis aujourd'hui. Merci aux rencontres durant BIOTechno, et à ces professeurs de l'INSA qui ont su me redonner confiance en moi.

A mes grands-parents : Jeannette, Henry et Raymond, je sais qu'ils seraient fiers de moi.

Abréviations

ADCC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity

AID : Activation-induced cytidine deaminase

AIRE : Autoimmune regulator

AMA : Anti-mitochondrial autoantibody

ANA : Anti-nuclear autoantibody

APC : Antigen presenting cell

ATP : Adénosine-triphosphate

ATT : Alpha-1-antitrypsin

BCL : B-cell lymphoma

BCR : B cell receptor

CAF : Cancer-associated fibroblast

CBP : Cholangite biliaire primitive

CC : Cholangiocarcinome

CCL : C-C motif chemokine ligand

CCR : C-C motif chemokine receptor

CD : Cluster de différentiation

CDR : Complimentarity determining region

CHC : Carcinome hépatocellulaire

CMH : Complexe majeure d'histocompatibilité

CSF1 : Colony stimulating factor 1

CSP : Cholangite sclérosante primitive

cTEC : Cortex thymic epithelial cells

CTL : Cytotoxic T lymphocytes

CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

CXCL : C-X-C motif chemokine ligand

CXCR : C-X-C motif chemokine receptor

CYP : Cytochromes P450

DAMP : Damage associated molecular pattern

DC : Dendritic cell

dCC : Distale cholangiocarcinome

eCC : Extrahépatiques cholangiocarcinome

EMT : Epithelial–mesenchymal transition

Fas : Apoptosis antigen 1

FasL : Fas ligand

Fc : Fragment cristallisable

G-CSF : Granulocyte-colony stimulating factor

GITR : Glucocorticoid-induced TNFR-related protein

GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GWAS : Genome-wide association study

HAI : Hépatite auto-immune

HBV : Virus de l'hépatite B

HCV : Virus de l'hépatite C

HDV : Virus de l'hépatite D

HGF : Hepatocyte growth factor

HIF : Hypoxia-inducible factor

HLA : Human leukocyte antigen

HMGB1 : High mobility group box 1 protein

HSC : Hepatic stellate cell

iCC : Intrahépatique cholangiocarcinoma

ICD : Immunogenic cell death

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase

IFNγ : Interferon γ

IG : Intraductal growing

IgA : Immunoglobulines de type A

IgG : Immunoglobulines de type G

IgM : Immunoglobuline de type M

IL : Interleukine

iNKT : Invariant NKT cell

iNOS : Inducible nitric oxyde synthase

KC : Cellules de Kupffer

NKG2D : Killer cell lectin like receptor K1

LPS : Lipopolysaccharide

LSEC : Cellules endothéliales sinusoïdales

LX : Lipoxine

mAB : Monoclonal antibody

mDC : Myeloid dendritic cell

MDSC : Myeloid-derived suppressor cell

MEC : Matrice extra-cellulaire

MF : Myofibroblaste

MF-iCC : Mass-forming iCC

MICA/B : MHC class I polypeptide-related sequence A/B

MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MIP : Macrophages inflammatory protein

MMP : Métalloprotéase matricielle

MMR : Mismatch DNA repair

mTEC : Medullary thymic epithelial cells

NAFLD : Nonalcoholic fatty liver disease

NASH : Nonalcoholic steatohepatitis

NET : Neutrophil extracellular traps

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NK : Lymphocyte natural killer cells

NKT : Lymphocyte natural killer T

NO : Nitric oxyde

PAMP *:* Pathogen associated molecular pattern

pCC : Périhilaire cholangiocarcinome

pDC : Plasmacytoid dendritic cell

PDC-E2 : Pyruvate dehydrogenase complex subunit E2

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PD-1 : Programmed cell death 1

PG : Prostaglandine

PI : Periductal infiltrating

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PRR : Pattern recognition receptor

RNS : Reactive nitrogen species

ROS : Reactive oxygen species

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

TAM : Tumor-associated macrophage

TAN : Tumor-associated neutrophil

Tc : T cytotoxic

TCR : T cell receptor

TEM : TIE2-expressing macrophage

Tfh : T follicular helper lymphocyte

TG : Triglycérides

TGF : Tumour growth factor

Th : T helper

TLR : Toll like receptor

TLS : Tertiary lymphoid structure

TMB : Tumor mutational burden

TNF : Tumour necrosis factor

TP53 : Tumour protein 53

TRAIL : Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

Treg : Regulatory T lymphocyte

TXA_2 : Thromboaxane A_2

VEGF : Vascular endothelial growth factor

α-GalCer : alpha-Galactosylceramide

2OA-BSA : acide 2 octynoique conjugué à l'albumine bovine sérique

Avant-Propos

Le cancer est la première cause de mortalité en France et la deuxième dans le monde. La compréhension des mécanismes inhérents aux tumeurs a permis de mettre en évidence le rôle majeur du contexte immunitaire que ce soit lors de la tumorigenèse ou plus tard dans les processus d'échappement tumoral et de métastase. De ce fait, l'inflammation chronique est maintenant reconnue comme un des principaux facteurs de risque au développement d'un cancer. Dès lors, on observe chez les patients souffrant d'une cholangite sclérosante primitive, une maladie inflammatoire chronique des voies biliaires, une augmentation de l'incidence du cholangiocarcinome, cancer de l'arbre biliaire. A l'inverse, l'association du cholangiocarcinome et de la cholangite biliaire primitive, une maladie inflammatoire et auto-immune affectant les petits canaux biliaires, n'a jamais été décrite dans littérature.

C'est sur la base de cette observation que mon projet de doctorat a été initié entre notre laboratoire et l'association albi (association pour la Lutte contre les maladies inflammatoires du foie et des voies Biliaires).

Conformément à ce qui est autorisé par l'école doctorale, les parties "Results", "Figures" et "Materials and methods", issues directement de l'article "Autoimmunity associated with primary biliary cholangitis fuels the immunosurveillance of cholangiocarcinoma" actuellement en cours de soumission, ont été conservées en langue anglaise.

Introduction

I. Anatomie et physiologie hépatique

A. Anatomie du foie

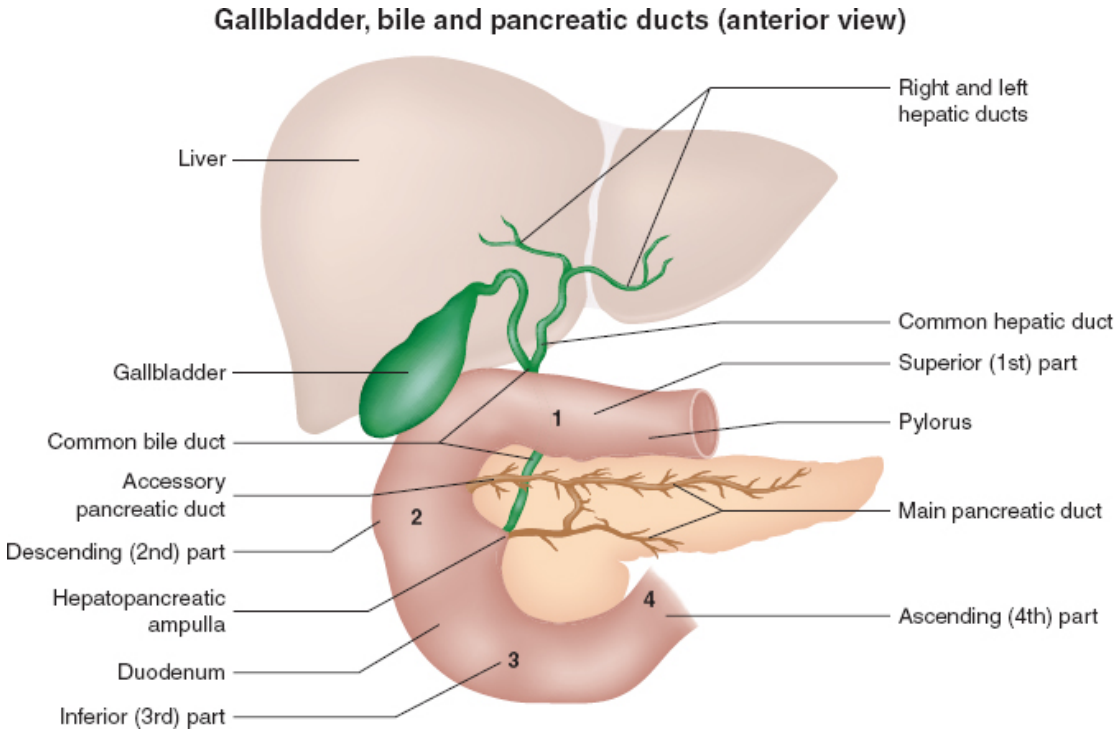


Figure 1 : Le foie et l'arbre biliaire.[1] Vision antérieure du foie, de la vésicule et des canaux biliaires, du canal pancréatique et commun atteignant l'intestin.

Le foie est le plus gros organe du corps, situé dans la cavité abdominale où il y est maintenu grâce à différents ligaments. Chez l'homme, il est constitué de deux lobes principaux, le droit et le gauche. (***Figure 1***) Selon la description de Couinaud (nommé selon le chirurgien), le foie compte huit segments anatomiques. (***Figure 2***) Cette segmentation se base sur la vascularisation du foie et l'architecture des voies biliaires intrahépatiques, qui permet à chaque lobe d'être indépendamment relié à la circulation générale et à l'arbre biliaire.

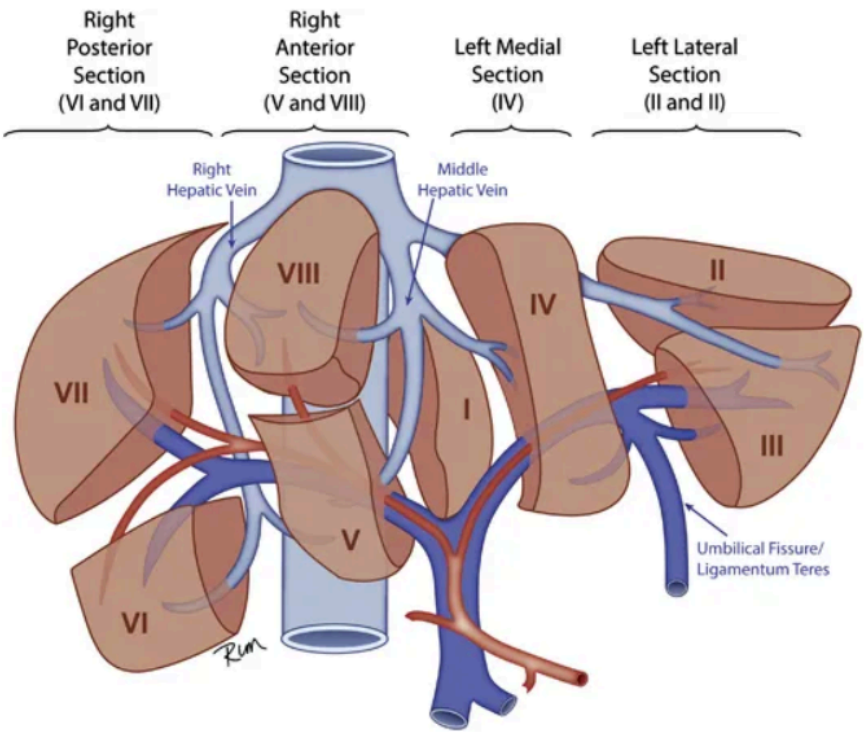


Figure 2 : La segmentation de Couinaud.[2] Les 8 division du foie selon la segmentations de Couinaud, les veines hépatiques droite et gauche irriguent individuellement les 8 segments.

Le foie est un tissu extrêmement vascularisé, d'où sa couleur rouge brun, et bénéficie d'un système porte unique (reliant deux systèmes veineux). Il est alimenté en sang par deux vaisseaux : la veine porte qui transporte les nutriments de l'appareil digestif jusqu'au foie, et dont l'apport sanguin représente 70% du sang total acheminé jusqu'à ce tissu ; et l'artère hépatique qui véhicule du sang oxygéné depuis le cœur, représentant 30% de l'approvisionnement sanguin. Les veines hépatiques, permettent quant à elles de drainer le sang du foie, en rejoignant la veine cave inférieure.

Le foie comprend également des canaux biliaires qui rejoignent le duodénum afin d'y acheminer la bile produite. (***Figure 2***) Leur structure change au long de l'arbre biliaire, d'abord très nombreux et intra-hépatiques, ils formeront le canal hépatique commun, qui est ensuite rejoint par le canal cystique, provenant de la vésiculaire biliaire, puis par le canal pancréatique, avant d'atteindre l'intestin au niveau du sphincter. Dans le foie, l'arbre biliaire suit l'architecture et les ramifications de la veine porte hépatique.[3–5]

B. Micro-anatomie hépatique

Organisation structurelle du foie

Chez l'homme et la plupart des mammifères, le parenchyme du foie est composé d'environ un million d'unités anatomiques appelées lobules hépatiques, de forme hexagonale et organisée autour d'une veine centrolobulaire. Dans un lobule, les hépatocytes y sont joints entre eux formant des travées hépatocytaires qui définissent des canicules biliaires. Ces travées sont alors retrouvées en rayon autour de la veine centrolobulaire. Il en est de même pour les sinusoïdes, que l'on retrouve entre les différentes travées hépatocytes. Aux six extrémités du lobule, se trouvent à la verticale les triades portales. Elles consistent en trois conduits spatialement très proches l'un de l'autre : un canal biliaire, une ramification de la veine porte hépatique et une branche de l'artère hépatique. (***Figure 3***) Chaque triade portale délimite donc trois lobules adjacents. On peut alors définir une zone péricentrale, autour de la veine centrolobulaire, et des zones périportales au niveau des triades portales.[4,6,7] a, de ce fait, conduit à une hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes dépendante de leur localisation. C'est ce que l'on appelle la zonation métabolique du foie, phénomène défini en 1977 par le groupe du Dr Kurt Jungerman. En effet, le sang qui arrive de l'artère hépatique, riche en oxygène, se mélange avec le sang de la veine porte, riche en nutriments. Il traverse alors le lobule à travers les sinusoïdes, dont les fenêtres des cellules endothéliales vont permettre un échange facilité avec les hépatocytes, et autres, qui vont consommer l'oxygène et les nutriments, mais également excréter des métabolites et autres déchets. Le sang n'a donc pas la même composition dans la zone péricentrale par rapport à la zone périportale. La création de ces différents gradients, et notamment celui en oxygène, résulte en la partition du lobule en trois zones où les hépatocytes ont des métabolismes et fonctions différentes. (***Figure 3***) Cette zonation métabolique concerne tout aussi bien le métabolisme des glucides, des protéines, des lipides, mais aussi des xénobiotiques.[8]

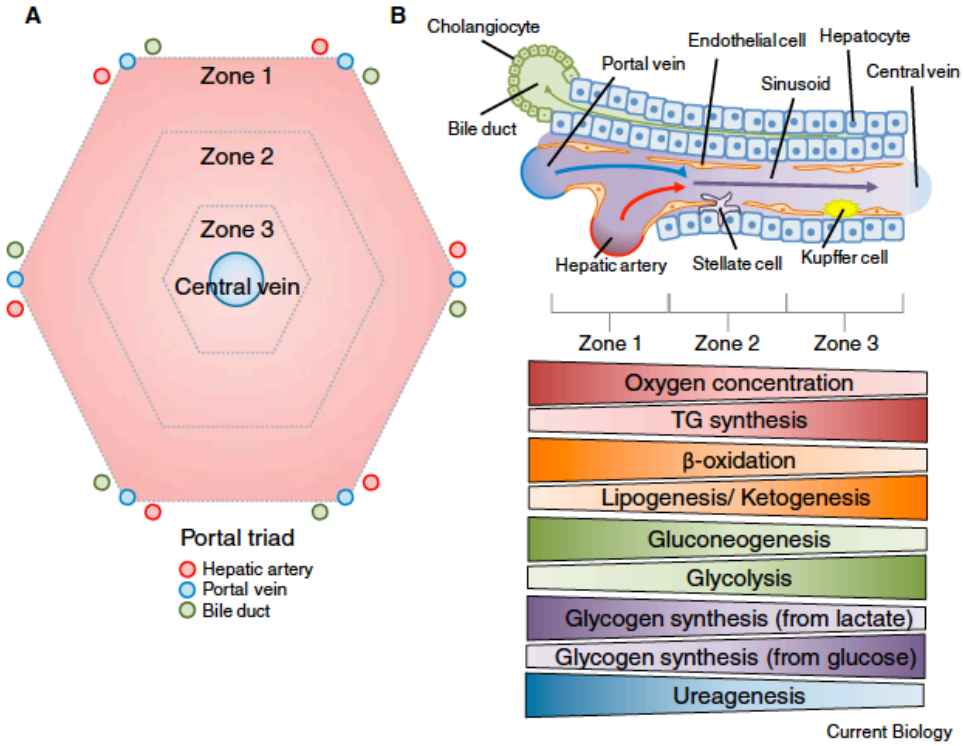


Figure 3 : La zonation métabolique du foie.[4] A) Représentation géométrique d'un lobule hépatique à chaque sommet se trouvent une triade hépatique. Chaque triade contient des branches de l'artère hépatique, de la veine porte et de l'arbre biliaire. Le sang oxygéné de l'artère hépatique se mélange au sang riche en nutriments de la circulation porte drainée de l'intestin. Lors du mélange, ce sang s'équilibre et s'écoule à travers le lobule à travers un réseau sinusoïdal avant de s'écouler vers la veine centrale. Cette organisation conduit à la formation d'un certain nombre de gradients, notamment en oxygène, en hormones, en nutriments et en déchets. La formation de ces gradient et l'organisation en conséquence des processus métaboliques ont été surnommées «zonation métabolique». B) Une représentation schématique d'une sinusoïde dans le foie et de la zonation métabolique correspondante. Il existe un certain nombre de types de cellules dans les sinusoïdes, notamment les hépatocytes, les cellules épithéliales biliaires (cholangiocytes), les cellules endothéliales, les cellules de Kupffer et les cellules stellaires hépatiques. Les gradients représentés sous le schéma concernent à la fois les molécules essentielles (oxygène) et les processus métaboliques le long de la sinusoïde. Ces processus sont essentiels à l'homéostasie métabolique du foie et plus généralement du corps. Par conséquent, il est important de noter la flexibilité de ces gradients en fonction de la disponibilité variable des nutriments.

Organisation de l'arbre biliaire

Les canaux biliaires, formés par les cholangiocytes, commencent à la sortie des canicules biliaires, au niveau des triades portales, et se présentent verticalement par rapport aux lobules. La transition entre les canicules, formées par les hépatocytes, et les tout petits canaux biliaires, appelés les ductules, se fait par les canaux de Hering. Ces derniers sont délimités par des cholangiocytes, des hépatocytes mais également des cellules souches bipotentes capables de se différencier en un de ces deux types cellulaires si besoin. Les ductules rejoignent alors les petits canaux biliaires intrahépatiques, mesurant entre 15 et 300nm de diamètre, qui fusionnent et forment les gros canaux intrahépatiques, mesurant entre 300 et 800nm de diamètre. Ces

derniers forment alors le canal hépatique droit ou gauche, d'abord intrahépatique, puis extrahépatique. (***Figure 4***) Dans la structure des gros canaux biliaires (>300nm), se trouve au-dessous de la couche de cholangiocytes la paroi du conduit, principalement constitué de tissu fibreux, contenant des myofibroblastes (MFs), des canaux lymphatiques et des vaisseaux sanguins, appartenant au plexus vasculaire péribiliaire. Cette structure assurant l'élasticité et l'épaisseur nécessaires à la physiologie des canaux. On retrouve également dans cette paroi des glandes péribiliaires, composées de cholangiocytes et cellules progénitrices, qui participent à la modification de la bile, produisent des mucines permettant de protéger l'épithélium biliaire, mais participeraient également à l'immunité locale de l'arbre biliaire. A noter que ces glandes peuvent également se situer à l'extérieur de cette paroi, elles sont alors qualifiées d'extramurales.[9,10]

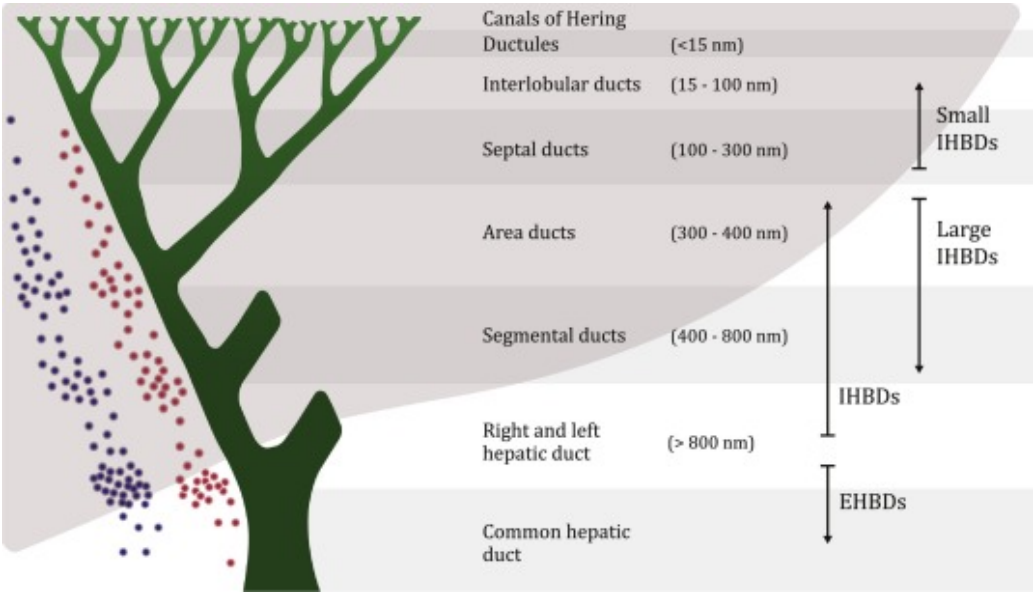


Figure 4 : L'architecture des voies biliaires.[10] Vue d'ensemble schématique et nomenclature des canaux intra et extra-hépatiques de l'arbre biliaire. Les points bleus représentent la localisation, le long de l'arbre, des glandes péri-biliaires extramurales, tandis que les points rouges représentent la localisation des glandes péri-biliaires intramurales. La densité des glandes péri-biliaires est élevée autour des bifurcations et clairsemée autour des canaux septaux. Les canaux septaux sont classés comme petits canaux mais leur épithélium ressemble à celui des grands canaux biliaires.

Composition cellulaire du foie

Le foie est composé principalement d'hépatocytes (***Figure 5***), mais pas seulement, chacun des types cellulaires possède sa fonction spécifique dans la globalité du rôle du foie.

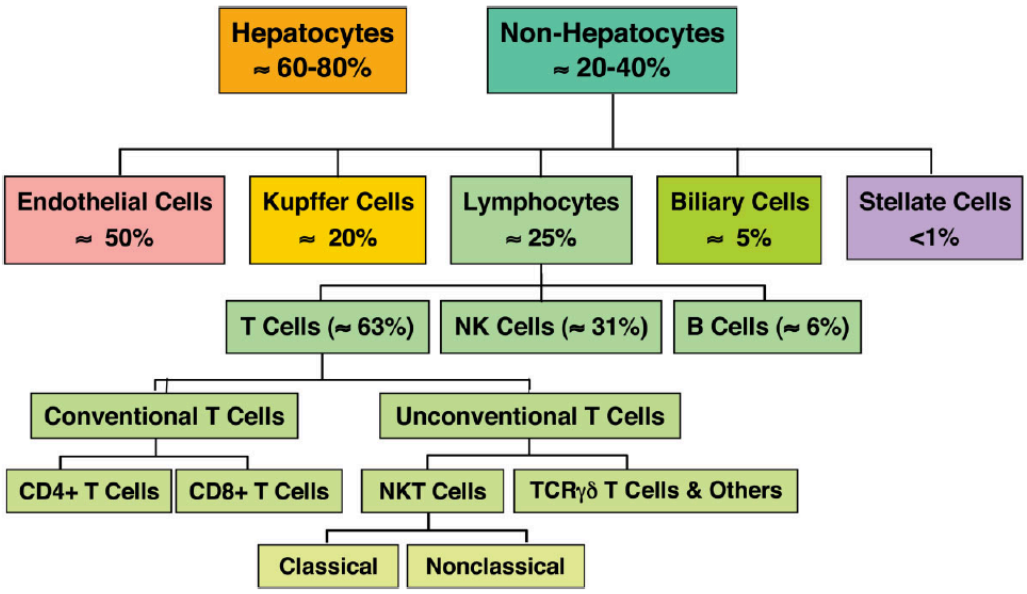


Figure 5 : La composition cellulaire du foie sain.[11] Les chiffres indiquent la fréquence estimée de chaque population par rapport au nombre total de cellules parenchymateuses et non parenchymateuses dans le foie.

– **Les hépatocytes** : représentants majoritaires du parenchyme hépatique, ils représentent entre 60 et 80% des cellules du foie. Ce sont des cellules épithéliales qui assurent la très grande majorité des fonctions hépatiques. Elles forment, avec les autres hépatocytes, au niveau d'une ou deux de leurs membranes apicales une canicule biliaire, où elles sécrètent les premiers éléments qui formeront la bile. A proximité de la membrane basale des hépatocytes, des sinusoïdes assurent la circulation du sang dans le parenchyme hépatique (ce qui rend possible un certain nombre de fonctions des hépatocytes).[4,11,12] (***Figure 6***)

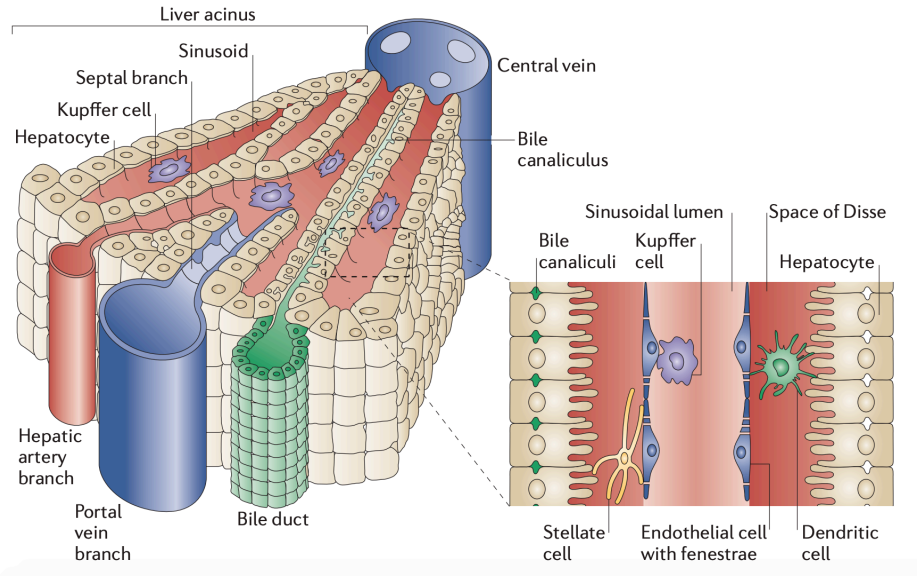


Figure 6 **: L'organisation tridimensionnelle du foie.**[13] Les veines portes intra-hépatiques donnent naissance à des branches septales qui drainent le sang dans les sinusoïdes. Ces dernières composent le système de distribution,

qui transporte le sang à travers l'acinus hépatique vers la veine centrale. L'artère hépatique se termine par des branches axiales parallèles à la veine porte qui rejoignent les sinusoïdes. Les sinusoïdes sont bordées de cellules endothéliales morphologiquement et phénotypiquement uniques (voir encadré sur le côté droit) qui se caractérisent par l'absence de jonctions serrées, l'absence d'une membrane basale reconnaissable et la présence de fenêtres ouvertes organisées en tamis. L'endothélium sinusoïdal est entrecoupé de macrophages connus sous le nom de cellules de Kupffer et recouvre l'espace de Disse, qui contient des protéines de la matrice extracellulaire et des fibroblastes appelés cellules stellaires hépatiques. Les cellules dendritiques du parenchyme sortent du foie par l'espace de Disse.

- **Les cholangiocytes** : ce sont les cellules épithéliales qui forment les canaux biliaires. Les cholangiocytes ont la principale fonction de modifier la bile primaire sécrétée par les hépatocytes. Cela passe notamment par une alcalination de la bile grâce à l'excrétion de HCO_3^-, effet régulé par plusieurs hormones gastro-intestinales (sécrétine, somatostatine…), mais également par la présence des acides biliaires. Les cholangiocytes sont présents à partir du canal de Hering (qui fait la transition entre la canicule biliaire formé par les hépatocytes et le canal biliaire). Le pôle apical des cholangiocytes est couvert de nombreuses villosités qui permettent d'augmenter la surface d'échange au sein de la lumière des canaux biliaires. La présence de cils au niveau de leur membrane apicale assure un rôle de senseur qui régule leur fonction sécrétrice.[10,14] On observe également une importante hétérogénéité entre les cholangiocytes selon leur localisation dans l'arbre biliaire.[15] Notamment, la taille des cholangiocytes suit généralement celle des canaux biliaires, et leur ratio noyau/cytoplasme est plus grand au niveau des petits canaux biliaires en comparaison avec les grands, indiquant un stade moins différencié chez les petits cholangiocytes.[16] Ces différences ne sont pas uniquement morphologiques, mais également biochimiques. En effet, il apparaît que les petits canaux biliaires semblent moins exprimer de récepteur ou transporteur jouant un rôle dans la modification de la bile primaire, mais sécrètent de l'eau et des électrolytes par un mécanisme dépendant des ions Ca^{2+}.[17–19] Les grands cholangiocytes, quant à eux, secrètent les principaux fluides biliaires.[15] (***Tableau 1***) De même, l'annexine-V et BCL(*B-cell lymphoma*)-2 sont, par exemple, surtout exprimés par les petits cholangiocytes. Le rôle anti-apoptotique de ces protéines joue probablement un rôle dans la résistance des cholangiocytes des petits canaux biliaires aux drogues et métabolites.[20,21] Cela semble montrer que ces derniers ont surtout un rôle dans l'acheminement de la bile vers les plus gros canaux, afin qu'elle soit modifiée.

Markers	Small Ducts	Large Ducts
γ-Glutamyltranspeptidase	not expressed	expressed by interlobular bile ducts
Alkaline phosphatase	not expressed	expressed by interlobular bile ducts
Leucine amino peptidase	not expressed	expressed by interlobular bile ducts
Cytochrome P4502E1	not expressed	expressed
Secretin receptor	• not expressed • do not respond to secretin	• expressed • response to secretin with increased ductal secretion
CFTR	• not expressed • no Cl^- efflux	• expressed • Cl^- efflux in response to secretin
Cl^-/HCO_3^- exchanger	• not expressed • Cl^-/HCO_3^- exchanger activity	• expressed • Cl^-/HCO_3^- exchanger activity in response to secretin
Somatostatin receptor ($SSTR_2$)	• not expressed • do not respond to somatostatin	• expressed • response to somatostatin with decreased secretin-induced ductal secretion
Endothelin (ET_A and ET_B) receptors	• expressed • do not inhibit secretin-induced bile secretion • participate in bile secretion through a Ca^{2+}-dependent and cAMP-independent pathway	• expressed • inhibit secretin-induced ductal secretion
Na^+-dependent ABAT	not expressed	expressed
Cytochrome P4502E1	not expressed	expressed

Tableau 1 : Les facteurs différentiellement exprimés entre petits et grands cholangiocytes (modifié de Kanno et al, Hepatology, 2000).[15] Expression différentielle de gènes et protéines importantes dans la régulation des fonctions hétérogènes de l'épithélium biliaire intra-hépatique. Ces données ont été obtenues à partir d'un certain nombre d'études visant à élucider l'hétérogénéité fonctionnelle de l'épithélium biliaire intra-hépatique chez l'homme.

- **Les cellules endothéliales sinusoïdales** (LSEC pour *Liver sinusoidal endothelial cell*) : ces cellules délimitent les sinusoïdes hépatiques. Ces derniers sont des vaisseaux sanguins qui transportent le sang de l'artère hépatique et de la veine porte hépatique jusqu'à la veine centrolobulaire (qui forme ensuite la veine hépatique). Les LSECs ont également la particularité de ne pas avoir de lame basale et d'être percées de fenêtres d'un diamètre d'environ 50 à 280nm. Cela forme une structure en tamis, indispensable au passage de fluides, solutés et particules de l'espace de Disse à la circulation générale.[4,22] (***Figure 6***)
- **Les cellules stellaires hépatiques** (HSC pour *hepatic stellar cell*) : Ces cellules sont principalement localisées dans l'espace de Disse. A l'état quiescent, ces cellules ont pour principale fonction le stockage de la vitamine A dans des gouttelettes lipidiques. Lors de lésions hépatiques, les HSCs sont activées et perdent les gouttelettes de stockage de la vitamine A et se divisent intensément. Elles acquièrent alors un phénotype de nature fibroblastique dont la fonction est la synthèse et sécrétion des protéines constituant la matrice extracellulaire (MEC). Elles sont donc responsables des dépôts de collagènes pouvant être à l'origine de fibroses hépatiques.[4,22]
- **Les cellules de Kupffer** (KCs pour *Kupffer cells*) : ces cellules sont les macrophages résidents du foie et elles représentent la plus grande population de macrophages

résidents du corps. On les retrouve au niveau de l'espace de Disse (***Figure 6***) ce qui leur permet de phagocyter directement les pathogènes provenant du tractus intestinal via la circulation porte afin de les empêcher de passer dans la circulation générale.[23,24] Elles sont donc la première ligne de défense immunitaire hépatique. De par leur importante activité phagocytaire et l'expression à leur surface d'un grand nombre de récepteurs du complément, tel que CR1, 2 et 3 (*complement receptor*),[25–27] mais aussi des récepteurs au Fc (*fragment cristallisable*).[28,29] De plus les KCs sont également responsables de l'élimination des érythrocytes ou tout autre cellule du parenchyme morts ou mourants et des débris.[30] Cependant, à l'état basale, ces cellules de Kupffer ont généralement un rôle tolérogène ce qui a pour but d'éviter des dommages hépatiques potentiellement causé par l'exposition continue à des antigènes provenant de l'appareil gastro-intestinal, par exemple via l'expression d'interleukine (IL) 10 et de TGF (*tumour growth factor)* β.[31,32] Notamment, la stimulation de celles-ci via les TLRs (*toll like receptors*) 4, 7 et 9 n'induit qu'un faible production de cytokines pro-inflammatoires, mais augmente leur sécrétion d'IL10,[33] fortement immunosuppressive.[34] Cela semble en partie dû à l'expression de régulateurs négatifs dont IRAK-M (*interleukin-1 receptor-associated kinase M*), qui assure une faible réactivité des KCs suite à leur activation.[35] En effet, ces derniers ont un phénotype plutôt différent des macrophages résidents d'autres tissues. Ces derniers étant majoritairement CD (cluster de différentiation) $11b^+$, alors que les macrophages du foies (ie. $F4/80^+$) expriment en grande proportion CD68. Les KCs $CD68^+$ possèdent une forte capacité à produire des ROS (*reactive oxygen species*) et à phagocyter, mais montrent une faible sécrétion de TNF (*tumour necrosis factor*). Ils semblent également très compétents pour éliminer les pathogènes.[36] A l'opposé, les KCs $CD11b^+$, minoritaires, ont un plus faible pouvoir phagocytaire mais leur activation induit une forte production de cytokines pro-inflammatoires, et leur nombre semble fortement augmenter lors d'infections bactériennes. Cela pourrait indiquer qu'ils sont en fait nouvellement recrutés.[33,36] Bien que les KCs aient donc généralement un rôle protecteur du parenchyme hépatique, via la sécrétion d'IL10 ou de MIP (*macrophages inflammatory protein*) 2 par exemple ;[37,38] elles sont également impliquées dans de nombreuses pathologies

hépatiques (formation de la fibrose à la suite d'infection par les virus de l'hépatite, les stéatoses alcooliques et non-alcooliques, les cancers hépatiques…).[39] En particulier, les dommages provoqués au niveau du foie après l'exposition à des composés hépatotoxiques tels que la concanavaline A ou le tétrachlorure de carbone, provoque une activation et augmentation de la proportion de KCs $CD11d^+$. Ces derniers surexpriment alors FasL (*Fas ligand*), leur permettant d'induire l'apoptose chez les hépatocytes, et donc d'augmenter les lésions dans le parenchyme.[40] Cependant, la principale source des atteintes hépatiques semble provenir de la production de ROS par les KCs $CD68^+$. Ces derniers sont en réalités activés par le TNF produit par les KC $CD11b^+$.[41] De ce fait, bien que ces derniers ne soient pas les effecteurs principaux des lésions hépatiques, leur activation mène à l'orchestration d'une réponse immunitaire capable d'éliminer les pathogènes, mais également de détériorer le foie.

- **Autres cellules immunitaires** : les autres cellules immunitaires présentes dans le foie sont principalement les lymphocytes T ou NK (*natural killer*), que l'on retrouve plutôt au niveau des sinusoïdes à l'état basale. Ces derniers possèdent une activité cytolytique importante contre les cellules tumorales ou infectées par des virus. Leur activation est finement régulée par des signaux inhibiteurs, qui sont dominants, et des signaux activateurs, permettant la reconnaissance de cellules dans un état non physiologique. Le foie contient un nombre important de ces cellules NK ainsi que de lymphocytes T non conventionnels.[11,42,43] Parmi ces derniers sont caractérisés les lymphocytes NKT (*natural killer T*), qui sont des lymphocytes T avec un répertoire de TCR (*T cell receptor*) réduit, partageant des caractéristiques communes avec les cellules NK, et reconnaissant des antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d, protéine apparentée aux molécules du CMH (complexe majeure d'histocompatibilité).[44–46] On retrouve également des lymphocytes Tγδ, qui, à l'inverse des lymphocytes T classiques, ont leur TCR composé d'une chaîne γ et une δ, et non d'une chaîne α et une β. Leur répertoire de TCR est également réduit, par rapport au lymphocytes T conventionnels, et ils reconnaissent une faible quantité d'antigènes mais de nature très différentes (lipidiques, protéiques…) sans forcément nécessiter de molécule de CMH pour les présenter.[47–49] Les lymphocytes Tγδ dans le foie représente entre 10% et 35% des

lymphocytes T totaux présent dans ce tissue, ce qui particulièrement élevé.[50] cependant leur fonction exacte dans le foie n'est pas claire. Finalement, le foie contient également des cellules dendritiques (DCs pour *dendritic cells*) que l'on retrouve particulièrement autour des veines centrolobulaires et/ou dans les espaces portes contenant les plus gros vaisseaux.[11]

C. Fonctions hépatiques

Le foie est un organe répondant à plusieurs fonctions vitales et essentielles au maintien de l'homéostasie :[51]

Production de la bile et son excrétion vers le duodénum (1er tiers de l'intestin) : la bile est composée principalement d'eau, d'électrolytes, d'acides biliaires, de cholestérols, de phospholipides, de pigments biliaires et de bilirubine. Elle possède deux fonctions principales : permettre d'émulsifier les corps gras du bol alimentaire afin de favoriser leur digestion, mais également l'élimination par les fèces de métabolites ou xénobiotiques qui ne sont pas excrétés par les reins. Dans l'intestin, les acides biliaires sont transformés en acides biliaires secondaires par le microbiote intestinal puis réabsorbés au niveau de l'iléum (denier tiers de l'intestin) afin d'être « recyclés » au niveau de foie, c'est ce que l'on appelle la circulation entéro-hépatique. Les hépatocytes produisent tout d'abord une bile « primaire » excrétée au niveau de canalicules composée d'eau, d'acides biliaires, de bilirubine, de phospholipides de cholestérol et de protéines tels que l'apotransferrine ou les immunoglobulines de type A (IgA). Une importante partie de ces composés sont sécrétés au niveau de l'espace canaliculaire grâce à plusieurs transporteurs appartenant à la superfamille ABC (*ATP binding cassette*). La bile est ensuite transportée jusqu'aux canaux biliaires où elle sera diluée et alcalinisée par l'action des cholangiocytes. La sécrétion des cholangiocytes consiste principalement en l'excrétion d'ions Cl^- par les transporteurs CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) puis au transport de HCO_3^- et de l'eau.[14,52,53] (***Figure 7***) Les cholangiocytes ont également la capacité de réabsorber les acides biliaires grâce au transporteur

ASBT (*apical sodium-dependent bile salt transporter*), et ce dans le cas d'obstructions au niveau des vois biliaires.[54]

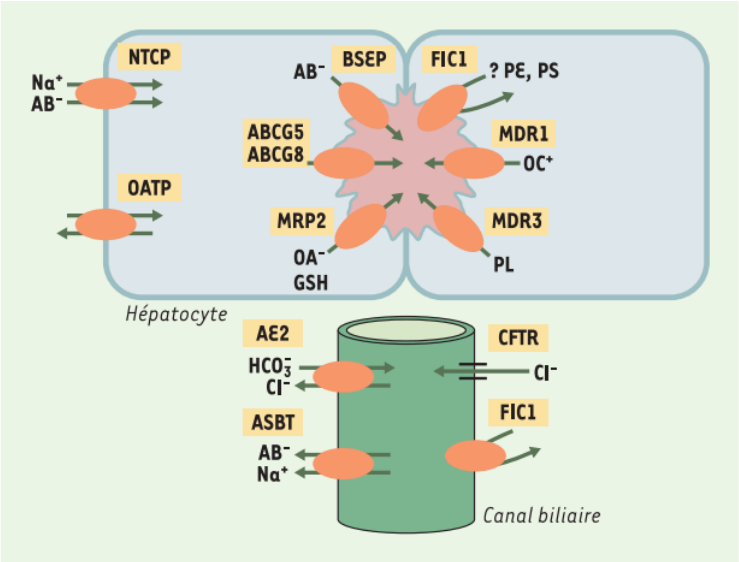


Figure 7 : La production de la bile par les hépatocytes et les cholangiocytes.[53] Dans les hépatocytes, les transporteurs sont localisés, d'une part, dans la membrane sinusoïdale (NTCP : Na+ taurocholate cotransporting polypeptide, OATP : organic-anion-transporting polypeptides) et, d'autre part, dans la membrane canaliculaire, où ils assurent l'exportation des acides biliaires (AB-) et d'autres composés vers l'espace canaliculaire (en rose) (BSEP : bile salt export pump, MDR1 : multidrug-resistance-1 glycoprotein, MRP2 : multidrug-resistance-associated protein 2, MDR3 : multidrug-resistance-3 glycoprotein, ABCG5 et 8 : ATP-binding cassette sub-family G member 5 et 8, FIC1 : familial intrahepatic cholestasis 1, PE : phosphatidylethanolamine, PS : phosphatidylserine, OC+ : cations organiques, PL : phospholipids, OA- : anions organiques, GSH : glutathione). Seule la membrane apicale des cholangiocytes, qui délimite la lumière du canal biliaire, est représentée (en vert). (AE2 : anion exchanger isoform 2, ASBT : apical sodium-dependent bile salt transporter, CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator).

Détoxification des xénobiotiques et de certains métabolites : le foie a la capacité de métaboliser un très grand nombre de molécules, potentiellement toxiques pour l'organisme, afin de les rendre moins toxiques ou inactives et souvent plus hydrophiles afin de faciliter leur élimination dans les urines. Ces voies de détoxification se passent généralement en deux étapes. La première phase implique principalement les enzymes de la famille des cytochromes (CYP) P450 qui sont surtout exprimées au niveau du foie. Ces dernières catalysent des réactions d'oxydation, réduction, hydrolyse, hydratation ou bien dé-halogénation, qui permettent de rendre le xénobiotique plus hydrophile, rendant possible son élimination, soit de permettre sa conjugaison avec une autre molécule. Ce processus génère également des ROS pouvant être très dommageables pour les tissus environnants. De ce fait, on retrouve dans le foie un nombre important d'antioxydants tels que les vitamines A, E et C.[55,56]

Par ailleurs, le foie est également impliqué dans l'élimination via la bile de la bilirubine, métabolite provenant de la dégradation de hèmes des érythrocytes.[51]

Métabolisme et stockage des vitamines liposolubles : la plupart des vitamines liposolubles sont transportées vers le foie depuis l'intestin.[51] Tout d'abord, la vitamine A; qui joue un rôle important dans la différentiation et le renouvellement cellulaire, et qui est essentielle pour la vision et le système immunitaire, est tout d'abord assimilée par les hépatocytes puis transportée jusqu'aux HSCs afin d'y être stockée dans des gouttelettes lipidiques.[57] Le foie joue également un rôle majeur dans le métabolisme de la vitamine D_3, nécessaire notamment à l'homéostasie osseuse. Celle-ci est hydroxylée sous sa forme de réserve la 25-hydroxyvitamine D3 ($25(OH)D_3$) par CYP2R1, produit uniquement dans les hépatocytes. Elle est ensuite acheminée jusqu'aux reins pour acquérir sa forme active de la vitamine D_3.[58,59] Le foie intervient aussi dans le métabolisme de la vitamine E, qui est un puissant anti-oxydant mais dont l'accumulation dans les tissus peut être délétère, et qui, de ce fait, doit être éliminée efficacement. Dans le foie, les différentes formes de la vitamine E pourront être métabolisées grâce aux CYPs.[60,61] Enfin, le foie est également important aux fonctions de la vitamine K qui joue un rôle majeur dans la coagulation et le métabolisme des os. Le foie est un des principaux sites de stockage de la vitamine K et c'est également le tissu où a lieu son catabolisme et cycle d'époxydation; cycle qui participe à son rôle dans la coagulation mais aussi à son « recyclage ».[62,63]

Métabolisme énergétique du glucose : le foie est un des principaux organes impliqués dans le métabolisme des carbohydrates et la régulation de la glycémie, le métabolisme des acides aminés et des protéines et le métabolisme des lipides.[64] (***Figure 8***) Le métabolisme des carbohydrates consiste principalement à la capacité de stockage du glucose sous forme de glycogène, dont le foie est la principale réserve avec le tissu musculaire. Lors de la prise alimentaire, le glucose va s'accumuler dans la cellule. Il peut ensuite soit être utilisé, par la voie des pentoses phosphates ou bien être transformé en fructose-6-phosphate pour la voie des hexoamines (voie minoritaire, environ 5%), essentiel à la glycosylation, ou la voie de la glycolyse.

Cependant, dans le foie, le glucose permet également la formation du glycogène, un polymère de glucose, lors de la glycogénogenèse. Dans les hépatocytes, le glycogène constitue alors une réserve énergétique importante en cas de jeûne de courte durée, il peut être dégradé lors de la glycogénolyse, afin de produire du glucose lors de la baisse de la glycémie. Au cours d'un jeûne prolongé, et quand les stocks de glycogène ont été épuisés, le foie a la capacité de synthétiser du glucose à partir du lactate, du glycérol provenant de la dégradation des triglycérides (TG), de certains acides aminés, du pyruvate et d'autres intermédiaires du cycle de Krebs.[64–66]

Métabolisme des lipides : le foie est également au centre du métabolisme des lipides, les hépatocytes peuvent utiliser les acides gras en tant que source d'énergie, ou bien les synthétiser *de novo* à partir de glucose. (***Figure 8***) Les acides gras absorbés dans le tractus intestinal sont transportés depuis l'intestin dans la circulation générale sous forme de TG dans les chylomicrons, puis peuvent entrer dans les hépatocytes. Lors de la prise alimentaire, le taux élevé de glucose, et la sécrétion d'insuline, inhibe la β-oxydation des acides gras, et favorise leur stockage sous forme de TG. Par ailleurs, le foie a également la capacité de convertir les excès de glucose en acide gras. Ces derniers sont ensuite estérifiés pour former des TGs ou des phospholipides. La lipogenèse est inhibée en cas de fort taux de glucagon qui va alors favoriser l'utilisation des acides gras pour produire du glucose ou de l'énergie.[64–66] En cas de restriction calorique plus ou moins longue, ou bien lors de certains régimes, le corps va utiliser les lipides comme source d'énergie principale, à la place du glucose. Le foie a une grande capacité à utiliser les acides gras pour produire de l'énergie grâce à la β-oxydation (ce qui n'est pas le cas du cerveau par exemple). Sous certaines conditions (ex. taux important de glucagon, quantité importante d'acides gras disponibles), l'acétyl-CoA (coenzyme A) peut donner lieu à la formation de corps cétoniques qui sont uniquement synthétisés dans le foie. Ce dernier n'a en revanche pas la possibilité de les utiliser comme source d'énergie.[66,67] Le foie est également un des organes principaux, avec l'intestin, où a lieu la synthèse du cholestérol, mais également la formation des lipoprotéines permettant de distribuer vers les autres tissu, les acides

gras, TGs, phospholipides ou le cholestérol formés dans le foie ou en provenance de l'alimentation. [68,69]

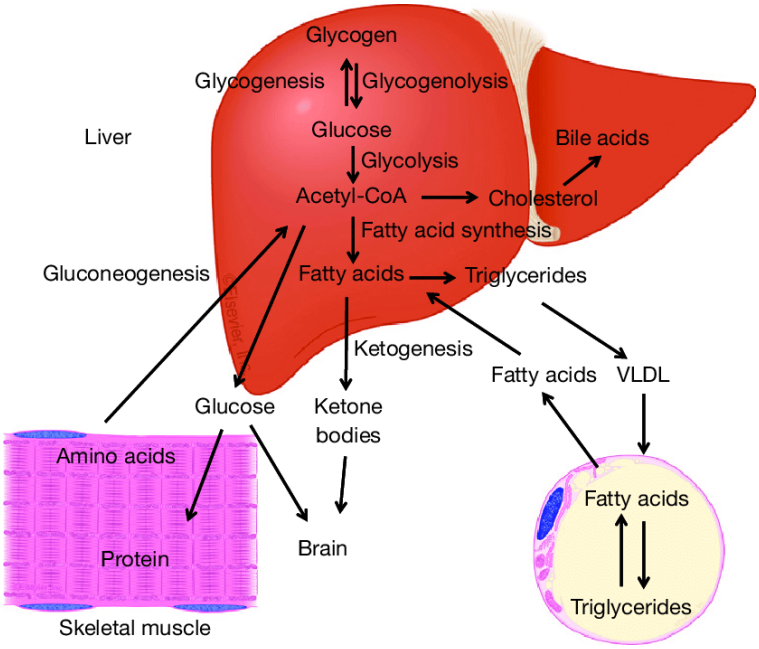


Figure 8 : Le métabolisme énergétique dans le foie.[70] Après ingestion du bol alimentaire, le glucose est stocké dans le foie sous forme de glycogène. Le glucose passe par la glycolyse pour générer de l'acétyl-CoA, qui est utilisé pour synthétiser les acides gras ou le cholestérol. Le cholestérol est catabolisé en acides biliaires. Les acides gras sont estérifiés en glycérol pour former des triglycérides, qui sont assemblés au VLDL (very low density lipoprotein) pour la sécrétion et le transport vers les adipocytes pour le stockage et d'autres tissus pour la production d'énergie. Le glucose est absorbé par les muscles et autres tissus pour la production d'énergie. À jeun, les triglycérides des adipocytes sont hydrolysés en acides gras libres, qui sont transportés vers le foie pour la synthèse des triglycérides et des corps cétoniques. Les corps cétoniques sont utilisés pour la production d'énergie dans le cerveau et les muscles. En cas de jeun long, les protéines musculaires sont dégradées en acides aminés, qui sont transportés vers le foie pour la synthèse du glucose par gluconéogenèse.

Métabolisme des protéines : le foie est responsable de la production de 85 à 90% des protéines plasmatiques dont l'albumine, le fibrinogène, la protéine C réactive, certaines hormones de croissances ou autres globulines.[4,71] Il est également impliqué dans l'anabolisme des protéines et plus spécifiquement la gestion de l'ammonium, hautement toxique, issue de la dégradation des acides aminés. Pour ce faire l'amine des acides aminés est tout d'abord transférée sur une molécule d'α-cétoglutarate dans une réaction catalysée par une aminotransférase (les deux plus connues étant l'alanine aminotransférase et l'aspartate aminotransférase), formant du glutamate. Celui-ci est ensuite déaminé en par la glutamate déshydrogénase, libérant une molécule d'ammonium NH_4^+. L'ammonium est ensuite métabolisé pour donner de l'urée (par le cycle de l'urée) permettant son excrétion par les reins dans l'urine. Le

foie est le seul organe où peut avoir lieu le cycle de l'urée. De ce fait, les autres organes doivent y transporter les groupements amines soit grâce à l'alanine, selon le cycle de l'alanine, soit par l'intermédiaire de la glutamine, afin d'éliminer le nitrogène.[72,73]

Capacité de régénération : bien que le taux de division des hépatocytes dans un foie sain soit plutôt faible ; le foie est un organe avec une capacité de régénération très importante. En effet, les patients qui subissent une hépatectomie partielle, et ce jusqu'à 70% de la masse totale du foie, récupéreront le volume total de leur foie sous une semaine. Cette caractéristique particulière du foie, est évidemment lié à sa fonction de détoxification et son lien proche avec le système digestif qui l'expose à des conditions cytotoxiques, de stress et d'inflammation quasi continuellement.[74,75] On retrouve dans le parenchyme hépatique des cellules progénitrices, ou cellules ovales, qui, capables de se différencier en hépatocytes et cholangiocytes, participent à la régénération du foie.[76] Plusieurs voies de signalisation sont également impliquées dans l'auto-renouvèlement des hépatocytes en cas de dommages dans le parenchyme. L'IL6 et le TNFα produites par les KCs permettent de recruter des leucocytes et d'induire la prolifération des hépatocytes.[75,77] De ce fait, l'activation des KC, notamment par des PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) tels que les LPS (lipopolysaccharide) bactériens, apparaît nécessaire au processus de régénération hépatique.[78] En parallèle, l'hormones de croissance l'HGF (*hepatocyte growth factor*), sécrétée par les HSCs, a également été mise en évidence comme facteur mitotique principale des hépatocytes lors de ce processus de récupération hépatique.[79] Les cholangiocytes sont également capables de se différencier.[80]

Rôle immunitaire : au-delà de la production par les hépatocytes de nombreuses protéines impliquées dans l'immunité, telles que la protéine C réactive (CRP pour *C-reactive protein*), les protéines du complément, certaines protéines bactéricides ou même l'opsonine, le foie est également considéré comme un organe immunologique. Son rôle est primordial afin d'éviter le passage dans la circulation générale de pathogènes provenant du système digestif. Cependant en conditions basales, le foie

est un organe induisant une importante tolérance, lui permettant de conserver son intégrité physiologique.[42]

II. Pathologies hépatiques

A. Aperçu des maladies affectant le foie

Les pathologies infectieuses

- **les hépatites virales** : Les hépatites virales sont les infections hépatiques les plus fréquentes. Bien que les virus pouvant causer ces hépatites soient tous bien distincts les uns des autres, ils ont en commun d'infecter principalement les hépatocytes et de provoquer leur lyse. Cette destruction hépatocytaire, ainsi que l'activation d'une réponse inflammatoire parfois persistante, sont la cause des symptômes cliniques des hépatites virales. Pour les infections aux virus de l'hépatite B, C et D (HBV, HCV, HDV), celles-ci peuvent devenir chroniques, c'est-à-dire que le système immunitaire ne parvient pas à éliminer le virus.[81,82] (**Tableau 2**)

	Genome	Transmission	Chronic hepatitis	Fulminant hepatitis	Treatment	Vaccine
Virus						
Hepatitis A	RNA	Oral	No	Yes	No	Yes
Hepatitis B	DNA	Mother to infant, blood, sexual	10%	Yes	Interferon, lamivudine, adefovir	Yes
Hepatitis C	RNA	Blood, rarely mother to infant, very rarely sexual	70%	Very rare	Interferon, ribavirin	No
Hepatitis D	DNA	Blood, sexual	50%	Yes	Interferon	Yes
Hepatitis E	RNA	Oral	No	Yes	No	No
Hepatitis G	RNA	Blood	No	No	No	No

Summary of main viral hepatitis characteristics

Tableau 2 : Les virus responsables des hépatites virales.[82] Ce tableau liste les virus de l'hépatite, leur mode de transmission et leur potentielle association avec une hépatite chronique ou fulminante.

- **autres maladies infectieuses** : le foie est également sensible à d'autres infections, même si moins courantes que les hépatites virales décrites ci-dessus. Les infections bactériennes sont plutôt rares et généralement secondaires dues à une primo infection. C'est le cas pour la tuberculose, la syphilis, la leptospirose, la maladie de Lyme, la fièvre Q par exemple. Des infections virales, autres que celles des virus de l'hépatite peuvent également affecter le foie tels le parvovirus B19 ou certains herpesvirus comme le cytomégalovirus et le virus d'Epstein-Barr. Le foie peut également être affecté par des parasitoses, tels certains Plasmodium,

agents du paludisme, et plus particulièrement des infections par des helminthes, comme la fasciolose qui est un facteur de risque pour le cholangiocarcinome (CC).[83]

Les maladies génétiques

- **l'hémochromatose** : l'hémochromatose est une maladie génétique provoquant une hyperabsorption intestinale du fer. Sa potentielle gravité est liée aux dépôts de fer qui peuvent s'accumuler dans le foie pouvant mener à la cirrhose.[84]
- **l'hyperoxalurie** : cette pathologie est la cause d'un défaut dans le métabolisme du glyoxylate et de l'oxalate, donnant lieu à une production excessive d'oxalate. Les conséquences cliniques sont multiples dû à la conséquence de l'accumulation systémique d'oxalate de calcium dans l'organisme. Les patients souffrent alors de lithiases rénales et néphrocalcinose qui altèrent gravement la fonction rénale.[85]
- **la maladie de Wilson** : la maladie de Wilson est une maladie génétique qui provoque une accumulation de cuivre dans plusieurs organes dont le foie. Cela est dû à la mutation de la protéine ATP7B (copper-transporting ATPase 2) dont le rôle est le transport du cuivre. Les malades montrent des atteintes hépatiques généralement caractéristiques d'une hépatite chronique ou d'une stéatose, et dans les cas les plus avancés peuvent présenter une cirrhose.[86]
- **le déficit en alpha 1-antitrypsine** (ATT) : l'ATT est une protéine produite principalement par les hépatocytes mais également, dans une moindre mesure, par les neutrophiles, certains macrophages et les cellules épithéliales de l'intestin et des poumons. Son rôle est d'empêcher la destruction de la MEC par les pièges extracellulaires de neutrophiles (mieux connus sous le nom de NETs pour neutrophil extracellular traps). Les manifestations cliniques se retrouvent principalement au niveau des poumons et du foie.[87]

Les dysfonctionnements du système immunitaire

- **l'hépatite auto-immune** (HAI) : l'HAI est un syndrome auto-immun qui semble hétérogène entre individus. Elle a d'abord été caractérisée par une augmentation des anticorps circulants, sans signe de cirrhose, et plus spécifiquement d'auto-

anticorps antinucléaires (ANAs pour anti-nuclear autoantibodies), une prédominance féminine et une bonne réponse aux traitements par corticoïdes. Son incidence est estimée entre 1,5 et 3 cas pour 100 000 personnes en Occident. On distingue 2 sous-types d'HAI : Le sous-type 1 affecte principalement les adultes et est caractérisé par des ANAs et SMAs (smooth muscle antibodies), la sévérité de la pathologie est souvent modérée. Le sous-type 2 affecte surtout enfants et éventuellement les jeunes adultes. Il est caractérisé par des anticorps ciblant LKM (liver kidney microsomal type) 1 et 3 et LC1 (liver cytosol type 1). Le phénotype de la maladie est souvent plus sévère que le sous-type 1. Chez des patients prédisposés à développer une HAI, le phénomène de mimétisme moléculaire, lors d'infection, semble être à l'origine du déclenchement de la maladie. En effet, lors d'HAI de type 2, la principale cible des auto-anticorps et lymphocytes T auto-réactifs est CYP2D6 qui possède une forte homologie de séquence avec des protéines du virus de l'hépatite C ou de certains herpesvirus. La réponse immunitaire activée est décrite comme médiée surtout par les lymphocytes T auxiliaires (Th pour T helper) 1, Th2 et Th17. Comme dans plusieurs syndromes auto-immuns, une activation anormale des Th17 est également fréquente. De plus, plusieurs études ont indiquées des dysfonctions et une faible quantité de lymphocytes T régulateurs (Treg pour regulatory T lymphocytes) circulant chez les personnes souffrant de HAI, indiquant une prédisposition à la perte de la tolérance immunitaire périphérique.[88,89]

- **les cholangites** : Ce sont des inflammations chroniques.

Les maladies malignes

- **le carcinome hépatocellulaire (CHC)** : le carcinome hépatocellulaire est la maladie maligne du foie la plus fréquente. Elle se développe à partir des hépatocytes transformés. On estime que plus de 80% des cas de CHC ont lieu dans les zones les moins développées. Et pour cause, près de trois quarts des CHC sont liés à une infection chronique à HBV ou HCV. En effet, le principal facteur de risque du CHC est la cirrhose hépatique qui peut s'établir au cours de l'hépatite chronique. D'autres maladies semblent être également liées à une augmentation

du risque de CHC telles que la stéatohépatite non alcoolique (NASH pour nonalcoholic steatohepatitis) ou encore l'obésité.[90,91]

- **l'adénome hépatocellulaire** : l'adénome hépatocellulaire est une tumeur solide bégnine se développant dans le parenchyme du foie. Le risque d'évolution en CHC est très rare.[92]

Les stéatoses hépatiques

- **la stéatose** : elle correspond à une accumulation pathologique de TG dans les hépatocytes. Elle apparaît généralement dans le cadre de la maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD pour nonalcoholic fatty liver disease) ou la maladie du foie gras alcoolique (AFLD pour alcoholic fatty liver disease). D'autres causes, telles que des infections ou des troubles métaboliques, peuvent donner lieu à cet état pathologique. Ce trouble accompagne généralement une inflammation et/ou une fibrose hépatique.[93]
- **la NAFLD** : cette pathologie regroupe des atteintes hépatiques allant de la simple stéatose hépatique au CHC, en passant par la NASH et la cirrhose. (**Figure 9**) Il est estimé qu'au moins 25% de la population des Etats-Unis est affectée par la NAFLD et son incidence tend à augmenter. Le développement de la NAFLD est très fortement associé à la consommation d'un régime riche en calories, riche en lipides et riche en carbohydrate. De ce fait, la NAFLD est souvent observée chez des patients souffrant de diabète de type 2 et/ou d'obésité. Si la situation n'est pas prise en charge, cet état mène à l'induction d'une inflammation chronique dans le foie, c'est le début de la NASH. Cela peut conduire à une fibrose, mais également provoquer une lyse hépatique.[94,95]

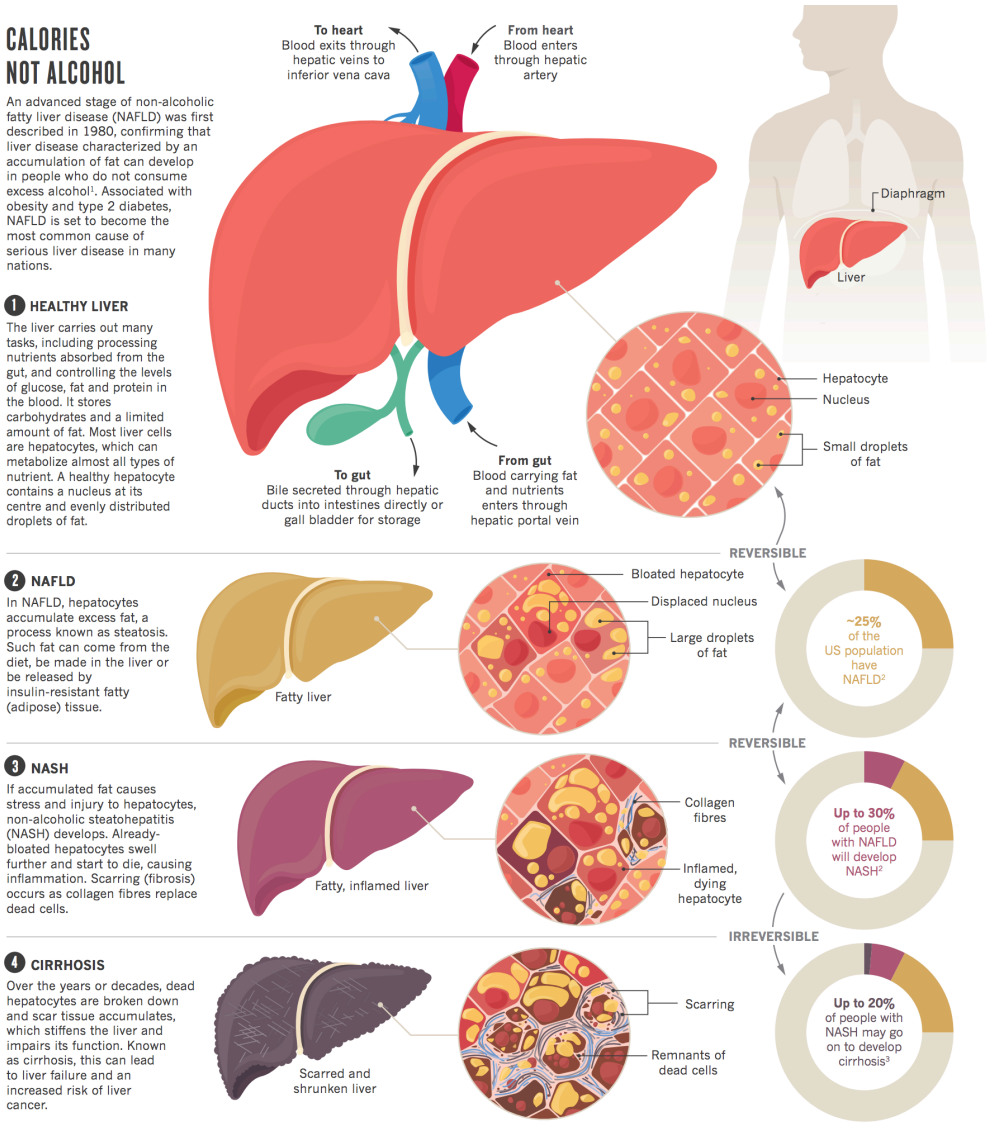


Figure 9 : la stéatose hépatique non alcoolique. (modifié de Drew, Nature, 2017)[96] 1) Le foie réalise un nombre important de tâches incluant la transformation des nutriments absorbés et le contrôle du niveau de sucre, gras et protéine circulant dans le sang. Il peut stocker des carbohydrates et une petite quantité de lipides. De ce fait contiennent des gouttes lipidiques réparties de manière homogène dans tout leur cytoplasme. 2) Durant la NAFLD (non alcoholic fatty liver disease), les hépatocytes accumulent en excès du gras, c'est le processus de stéatose. Ce gras peut provenir de l'alimentation, être généré dans le foie ou être sécrété par des adipocytes insulino-résistant. 3) Si le gras accumulé déclenche un stress cellulaire ou des dommages hépatocytaires, c'est le développement de la NASH (non alcoholic steatohepatitis). Les hépatocytes gonflés de gras enflent d'autant plus et commencent à mourir, provoquant une inflammation. Une fibrose s'installe et des fibres de collagène remplacent les hépatocytes morts. 4) Durant plusieurs années les hépatocytes sont détruits et le tissu cicatriciel s'accumule et raidit le foie ce qui impacte son fonctionnement. Cet état, appelé cirrhose, peut mener à une insuffisance hépatique et augmenter le risque de cancer hépatique.

Les complications des atteintes hépatiques

- **la fibrose** : la fibrose hépatique correspond à une régénération et cicatrisation du foie aboutissant à l'accumulation excessive de MEC qui prend alors la place des cellules hépatiques. C'est un état pathologique qui se développe lentement mais

qui peut être réversible. Il survient lorsque la production de MEC surpasse sa dégradation et fait aussi intervenir la formation de nouvelles liaisons chimiques entre molécules de collagène. Alors que la MEC est naturellement enrichie en collagènes de type IV et VI, ce sont principalement des collagènes de type I et III, et des fibronectines, qui la constituent lors de la régénération qui suit un dommage hépatique. Lors d'une lésion hépatique, les HSCs sont activées en MFs capables de produire une importante quantité de tissu fibreux, de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs mitogènes afin d'enclencher le processus de cicatrisation tissulaire. Ces MFs peuvent également provenir d'autres types cellulaires : des fibroblastes situés dans l'espace porte, des fibrocytes provenant de la moelle osseuse, ou dans une moindre mesure, des cellules épithéliales (hépatocytes ou cholangiocytes) après transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour epithelial–mesenchymal transition). L'activation des MFs se fait par plusieurs mécanismes. Tout d'abord par l'intermédiaire d'hormones de croissance, et principalement du PDGF (platelet-derived growth factor) et TGFβ,[97,98] et de cytokines pro-inflammatoires,[99] généralement produites par les monocytes pro-inflammatoires recrutés sur le site de la lésion et les KCs résidents. Dans le cas où une lésion hépatique ne peut être résolue rapidement, l'activation de la réponse immunitaire pro-inflammatoire ne cesse de favoriser la formation de MEC par le recrutement et la stimulation des MFs.[100,101]

- **la cirrhose** : la fibrose hépatique peut progresser, si non prise en charge, vers une cirrhose. (**Figure 10**) Cela correspond alors à une altération importante de l'architecture du parenchyme du foie et de sa vascularisation. D'un point de vue macro-anatomique, cela s'observe souvent avec la formation de nodules où a lieu la régénération du parenchyme hépatique, entourés par du tissu fibrotique. Lorsqu'une grande partie du foie est cirrhotique, la fonction hépatique est impactée ce qui peut être létal et nécessiter une greffe.[100]
- **la jaunisse** : la jaunisse est une manifestation clinique d'un problème hépatique qui se traduit par une coloration jaunâtre de la peau due à l'accumulation anormale de bilirubine dans le corps. Cela est le résultat d'un problème d'excrétion de la bilirubine, fonction assurée par le parenchyme du foie, lorsque celui-ci est intègre.[102]

– **l'insuffisance hépatique** : l'insuffisance hépatique décrit un état d'atteinte grave et globale des fonctions hépatiques, et qui se manifeste généralement durant une période de temps courte (quelques jours/semaines). Lorsqu'elle s'accompagne de troubles neurologiques, on parle d'hépatite fulminante. Elle est la conséquence de lésions hépatiques n'ayant pas pu être résolues, telles que des infections virales chroniques, la consommation de produits hépatotoxiques (alcool ou médicaments) ou même la mauvaise prise en charge de maladies immunologiques hépatiques.[103]

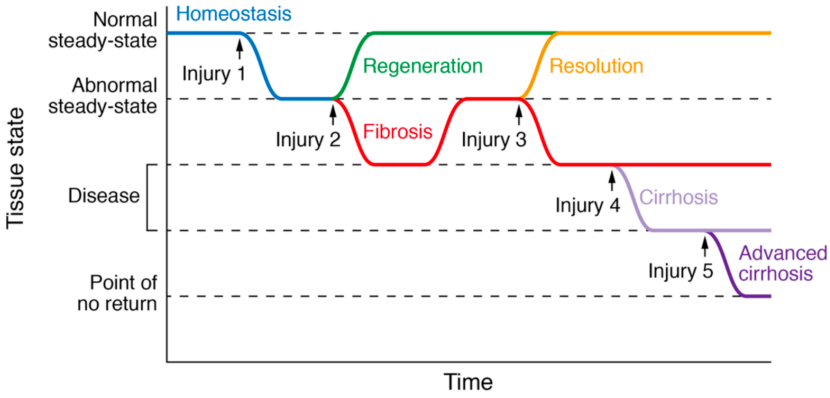


Figure 10 : Les différents stades de la fibroses à la cirrhose hépatique. (modifié de Cordero-Espinoza et Huch, J Clin Invest, 2018)[74] Chez les individus en bonne santé, une lésion tissulaire ponctuelle (lésion 1) du foie induit une réponse régénératrice (courbe verte) pour rétablir l'homéostasie hépatique. Des blessures répétées (blessures 1 + 2) entravent la régénération et font basculer le tissu dans un état malade connu sous le nom de fibrose (courbe rouge). Le tissu peut récupérer au fil du temps si aucun autre dommage n'est appliqué (résolution, blessures 1 + 2 + temps, courbe jaune). Alternativement, la fibrose sera maintenue si de nouveaux dommages surviennent (blessures 1 + 2 + 3, courbe rouge). Des blessures supplémentaires détériorent le tissu jusqu'à ce qu'il atteigne un état cirrhotique (1 + 2 + 3 + 4, courbe violet clair) ou cirrhotique avancé (1 + 2 + 3 + 4 + 5, courbe violet foncé). La récupération de ce dernier scénario est très peu probable.

B. La cholangite biliaire primitive (CBP)

La CBP : données épidémiologiques et cliniques

La cholangite biliaire primitive est une maladie inflammatoire et auto-immune qui affecte les très petits et petits canaux biliaires. Elle est caractérisée par une destruction non suppurative des canaux biliaires. Cette lyse spécifique des cholangiocytes est médiée par les lymphocytes T et plasmocytes infiltrés dans l'espace porte. Les patients possèdent généralement un taux élevé d'IgM (Immunoglobuline de type M) circulants ainsi que des anticorps anti-mitochondriaux (AMAs pour *anti-mitochondrial autoantibodies*) dans près de 95% des cas. D'autres auto-anticorps sont

également fréquemment détectés chez les malades CBP tels que les ANAs et plus spécifiquement des anti-p62 et anti-gp120 retrouvés chez 30% des patients, mais également des anticorps anti-centromères. Si la pathologie n'est pas correctement traitée, elle peut provoquer la perte des canaux biliaires et l'installation d'une fibrose. Dans les stades les plus avancés, l'apparition d'une jaunisse indique une évolution cirrhotique du foie, et augmente le risque de développer un CHC. Dans les pays du Nord, sa prévalence est d'environ 20 cas pour 100 000 ce qui en fait une maladie peu fréquente. Par ailleurs, comme la plupart des maladies auto-immunes, elle a une forte prédominance féminine (90% de patientes), et son association avec d'autres troubles auto-immuns est observée chez 70% des patients. La kératoconjonctivite (75%) et le syndrome de Raynaud (32%) sont les troubles immunitaires les plus courant chez les malades CBP. La première ligne de traitement contre la CBP consiste en l'ingestion journalière d'acide ursodésoxycholique, permettant de modifier le stock d'acide biliaire, ce qui permet de réduire l'inflammation et l'apoptose des cholangiocytes. Dans les stades les plus graves de la CBP, une transplantation hépatique peut être recommandée.[104–106]

Étiologie de la CBP

L'étiologie de la cholangite n'est pas très bien comprise, le mécanisme déclencheur de la pathologie reste inconnu. Cependant les lymphocytes T et B semblent impliqués dans l'orchestration de la réponse auto-immune. En effet, des épitopes B et T ont été identifiés chez les malades au sein de la protéine PDC-E2 (*pyruvate dehydrogenase complex subunit E2*). Les AMAs reconnaissent le domaine lipoylé de PDC-E2, qui semble donc être immunodominant.[107,108] Par ailleurs des épitopes spécifiques des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ ont aussi été mis en évidence, indiquant un rôle des deux sous-types cellulaires.[109–111] Ces épitopes T apparaissent d'ailleurs chevaucher les épitopes B.[110] Cela rend possible la formation de complexes immunitaires anticorps-antigène, qui tendent à induire une réponse plus efficace, notamment en facilitant la présentation antigénique aux lymphocytes T, par les DCs ou les lymphocytes B, créant ainsi une synergie en réponse au même antigène.[112] Par ailleurs, il est intéressant de noter que chez les patients souffrant d'une CBP, mais n'ayant pas d'AMAs, des lymphocytes T auto-réactifs à PDC-E2 sont tout de même

présents.[113] Cette protéine mitochondriale apparaît surexprimée et localisée de manière aberrante à la surface des cholangiocytes lors de la CBP.[114] Deux mécanismes pourraient expliquer ce phénomène. Tout d'abord, lors de la mort cellulaire, la partie immunogène de PDC-E2 (un résidu lysine lipoylé, nécessaire à son activité enzymatique) doit être liée à une molécule de glutathion afin de rendre ce domaine inaccessible au système immunitaire.[115,116] Cependant, chez les cholangiocytes, contrairement à d'autres types cellulaires, cette modification n'a pas lieu du fait de l'expression de BCL-2, ce qui laisse l'épitope immunodominant immunogène et explique la localisation de la pathologie. Plus spécifiquement, l'expression de BCL-2 est particulièrement importante dans les petits canaux biliaires, ce qui correspond avec la partie de l'arbre biliaire affectée par la pathologie. La forme sans glutathion de PDC-E2 peut alors être clivée, de manière dépendante des caspases, ce qui génère des peptides immunogènes dans les cholangiocytes mourants, peptides ensuite accessible aux auto-anticorps dans les blobs apoptotiques.[117,118] Par ailleurs, un cholangiocyte mourant peut être phagocyté par une des cellules biliaires voisines.[118] Ces dernières seraient alors capables de présenter l'épitope intact de PDC-E2 sur leur CMH. En outre, chez les patients CBP, une expression aberrante du CMH de classe II a été mesurée et pourrait être une des causes de l'activation du système immunitaire à l'encontre de PDC-E2.[119] Cela démontre également un potentiel mécanisme d'auto-alimentation de l'auto-immunité dans le cas de la CBP. Cependant, la sur-régulation du CMH de classe II par les cholangiocytes semble arriver après l'exposition de PDC-E2 à leur membrane. Mais l'exposition de PDC-E2 apparaît coexister avec la présence d'IgA anti-PDC-E2.[120] Ces derniers peuvent alors activer les caspases ou séquestrer PDC-E2, dans les cholangiocytes, et les rendre plus sensibles à l'apoptose.[120,121] Cependant, une dérégulation de l'autophagie et des mécanismes de sénescence dans les cholangiocytes est également soupçonnée d'être à l'origine de l'expression anormale de PDC-E2 à leur surface luminale.[120,122] Des études épigénétiques ont mis en exergue un certains nombres de micro ARNs régulateurs de la nécrose, sénescence, apoptose et du stress oxydatif, dont l'expression était modifiée chez les patients CBP.[123] Notamment, le micro ARN 506 est surexprimé chez les patients atteints de la CBP, ce qui altère la signalisation du calcium et diminue l'expression d'un échangeur d'anion responsable de la sécrétion de ions bicarbonates.[124] Ces derniers participent à la

formation d'une couche protectrice sur les cholangiocytes (*bicarbonate-rich biliary umbrella*), et une diminution de la sécrétion de HCO_3^- détruit cette protection, ce qui sensibilise les cellules de l'arbre biliaire à l'induction de l'apoptose.

Chez des personnes non malades, une très faible quantité de lymphocytes T et B auto-réactifs, ainsi que des AMAs circulants ont été retrouvés.[125] En outre, ces AMAs sont capables de réagir, même faiblement, avec l'arbre biliaire. Cela indique probablement que ces défauts de présentation de PDC-E2 lors de la mort cholangiocytaire ne sont pas suffisants pour induire le syndrome auto-immun. Des mécanismes extérieurs sont probablement à l'origine du déclenchement de la pathologie chez les personnes prédisposées. Notamment, certains pathogènes pourraient induire une réponse immunitaire contre un auto-antigène par le mécanisme de mimétisme moléculaire. En effet, des bactéries, telles que *Novosphingobium aromaticivorans*, *Escherichia coli*, expriment des protéines possédant une grande homologie avec PDC-E2.[126,127] En outre, des xénobiotiques ont également la possibilité de former des complexes avec des protéines endogènes et de modifier leur structure les rendant immunogènes, ou provoquant leur accumulation et induisant leur exposition à la surface cellulaire. C'est le cas notamment de l'acide 2-octynoïque qui, couplé avec PDC-E2, a montré une forte réactivité avec les AMAs des patients avec une CBP. Cela s'explique par sa forte similarité avec l'acide lipoïque (du résidu lipoylé habituellement retrouvé sur PDC-E2). De manière intéressante, cet acide 2-octynoïque est fréquemment utilisé dans les produits cosmétiques et les parfums alimentaires.[128] La présence de ce composé dans des produits utilisés bien plus fréquemment par les femmes que par les hommes pourrait être questionnée, de par la forte prévalence féminine de la maladie. Plusieurs facteurs semblent donc contribuer au déclenchement de la CBP. Comme pour la plupart des troubles auto-immuns, plusieurs études d'association pangénomique (GWAS pour *genome-wide association study*) ont également permis de mettre en évidence une forte association entre l'apparition de la CBP et certains polymorphismes du HLA (*human leukocyte antigen*). Par ailleurs, plusieurs autres loci de gènes ont été corrélés avec la pathologie, la plupart impliqués dans l'activation ou la régulation de la réponse immunitaire adaptative. Plusieurs gènes de la voie de signalisation de l'IL12 ont notamment été identifiés. Le terrain génétique peut donc

être un facteur de risque pour le développement de cette cholangite, comme cela a pu être observé au sein de fratries.[129]

Réponse immunitaire lors de la CBP

L'activation du système adaptatif a lieu lors de la reconnaissance de l'auto-épitope mitochondrial par les auto-anticorps ou bien par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, consécutivement à une présentation antigénique assurée soit par les cholangiocytes (comme décrit ci-dessus) soit par les DCs.[112,130] Ces derniers sont retrouvés plus fréquemment au niveau des granulomes (inflammation localisée composée d'un amas de cellules dérivées d'histiocytes et entourées de lymphocytes, comprenant parfois des polynucléaires), dans l'espace porte des patients CBP, accompagnés de nombreux lymphocytes B.[131] Cela semble indiquer un rôle pour ces deux populations cellulaires dans la formation des granulomes et des lésions tissulaires. En effet, l'infiltration de plasmocyte autour des canaux biliaires apparaît corrélée au titre des AMAs dans le sérum des patients.[132] Ces lymphocytes B produisent localement un nombre important d'IgM, mais également des IgG (immunoglobulines de type G) circulant, à l'origine du fort taux mesuré dans le sang.[131] La forte réponse B, lors de la CBP, est visiblement liée à l'enrichissement dans le foie de lymphocytes Tfh (*T folicular helper*), dont un plus grand nombre coïncide avec un phénotype plus dommageable, et qui stimulent la production d'anticorps via la sécrétion de cytokines telles que IL21 et IL4.[133,134] La forte proximité de DCs et d'anticorps pourrait d'ailleurs être à l'origine de l'efficacité du priming de la réponse T. En outre Différentes études semblent démontrer que cette réponse T impliquée dans la cholangite est principalement une réponse Th1/Tc (T cytotoxic) 1 dont l'action des lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques (CTLs pour *cytotoxic T lymphoctes*) aurait un rôle clé dans la destruction des cholangiocytes. (***Figure 11***) Leur nombre est en effet enrichi dans le foie et corrélé à la sévérité de la maladie.[111,135] De plus, en périphérie, les clones de lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$ expandus chez les patients CBP expriment CX3CR1 (*C-X3-C motif chemokine receptor 1*), et leur recrutement au niveau du canal biliaire est médié par la sécrétion de CX3CL1 (*C-X3-C motif chemokine ligand 1*) par les cholangiocytes notamment.[136,137] La réponse Th17 apparaît aussi activée de manière anormale par rapport à des sujets sains lors de la CBP, traduisant aussi son rôle dans la

pathogénicité.[138] Une coopération entre des lymphocytes Th1/Th17, localisés dans l'espace porte, joue donc un rôle actif dans les lésions hépatiques.[139] Un défaut dans le nombre et l'activité des lymphocytes Treg est également observé chez les patients CBP, et est caractéristique de la perte de la tolérance.[140] Les lymphocytes NK et NKT participent aussi à la pathogénie de la CBP. En effet, leur nombre est augmenté dans le foie des patients CBP et ils possèdent un phénotype plus actif et cytotoxique.[141–143] Cela permet le recrutement et l'activation de monocytes pro-inflammatoires et des cellules NK et NKT, dont l'activité inflammatoire apparaît supérieure à la normale. En outre, cette sur-activation est également observée dans les monocytes des patients souffrant de la CBP, notamment via la surexpression du TLR4.[144] Globalement, cette hyper-réactivité est maintenue probablement par la réponse immunitaire innée. Les monocytes inflammatoires et lymphocytes NK des patients CBP peuvent favoriser l'activation des lymphocytes T vers le type 1.[145,146] Ces mécanismes pourraient être responsables de la modulation de la réponse adaptative, depuis son initiation (ou *priming*) à son maintien au cours de l'inflammation chronique. En parallèle, l'inflammation locale et la mort des cholangiocytes (exposition des DAMPs [*damage associated molecular pattern*] et d'antigènes de PDC-E2), permettent de maintenir la continuité de la réponse auto-immune.

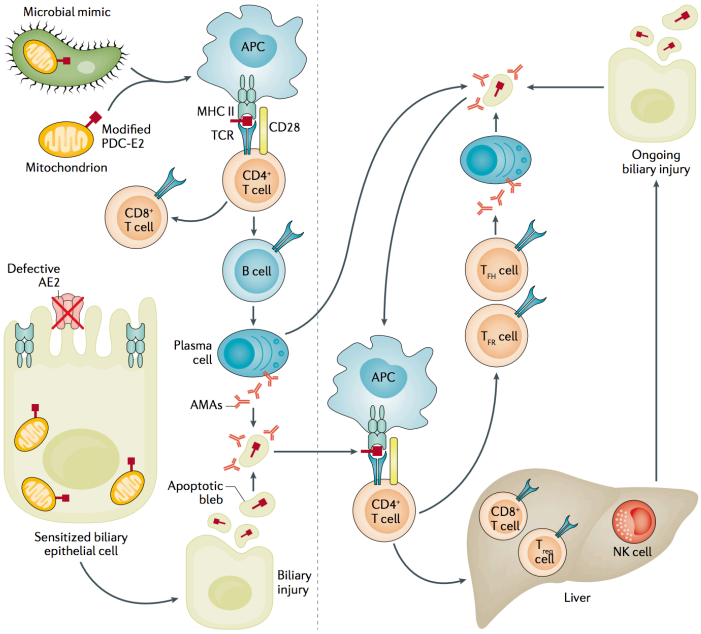


Figure 11 : Etiologie de la CBP.[147] L'exposition à une imitation environnementale d'une sous-unité E2 modifiée du complexe mitochondrial pyruvate déshydrogénase (PDC-E2) conduit à une réponse immunitaire ciblant les cellules épithéliales biliaires (BEC). Lors de l'activation de la réponse immunitaire adaptative par des cellules présentatrices d'antigène (APC) portant un auto-antigène lié au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II), des

anticorps anti-mitochondriaux (AMA) spécifiques de la maladie sont produits par des cellules plasmatiques qui ciblent des épitopes immunodominants de PDC- E2 sur la membrane mitochondriale interne. Les BEC lésés exprimant un échangeur d'anions 2 (AE2) dysfonctionnel sont sensibilisés à l'apoptose en raison de la perturbation du parapluie biliaire riche en bicarbonate. Un AE2 dysfonctionnel conduit à une sensibilisation des BEC à l'apoptose, ce qui entraîne une exposition de PDC-E2 dans une bulle apoptotique. Ce complexe immunogène est reconnu par les AMA en circulation et entraîne la formation d'un complexe antigène-anticorps qui contribue à la lésion cellulaire. Les lésions biliaires sont le résultat d'une réponse immunitaire circulante et intrahépatique dérégulée caractérisée par un déséquilibre entre les voies effectrices et régulatrices. Les lymphocytes T effecteurs pro-inflammatoires, y compris les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et les lymphocytes T auxiliaires folliculaires (TFH), sont régulés à la hausse et favorisent les lésions biliaires, encore renforcées par les dommages induits par les cellules NK (Natural Killer) intrahépatiques qui déclenchent la libération d'autoantigène et l'auto-réactivité des lymphocytes T en présence des APC, y compris des BEC. Cette réponse préjudiciable est insuffisamment supprimée par l'action régulatrice des cellules T régulatrices circulantes et intrahépatiques (Treg) et des cellules T régulatrices folliculaires (TFR), conduisant finalement à une inflammation progressive, une cholestase et une fibrose biliaire. La ligne grise verticale distingue les phases de déclenchement environnemental, de perte de tolérance et de lésion biliaire (à gauche) et de dérégulation immunitaire sur plusieurs lignées (à droite). TCR : récepteur des cellules T.

Les modèles murins de CBP

Plusieurs modèles murins de CBP, spontanés (génétiques) ou induits (immunisation), ont été développés depuis 2006, avec plus au moins d'homologie avec la pathologie humaine.[148–152] Le tableau suivant résume les principaux modèles :

Modèle	Génétique/ Immunisation	Fond génétique	Description	Prédominance féminine	AMA	Granulomes	Infiltrations péri-biliaires de lymphocytes T	Lésions biliaires	Fibrose	Cytokines pro-inflammatoires	Réponse immunitaire dépendante de	Commentaires	Réf
NOD.c3c4	Génétique	NOD	Souris NOD contenant sur leur chromosome 3 et 4 des Idd provenant de souris C57B/L6.	Non	50-60%	Oui	Oui	Faibles, destructions non suppuratives, obstructions biliaires	Non, faible	Oui	Th1/Th2, $CD8^+$	Affecte aussi les canaux extra-hépatiques. Développement de cystes biliaires.	153, 154
dnTGF-βRII	Génétique	C57B/L6	Expression d'une forme dominante négative (dn, perte de fonction) du TGF-βRII sous la régulation du promoteur du gène cd4 (donc restreint au lymphocytes T $CD4^+$).	Non	100%	Non ou très peu	Oui	Modérées, destructions biliaires	Non	Oui	Th1/Th17, $CD8^+$, NKT	Colite, durée de vie plus courte, régime sans Helicobacter pour éviter le développement de MICI.	155, 156
$IL2R\alpha^{-/-}$	Génétique	C57B/L6	Délétion systémique du gène il2ra.	Non	100%	Non	Oui	Modérées, destructions non suppuratives	Non	Oui	Th1/Th2 $CD8^+$	Colite ulcérative, anémie.	157
$Ae2_{ab}^{-/-}$	Génétique	FVB/N	Délétion de certaines régions du gène ae2 empêchant l'expression des isoformes $AE2_a$, $AE2_{b1}$ et $AE2_{b2}$.	Non	40-80%	NA	Oui	Faibles à modérées	Oui	Oui	Th1, $CD8^+$	Apparition tardive de la cholangite.	158
Scurfy	Génétique	C57B/L6	Inactivation du gène foxp3 dans le thymus (mutation sf sur le chromosome X) qui empêche le développement de lymphocytes T régulateurs.	Mâle seulement	100%	Non	Oui	Faibles à modérées	Non	Oui	Th1/Th17, $CD8^+$	Durée de vie courte.	159

ARE-Del	Génétique	C57B/L6	Délétion de l'élément riche en AU au niveau du 3'UTR du gène codant pour l'IFNγ, ce qui augmente la stabilité de son ARN messager. Cela résulte en l'expression chronique d'IFNγ.	Oui	100%	Oui (femelle seulement)	Oui	Faibles à modérées chez les mâles, modérées à sévères chez les femelles, destructions non suppuratives	Oui (femelle seulement)	Oui	Th1	Développement d'un lupus (phénotype modéré).	160
2OA-BSA	Immunisation	C57B/L6	Injections intrapéritonéales d'acide 2OA-BSA dans de l'adjuvant de Freund.	Non	100%	Oui	Oui	Faibles à modérées	Non	Oui	Th1/Th17, $CD8^+$	Apparition d'une légère péritonite.	161
2OA-BSA + αGalCer	Immunisation	C57B/L6	Injections intrapéritonéales du 2OA-BSA dans de l'adjuvant de Freund et injections intraveineuses de αGalCer.	Non	100%	Oui	Oui	Modérées	Oui	Oui	Th1/Th17, $CD8^+$	Apparition d'une légère péritonite. Phénotype plus sévère que pour l'immunisation avec le 2OA-BSA seul.	162
Novosphingobium aromaticivorans	Immunisation	C57B/L6, NOD1101, Balb/c, SJL	Injection intraveineuse de N. aromaticivorans et traitement antibiotique par voie orale (ampicilline et streptomycine).	Non	100%	Non ou très peu	Oui	Faibles à modérées	Non	Oui	$CD4^+$, $CD8^+$, NKT	N. aromaticivorans exprime des protéines ayant une forte homologie avec PDC-E2, mais possèdent également des glycosphingolipides capables d'activer les lymphocytes NKT.	163

Escherichia coli	Immunisation	NOD.B6-Idd10/Idd18	Injection intraveineuse de E. coli.	Non	100%	Non	Oui	Faibles	Non	NA	NA	E. coli exprime des protéines ayant une forte homology avec PDC-E2.	[164]

Tableau 3 : Résumé des différents modèles murins de CBP et de leurs caractéristiques. Ae2 : échangeur d'anion 2, AMA : auto-anticorps anti-mitochondriaux, CBP : Cholangite biliaire primitive, foxp3 : proéine forkhead-box 3, Idd : susceptibilité au diabète dépendante de l'insuline, IFNγ : interferon γ, IL2Rα : récepteur 2 alpha à l'interleukine 2 MICI : maladie inflammatoire chronique de l'intestin, NKT : lymphocytes T natural killer, NOD : diabétique non obèse, PDC-E2 : sous-unité E2 du complexe pyruvate déshydrogénase, TGF-βRII : récepteur 2 du facteur de croissance transformant béta, Th : lymphocyte T auxiliaire, αGalCer : alpha-galactosylceramide, 2OA-BSA : acide 2 octynoique conjugué à l'albumine bovine sérique.

Pour cette étude, nous allons utiliser le modèle induit par immunisation avec le 2OA-BSA (acide 2 octynoique conjugué à l'albumine bovine sérique) et l'αGalCer (*alpha-galactosylceramide*).[165] Ce modèle a l'avantage d'être plus facilement accessible qu'un modèle génétique, mais également de pouvoir choisir la souche de souris utilisée. Contrairement à certains des modèles génétiques, il ne perturbe pas la totalité du système immunitaire, ce qui pourrait par la suite fausser l'analyse de la réponse anti-tumorale. Ce modèle se concentre sur la spécificité de la réponse auto-immune dans le cas de la CBP, et au moins sur l'antigène qui est perçu comme initiateur de la pathologie.

C. La cholangite sclérosante primitve (CSP)

La CSP : données épidémiologiques et cliniques

La cholangite sclérosante primitive est une maladie inflammatoire affectant les moyens et/ou gros canaux biliaires. Elle est caractérisée par une cholestase, c'est-à-dire une diminution de la sécrétion biliaire, due à l'installation d'une fibrose avec sténose, au niveau de l'espace porte. Cette fibrose est très caractéristique de la CSP avec une forme en peau d'oignon, c'est-à-dire des couches de fibrose organisées de manière concentriques autour du canal biliaire. Il est aussi fréquent d'observer une réaction ductulaire (prolifération anormale des cholangiocytes formant des canaux biliaires non fonctionnels) autour des espaces portes touchés. La CSP peut évoluer vers la cirrhose et provoquer un lourd dysfonctionnement du foie. La cholangite sclérosante est qualifiée de primaire si elle est la première manifestation observée, et de secondaire si elle est la conséquence d'une autre pathologie. Son incidence est entre 0,9 et 1,31 pour 100 000, ce qui en fait une maladie très rare. Elle touche plutôt les hommes, à hauteur de 65-70%, et le diagnostic est généralement posé entre 30 et 40 ans. Plusieurs formes de CSP sont également à distinguer. La forme la plus classique affecte les larges canaux biliaires, cependant une forme moins courante touche les petits canaux biliaires. Par ailleurs, des formes associant une composante auto-immune sont aussi possibles. Chez certains jeunes patients, entre 7 et 14%, il existe un chevauchement entre la CSP et l'HAI, de ce fait ils présentent les symptômes des deux pathologies, dont la présence des auto-anticorps et la fibrose biliaire. D'autres malades, environ 10%, présentent un taux d'IgG4 anormalement élevé, avec infiltration de plasmocytes autour des voies biliaires, généralement sans symptômes associés à l'atteinte d'autres organes. Ces derniers doivent être dissociés des patients présentant une cholangite associée aux IgG4 ou IAC (*IgG4-associated cholangitis*) qui est souvent la manifestation hépatique d'une pathologie multi-organe. La CSP est également le premier facteur de risque pour le développement du CC. Cela est dû à l'inflammation chronique induite autour des canaux biliaires qui favorise l'apparition de tumeurs malignes. On estime qu'entre 10 à 20% des patients atteints de CSP développeront un CC. Cela implique leur surveillance tout au long de leur vie.[166–168]

La CSP est souvent décrite comme une maladie inflammatoire non auto-immune, de par sa prédominance masculine et le manque de réponse aux immunosuppresseurs. Par ailleurs, aucune cible spécifique du système immunitaire n'a pu être établie à ce jour. De plus, les anticorps retrouvés chez les patients ont généralement une faible affinité pour leur cible et leur fréquence varie beaucoup selon l'étude ce qui ne permet pas d'en faire une valeur diagnostique ou prédictive.[169] Ce constat, ainsi que l'association très importante de la CSP avec les MICIs (maladies inflammatoires chroniques de l'intestin), semble attribuer cette pathologie à une dérégulation non spécifique de la réponse immunitaire. Par exemple, les malades ont un nombre de lymphocytes Treg plus faible dans le foie et circulant,[170] ce qui est généralement signe d'un mauvais maintien de l'homéostasie immunitaire. Cependant la CSP est aussi associée à certains polymorphismes du HLA et à l'apparition de maladie auto-immunes, ce qui est généralement caractéristique de ces dernières.[171] Néanmoins il semble que les MICIs sont aussi fortement associées avec l'apparition de pathologies auto-immunes ce qui pourrait en partie expliquer cette observation chez les patients avec une CSP. Par ailleurs, la CSP est connue pour être associée avec le HLA-DR3, ce qui est également le cas de plusieurs maladies auto-immunes. Finalement, les manifestations auto-immunes ne semblent pas affecter le pronostique des patients, signifiant qu'elles ne sont pas secondaires à la CSP mais concomitantes.[172] Ces différents aspects laissent à penser que cette cholangite est probablement une maladie très hétérogène.

Réponse inflammatoire et microbiote lors de la CSP

La CSP est généralement associée à une MICI, dans 60 à 80% des cas.[173] Cette dernière est parfois diagnostiquée en décalée (avant ou après). L'étiologie de la CSP, et notamment son déclenchement, n'est pas connu. Le lien avec les MICI semble montrer un rôle de l'environnement et notamment du microbiote intestinal. A noter que celui-ci a une composition « anormale » chez les patients CSP, par rapport à un individu sain. En effet, sa diversité intra-individu est plus faible que chez les sujets sains, et il est enrichi en genre *Veillonella*, *Enterococcus*, *Fusobacterium* et *Lactobacillus*.[174,175] Mais il est difficile de déterminer si la dysbiose est la conséquence ou la cause du développement de la cholangite. Lors d'une dysbiose, l'intégrité de la

muqueuse intestinale n'est plus maintenue ce qui expose le foie à des bactéries ou leurs composés. En effet le microbiote est riche en agonistes des PRRs (*pattern recognition receptors*), qui peuvent activer une réponse inflammatoire, et ce notamment dans le foie.[176] Le microbiote peut aussi directement activer une réponse immunitaire avec un phénomène de mimétisme moléculaire. En effet chez certains patients souffrant d'une CSP, des p-ANCA, (*perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) sont retrouvés et ciblent la protéin β-tubuline isotype 5. Par ailleurs, ces mêmes anticorps peuvent cross-réagir avec une protéine bactérienne, hautement conservée, et exprimée par la quasi-totalité des bactéries composant la flore intestinale.[177] Au-delà de l'activation d'une réponse immunitaire hépatique, il apparaît que lors de la CSP un nombre non négligeable de lymphocytes T infiltrés dans le foie sont en fait primés au niveau de l'intestin.[178] En effet, on observe chez ces patients un plus grand nombre de clones communs enrichis entre le foie et l'intestin par rapport aux sujets contrôles ;[179] et ces lymphocytes sont ensuite recrutés via la sécrétion de CCL (*C-C motif chemokine ligand*) 25 par les cellules endothélial hépatiques.[180] Il également intéressant de noter que la composition de la bile peut jouer sur la composition du microbiote intestinal, et que les bactéries présentes dans l'intestin métabolisent les acides biliaires primaires en secondaires, ce qui influence la production de ces derniers dans le foie, reliant de ce fait la physiologie biliaire à la composition du microbiote.[181] Par exemple, certains patients bénéficiant d'antibiothérapies, ont montré une amélioration de leur état général, ce qui confirme la probable implication du microbiote intestinale dans l'étiologie de la maladie.[182] Par ailleurs, les résultats d'analyses GWAS ont indiqué que la CSP était fortement associée à certains polymorphismes génétiques, tels que les HLA, mais également d'autres, impliqués dans la réponse T.[183] Finalement, d'autres études ont pu mettre en exergue des loci de susceptibilité, communs entre la CSP et les MICIs, dans des gènes notamment importants pour le maintien de l'homéostasie de la muqueuse intestinale.[184,185]

Un nombre important de lymphocytes T sont présents au niveau des espaces portes inflammés. Beaucoup de neutrophiles et de macrophages sont aussi retrouvés lors de l'inflammation vers les canaux biliaires indiquant un rôle de ces composants du système immunitaire. L'inflammation chronique installée lors de la CSP est donc la

résultante de la coordination entre l'activation du système immunitaire inné et le recrutement de cellules du système immunitaire adaptatif. La pathologie semble initiée avec le recrutement autour des canaux biliaires de plasmocytes, de lymphocytes T et de neutrophiles. L'induction de lésions entraîne la sécrétion par les cholangiocytes de cytokines pro-inflammatoires, pro-fibrogéniques et des molécules d'adhésion. A terme, plus de 50% des patients subiront une transplantation hépatique afin de palier à l'amoindrissement des fonctions biliaire et hépatique.[166,168]

Les modèles murins de CSP

Du fait de la mauvaise connaissance de l'étiologie de la CSP, le développement de modèles animaux est difficile. Néanmoins plusieurs modèles murins permettent de mimer les principales caractéristiques anatomiques et biochimiques de cette pathologie. Le tableau suivant regroupe les principaux modèles existants :[186–188]

Modèle	Génétique /induit	Fond génétique	Description	Augmentation de l'activité sérique des transaminase et/ou phosphatases	Fibrose péri-ductale en peau d'oignon	Infiltrations péri-biliaires de leucocytes	Cholangite fibrosante et oblitérante	Association avec des MICIs	Commentaires	Réf
Mdr2$^{-/-}$	Génétique	FVB/N	Délétion du gène mdr2 qui code pour un transporter impliqué dans la formation de la bile.	ALT et AP	Oui	Oui	Oui	Non	Développent un CHC sur le long terme.	189
Cftr$^{-/}$-	Génétique	C57B/L6	Délétion du gène cftr qui code pour un canal chlorure.	NA	Oui	Oui	Oui	NA	Modèle de mucoviscidose, cholangite modérée avec risque d'occlusion intestinale. N'affecte pas les gros canaux biliaires.	190
fch/fch	Génétique	Balb/c	Mutation ponctuelle dans le gène de la ferrochelatase (homogyzote fch/fch), résultant en une baisse de 95% de son activité enzymatique.	ALT, AST et AP	Oui	Non	Oui	NA	N'affecte pas les gros canaux biliaires.	191
Fra-1 transgène	Génétique	C57B/L6	Le gène murin fra-1, qui permet de former le facteur de transcription AP-1, est fusionné avec le promoteur du CMH II. Cela induit l'expression constitutive de fra-1.	ALT	Oui	Oui	Non	NA	Durée de vie courte dû à l'apparition de compression médullaire. N'affecte pas les gros canaux biliaires.	192

Cdh1$^{\Delta L}$	Génétique	C57B/L6	Délétion spécifique du foie, du gène cdh1.	ALT, AP	Oui	Oui	Non	NA	N'affecte pas les gros canaux biliaires. Développement spontanée de CHC dans 16% des animaux mâles.	193
Cryptosporidium parvum	Induit	BALB/c nu/nu, BALB/c SCID, C57BL/6-SCID, NIH-III nu/nu CD40$^{-/-}$, IFNγ$^{-/-}$, CD154$^{-/-}$, CD40-CD154$^{-/-}$, Tnfsf5$^{-/-}$, Tnfrsf1a$^{-/-}$, Tnfrsf1b$^{-/-}$, Tnfrsf1a/1b$^{-/-}$, Tnfsf5-Tnfrsf1a$^{-/-}$, Tnfsf5-Tnfrsf1b$^{-/-}$, Tnfsf5-Tnfrsf1a/1b$^{-/-}$, CD40-Tnfrsf1a/1b$^{-/-}$	Administration par voie orale de *C. parvum*. Infection de souris immunodéficiences qui permet le développement de dommages importants en réponse au pathogène.	NA	Oui (dépend de la souche utilisée)	Oui (dépend de la souche utilisée)	Oui (dépend de la souche utilisée)	Oui (dépend de la souche utilisée)	Modèle complexe et peu caractérisé. Les caractéristiques histo-pathologiques dépendent grandement de la souche de souris utilisée. Morbidité importante avec certaines souches.	194–196
Helicobacter hepaticus	Induit	A/JCr, C3H/HeNCr, C57BL/6NCr, A/J	Administration par voie orale de *H. hepaticus.*	NA	Oui	Oui	Oui	Oui	Modèle complexe et peu caractérisé. Décrit comme une hépatite chronique par les auteurs.	197, 198

Ligation biliaire	Induit	C57B/L6	Par laparotomie, le canal cholédoque est ligaturé puis ouvert entre deux fils de nylon, au-dessus du pancréas.	ALT et AP	Oui	Oui	Oui	NA	Modèle peu reproductible.	199, 200
DDC	Induit	SWISS, FVB/N, C57BL/6, 129/Sv	Régime contenant 0,1% de DDC durant 1, 4 ou 8 semaines.	ALT et AP	Oui	Oui	Oui	NA	Phénotype moribond sur le long terme. Formation de caillots de porphyrine.	201
LCA	Induit	SWISS	Régime contenant 0,1% de LCA durant 1 à 4 jours.	ALT et AP	Oui	Oui	Oui	NA	Phénotype moribond très rapidement.	202
DDS	Induit	CD-1	Traitement DSS par voie orale à 2,5% dans l'eau.	Oui	Non	Oui	Non	Oui	N'affecte pas les gros canaux biliaires.	203
Réaction du greffon contre l'hôte (Graft versus host disease)	Induit	Balb/c	Transplantation de splénocytes et de cellules de moelle osseuse (ratio 9:1) de souris B10.D2 dans des souris Balb/c irradiées. Les deux souches sont haplocompatibles pour le CMH I H-2D, mais possèdent des antigènes d'histocompatibilité mineur différents.	NA	Oui	Oui	Non	NA	Association occasionnelle de sclérodermie.	204, 205

OVA-Bil	Induit	C57B/L6	Les souris OVA-Bil expriment OVA sous le contrôle du promoteur d'un transporteur d'acide biliaire, résultant en son expression aberrante par les cholangiocytes à leur membrane. Le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de OVA provoque une réponse immunitaire contre les voies biliaires	ALT	Non	Oui	Non	Non	Pas de développement de fibrose. Induction proche d'une pathologie clairement auto-immune (pas de tolérance face à un antigène ici, l'ovalbumine).	

Tableau 4 : Résumé des différents modèles murins de CSP et de leurs caractéristiques. ALT : alanine aminotransférase, AP : alkaline phosphatase, AP-1 : protéine activatrice 1, AST : aspartate aminotransférase, cdh1 : cadhérine E, cftr : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CHC : carcinome hépatocellulaire, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité, DDC : 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine, DSS : dextran sulfate de sodium, fra-1 : antigène relatif à Fos 1, IFNγ : interferon γ, LCA : acide lithocholique, mdr2 : protéine de résistance multi-drogue 2, OVA : ovalbumine, Tnfrsf : Superfamille des récepteurs des facteurs de nécrose tumorale, Tnfsf : Superfamille des facteurs de nécrose tumorale.

Pour cette étude, nous allons utiliser le modèle induit par le DDC (3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine),[201] qui a l'avantage d'être facile à mettre en place tout en récapitulant beaucoup de caractéristiques de la pathologie observée chez l'homme. En outre, le fait que le modèle soit induit peut permettre de l'adapter à un fond génétique compatible avec les autres modèles murins de l'étude. Il est également bien caractérisé, et ne possède pas de composante auto-immune, ce qui en fait un modèle très adéquat pour ce travail de recherche.

D. Le cholangiocarcinome

Description clinique du cholangiocarcinome

Le terme "cholangiocarcinome" regroupe les tumeurs malignes de type adénocarcinome se développant au niveau de l'arbre biliaire. Le CC peut être situé au niveau des petits et gros canaux biliaires intrahépatiques (intrahépatique, iCC), au niveau du canal hépatique commun (périhilaire, pCC) ou situé plus loin au niveau du canal cholédoque (distal, dCC). Les dCC et pCC sont donc extrahépatiques (eCC), ils représentent la plus grande partie des CC, avec respectivement 50-60% et 20-30% des diagnostiques. Ces eCC sont très largement des adénocarcinomes mucineux. Les iCC sont également classifiés en 3 sous-types selon l'apparence de la tumeur : exophytique (MF-iCC pour *mass-forming*), péricanalaire (PI-iCC pour *periductal infiltrating iCC*) et endocanalaire (IG-iCC pour i*ntraductal growing*). Les PI-iCC et les IG-iCC affectent exclusivement les moyens et gros canaux biliaires et arborent également dans la grande majorité des cas un type mucineux. En revanche, les MF-iCC touchent les petits canaux biliaires et présentent généralement un phénotype mixte, moins fréquemment, un type mucineux. Les iCC mixtes présentent un certain nombre de similarité avec un sous-type de CHC positif pour la cytokératine 19. De manière intéressante, la classification établie par rapport à la localisation sur l'arbre biliaire semble donc également correspondre aux différentes caractéristiques clinico-pathologiques.[206,207]

Causes et facteurs de risque associés au CC

Le CC est un cancer rare, qui représente environ 3% de toutes les tumeurs gastro-intestinales. Dans les pays occidentaux, son incidence est estimée entre 0,5 et 2 pour 100 000 individus. Cependant son incidence tend à augmenter, notamment par la consommation importante d'alcool, de tabac et d'une diète riche en calories. Dans le nord de la Thaïlande, l'incidence du CC atteint un taux record de 100 cas pour 100 000 personnes. Cela est dû à la présence d'un ver parasite, la grande douve du foie, dont les infections sont malheureusement assez courantes, et qui est un facteur de risque pour le iCC. De ce fait, dans cette région, le CC représente 85% des tumeurs primaires du foie, contre 10-15% généralement. Dans les autres régions du monde, le principal

facteur de risque associé au CC est la CSP, son association est particulièrement bien établie avec le pCC. 50% des patients souffrant de CSP développant un CC sont souvent diagnostiqués du CC 24 mois après le premier diagnostic de CSP. Ils ont généralement la quarantaine, contre soixante-dix ans pour le reste de la population. Plus récemment l'association entre les infections aux virus des hépatites B et C et l'apparition du CC a été mise en évidence. De manière générale, les inflammations chroniques du foie, et la cirrhose, sont des facteurs de risque pour le développement de tumeurs malignes au niveau du foie, CC inclus. Cependant, la plupart des cas de CC ne semble pas associé à un facteur de risque connu. En outre, des syndromes métaboliques, l'obésité, ou des lithiases hépatiques pourraient aussi favoriser l'émergence du CC. Plusieurs polymorphismes de gènes ont récemment été identifiés comme facteurs de risque pour le CC. Parmi ces gènes, on peut en retrouver impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN, la protection cellulaire contre les toxines, ou l'immunosurveillace. Le taux de survie à 5 ans des patients est très dépendante du stade au moment du diagnostic et de la localisation de la tumeur. Il varie entre 2 et 20%, ce qui en fait un cancer de mauvais pronostique. A noter que les CC associés à une cirrhose hépatique font partie des plus mauvais pronostiques, de même que les CC métastatiques distants (2% à 5 ans). Au contraire, les iCC qui sont bien localisés lors du diagnostic bénéficient du meilleur taux de survie à 5 ans avec plus de 20%. Cependant, la plupart des patients souffrant de CC sont diagnostiqués assez tardivement, car ils sont souvent asymptomatiques dans les premiers stades. Cela explique en partie le faible taux de survie. De plus, le CC est généralement chimio-résistant et ne répond que très peu aux traitements conventionnels. Ces derniers consistent généralement en la combinaison de gemcitabine et d'un sel de platine ; le cisplatine étant encore très largement préféré. Cette combinaison est le traitement standard pour les patients non éligibles à la résection ou à un stade très avancé. Malgré tout, les patients qui reçoivent ces soins survivent en moyenne moins d'un an, indiquant sa faible efficacité. Dans 35% des cas, les malades peuvent bénéficier d'une résection et ou d'une transplantation hépatique ; cette dernière est uniquement applicable pour le traitement des iCC et pCC. Chez certains patients, une chimio-embolisation intra-artérielle peut également être proposée. Les mécanismes moléculaires menant à l'apparition du CC ne sont pas vraiment clairs. Les cellules

tumorales semblent pouvoir provenir de cholangiocytes transformés, d'hépatocytes transdifférenciés et transformés, ou bien de cellules progénitrices situées au niveau du canal de Hering.[206,208,209]

Les altérations génétiques et épigénétiques les plus fréquentes dans le CC sont listées dans le *tableau 3*. De ce fait, les voies de signalisation des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), induisant la prolifération cellulaire et de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*), stimulant la survie cellulaire, sont particulièrement sur-régulées. Il est également décrit que les cellules de CC surexpriment un certain nombre de récepteurs à des facteurs de croissance tels que l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*), l'HGFR (*hepatocyte growth factor recetpor*), des récepteurs à l'œstrogène, surexpriment la protéine YAP (*yes-associated protein*), et exhibent une suractivation des voies de signalisation Notch et Hedgehog. En outre, le micro-environnement du CC est très largement impliqué dans son développement. Notamment, lors d'un contexte inflammatoire, la sécrétion d'IL6 et d'autres cytokines pro-inflammatoires par des leucocytes ou par les cellules de CC elles-mêmes, permet de stimuler la croissance tumorale via l'activation de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Par ailleurs, comme beaucoup de tumeurs malignes, le CC sécrète une importante quantité de TGFβ qui accroit son pouvoir métastatique (en favorisant l'EMT) et active la voie Wnt, ce qui par la même occasion induit une forte immunosuppression dans le microenvironnement tumoral.[206,210,211]

Molecular target	Functional role	Possible clinical features
Genetic alterations		
TERT	Telomere stability	Activation (associated with Wnt signalling in HCC)
TP53	Cell cycle	Inhibition (DNA damage response)
WNT or *CTNNB1*	Development and differentiation	Activation (genomic stability)
KRAS, *BRAF*, *SMAD4*, *FGFR2*	Tyrosine kinase receptor signaling	Activation (survival and proliferation)
Epigenetic alterations		
IDH1, *IDH2*	Genome maintenance (epigenetic, DNA methylation)	Altered methylation status, survival
SWI–SNF complex (*ARID1A*, *PBRM1*, *BAP1*)	Chromatin remodelling	Activation (poor prognosis)
Mixed-lineage leukaemia 3 (*MLL3* or *KMT2C*)	Methyltransferase or chromatin remodelling	Activation
HDAC6	Regulate primary cilium morphology or functionality	Overexpressed

Tableau 5 : les principales altérations génétiques et épigénétiques dans le CC. (modifié de Banales et al., Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.,2016)[206] ARID1A : AT-rich interactive domain-containing protein 1A, BAP1 : BRCA1

associated protein 1, BRAF : v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B, CTNNB1 : catenin Beta 1, FGFR2 : fibroblast growth factor receptor 2, HDAC6 : histone deacetylase 6, IDH1/2 : isocitrate dehydrogenase 1/2, KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, MLL3 : mixed-lineage leukemia protein 3, PBRM1 : polybromo-1, SMAD4 : mothers against decapentaplegic homolog 4, SWI-SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable, TERT : telomerase reverse transcriptase, TP53 : tumor protein p53.

Les modèles murins de CCA

Le développement de modèles murins de cholangiocarcinome, fidèles à la clinique, est un challenge nécessaire à la compréhension des mécanismes moléculaires de l'oncogenèse et de la progression tumorale. Pour ce faire, des modèles génétiques, basés sur les altérations génétiques observés chez les patients (***Tableau 5***), ont été développés. Ils permettent notamment d'apprécier l'origine des cellules cancéreuses. Cependant, un certain nombre d'entre eux entraînent l'apparition de modèle mixte CC-CHC, ce qui n'est pas forcément toujours pertinent. Les modèles induits, quant à eux, tirent parti du lien entre inflammation et oncogenèse. Finalement le développement de modèle implantable favorise un accès simple et flexible à des modèles de CC, notamment pour effectuer des tests d'efficacité pour de nouveaux traitements.[212,213] Le tableau suivant résume les modèles de CC actuellement disponibles :

Modèles	Transgénique/ transduction/ induit/greffe	Fond génétique	Description	Commentaire	Ref
Smad4$^{-/-}$ Pten$^{-/-}$	Transgénique	Mixte	Délétion des gènes smad4 et pten spécifiquement dans le foie (hépatocytes et cholangiocytes).	Modèle tumoral lent et tributaire des élevages (synchronisation très compliquée).	214
Kras^{G12D} Pten$^{-/-}$	Transgénique	Mixte	Délétion du gène pten, et expression d'une forme constitutivement activée de kras, spécifiquement dans le foie (hépatocytes et cholangiocytes).	Modèle tributaire des élevages (synchronisation très compliquée).	215
Kras^{G12D} IDH2^{R172K}	Transgénique	Mixte	Expression d'une forme constitutivement activée de kras et mutée de idh2 (production d'un oncométabolite) spécifiquement dans le foie (hépatocytes et cholangiocytes).	Modèle tumoral lent et tributaire des élevages (synchronisation très compliquée).	216
Kras^{G12D} p53$^{-/-}$	Transgénique	Mixte	Délétion du gène p53, et expression d'une forme constitutivement activée de kras, spécifiquement dans le foie (hépatocytes et cholangiocytes).	Modèle tributaire des élevages (synchronisation très compliquée). Peut provoquer des lésions CHC-CC mixte.	217
p53$^{-/-}$ CCL_4	Transgénique et induit	C57B/L6	Délétion du gène p53 et injections intrapéritonéales de CCL4 (10µL/g de poids, 3 fois par semaine).	Modèle tumoral lent et tributaire des élevages (synchronisation très compliquée). Développement d'un CC dans environ 50% des animaux.	218
Erbb-2A	Transgénique	Mixte	Expression constitutive (surexpression) de erbb2 par les cellules épithéliales grâce au promoteur BK5.	Principalement un modèle de cancer de la vésicule biliaire avec développement de CC plus tardif. Les animaux souffrent aussi de problèmes dermatologiques et peuvent avoir un cancer de la peau.	219
Notch1	Transgénique	Mixte	Expression constitutive (surexpression) de NICD dans le foie (hépatocytes et cholangiocytes).	Modèle tumoral lent et tributaire des élevages (synchronisation très compliquée). Lésions CHC-CC mixte, ou bien CHC.	220
myrAkt Yap^{S127A}	Transduction	C57B/L6	Injection dans la vésicule biliaire du système SBT pour l'intégration dans le génome et la surexpression de formes constitutivement activées de akt et yap, puis ligation du canal hépatique gauche. Injection intrapéritonéale d'IL33 durant les 3 jours consécutif au SBT.	Modèle tumoral assez rapide, mais délicat à réaliser dû à la chirurgie et à la ligation du canal hépatique.	221

myrAkt NICD	Transduction	FVB/N	Injection hydrodynamique du système SBT pour l'intégration dans le génome et la surexpression de NICD et d'une forme constitutivement activée de akt.	Modèle tumoral assez rapide.	222
$Kras^{G12V}$ $p53^{-/-}$	Transgénique et transduction	Mixte	Par électroporation dans le foie : délétion du gène p53 localement et injection du système SBT pour l'intégration dans le génome d'une forme constitutivement activée de kras.	Modèle tumoral rapide mais technique.	223
DEN + ligation biliaire	Induit	Balb/c	Injection intrapéritonéale de DEN (100mg/kg de poids, 2 injections séparées d'une semaine). Puis, ligation du canal hépatique après la jonction du canal hépatique gauche et médian, mais avant les canaux hépatiques droit et caudé. Puis, administration par voie orale de DEN (25mg/kg de poids chaque semaine).	Modèle délicat à réaliser dû à la ligation du canal hépatique (procédure plus adaptée chez le rat). Modèle tumoral lent et incidence du CC de 50%.	224
DEN + PCP	Induit	B6C3F1	Administration par voie orale de PCP (600ppm dans le régime alimentaire) pendant 25 semaines, et de DEN (20ppm dans l'eau) pendant 13 semaines.	Modèle tumoral lent et incidence du CC d'environ 65%.	225
Xénogreffe	Greffe	Nude, SCID	Injection de cellules humaines de CC (Mz-ChA-1, Sk-ChA-1, HuCCT-1, EGI1, RBE, TFK-1, QBC939, CCLP1, M139) en sous-cutané.	Méthode reproductible et accessible pour des "screening" de thérapies. Absence de microenvironnement tumoral. Incompatible avec des recherches sur le système immunitaire.	213
PDX	Greffe	Nude, SCID	Implantation de résection de tumeur primaire humaine directement en sous-cutané.	Permet de travailler avec une hétérogénéité, un profil génétique et moléculaire et une architecture tumorale la plus proche possible du patient.	226
Allogreffe	Greffe	C57B/L6	Injection de cellules murines de CC dans le foie (orthotopique).	Possibilité de travailler sur la réponse immunitaire et l'environnement micro-tumorale. Modèle sous-cutané reproductible et accessible	227

Tableau 6 : Résumé des différents modèles murins de CC. Akt : protéine kinase B, CC : cholangiocarcinome, CCL4 : tétrachlorométhane, CHC : carcinome hépatocellulaire, DEN : diéthylnitrosamine, erbb2 : erythroblastic oncogene B 2, idh2 : isocitrate déshydrogénase 2, kras : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, NICD : domaine intracellulaire de NOTCH1, notch1 : homologue Notch 1, associé à la translocation , PCP : pentachlorophénol, PDX : xénogreffe dérivée de patient, pten : phosphatase and TENsin homolog, p53 : protéine tumorale 53, SBT : sleeping beauty transposon, smad4 : Mothers against decapentaplegic homolog 4, yap : Yes-associated protein.

Pour la suite de l'étude nous ne pouvions pas nous permettre d'utiliser un modèle génétique qui pourrait perturber nos modèles de cholangites. De plus, une xénogreffe est ce qui reste le plus accessible pour suivre l'évolution de la croissance tumorale tout en s'assurant de la reproductibilité et de l'homogénéité des expériences. Cela permet aussi que ces dernières soient trop longues. Nous avions évidemment besoin d'un modèle syngénique puisque l'intérêt ici est bien d'étudier le système immunitaire. C'est pourquoi nous utiliserons dans ces travaux un modèle d'allogreffe, en sous-cutané, des cellules SB, générées dans le laboratoire du Pr Gores,[221] qui peuvent être expandues in vitro et réimplantées in vivo.[227]

III. Auto-immunité et inflammation

A. Phénomène de tolérance immunitaire

Mécanisme de tolérance centrale

Les mécanismes de tolérance au soi interviennent soit de manière centrale, c'est-à-dire durant la maturation du stock de lymphocytes T, dans le thymus, ou B, dans la moelle épinière, et avant leur passage dans la circulation générale, ou de manière périphérique sur le stock de lymphocytes naïfs en circulation.[228]

La tolérance centrale est induite pour les lymphocytes T en deux étapes : tout d'abord par sélection positive, puis par sélection négative. Ces deux phénomènes sont médiés par l'interaction des lymphocytes T immatures avec les cellules épithéliales thymiques (TEC pour *thymic epithelial cells*), capables d'induire ou non l'apoptose des lymphocytes.[229] (***Figure 12***)

- sélection positive dans le cortex : les thymocytes, double négatifs (ie. $CD4^-$ ou $CD8^-$), puis double positifs, dont le TCR interagit de manière suffisamment stable avec une affinité moyenne à faible avec les molécules du CMH exprimées par les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC pour *cortex thymic epithelial cells*), sont positivement sélectionnées et se différencient. Les cTECs présentant en effet des antigènes du soi, également exprimés en périphérie.[230] Cela peut sembler contre-intuitifs puisque l'objectif reste la suppression des thymocytes auto-

réactifs. Cependant, ce phénomène est dépendant de l'affinité du TCR avec le complexe antigène-CMH. Il semble que cette affinité nécessite d'être dans une fenêtre précise (ni trop haute, ni trop basse) afin d'induire une sélection positive.[231] C'est pourquoi il apparaît que la sélection positive de ces thymocytes soit le résultat de la présentation par les cTECs d'antagonistes de leurs TCRs. Ces derniers sont structurellement apparentés sans être identiques aux antigènes capables d'induire l'activation des lymphocytes T.[232] Et donc, à l'inverse les lymphocytes se liant trop fortement au complexe antigène-CMH des cTECs, ou bien incapables de s'y lier, meurent par apoptose.[233]

- sélection négative dans l'espace médullaire : par la suite, les thymocytes simples positifs (ie. $CD4^+$ ou $CD8^+$) vont transiter jusqu'à l'espace médullaire, particulièrement critique pour la tolérance centrale. Les TEC médullaires (mTEC pour *medullary thymic epithelial cells*) ont un rôle primordial dans cette sélection négative. Ces dernières ont la capacité d'exprimer des antigènes spécifiques de tissus (TSAs pour *tissue specific antigens*) grâce à l'action du facteur de transcription AIRE qui leur permet d'exprimer et de présenter une multitude d'épitopes du soi.[234] Il faut également noter que La zone médullaire contient aussi des DCs capables de présenter des antigènes du soi, captés depuis les mTECs, et donc de participer à l'élimination des clones auto-réactifs.[235] Les thymocytes possédant un TCR qui ne fixe pas les peptides présentés par les mTECs, sont alors négativement sélectionnés, et pourront continuer leur maturation. Les thymocytes capables de lier leur TCR à ces épitopes seront alors éliminés, probablement via un mécanisme impliquant TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*).[236] Pourtant, ce signal ne semble pas suffisant pour induire l'apoptose chez les thymocytes auto-réactifs. Plusieurs études ont en effet pu mettre en évidence la nécessité des signaux de co-stimulation CD80/CD86 et CD40, éliminer les thymocytes non désirés.[237–239] Néanmoins le réel mécanisme sous-jacent n'est pas clair. Est-ce l'effet directe de ces molécules de co-stimulation, en synergie avec d'autres, qui détermine le destin des lymphocytes T, ou bien ces molécules de co-stimulation permettent-elles d'induire un phénotype régulateur chez ces lymphocytes.[240] De ce fait, cela empêcherait l'acquisition d'un phénotype auto-réactif et pathologique. En effet, les

lymphocytes Treg ne sont pas éliminés dans le thymus, mais sont bien sélectionnés, car leur TCR reconnait un agoniste présenté par les mTERs.[241] Ces derniers ont ensuite, en périphérie, un rôle de maintien de la tolérance, de par leur pouvoir immunosuppresseur. Malgré ces différents mécanismes, il existe en périphérie des lymphocytes auto-réactifs non éliminés dans le thymus. Cela peut être dû à la faible avidité du TCR pour un peptide du soi, ou bien car le TCR n'aurait pas rencontré le bon complexe peptide-CMH.[242]

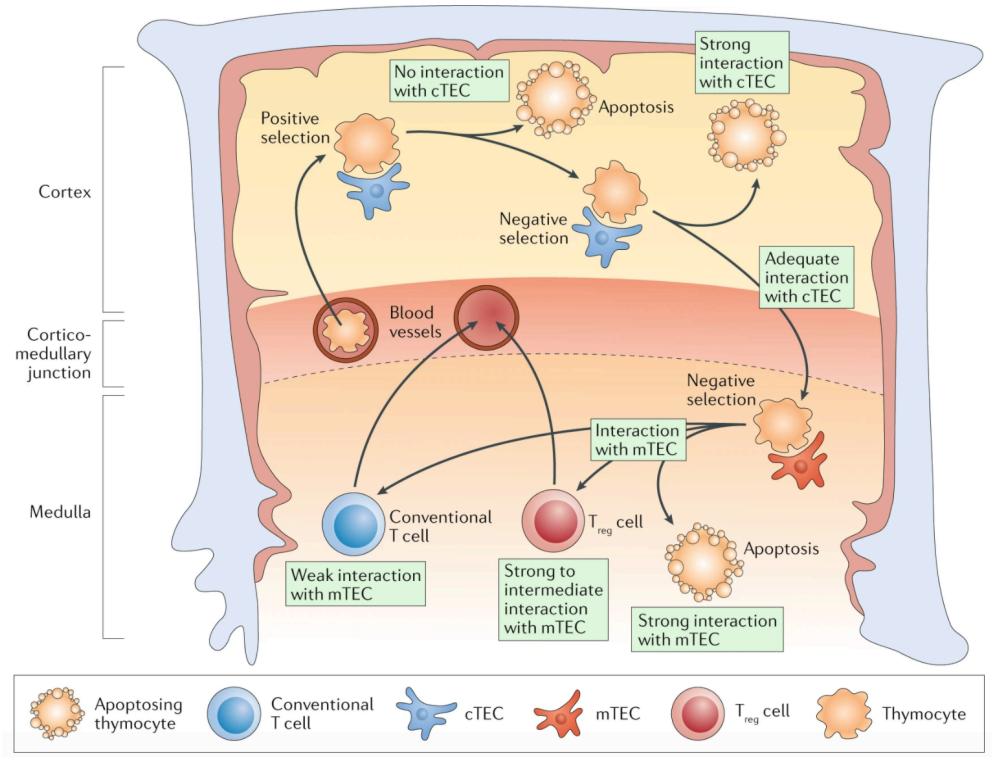


Figure 12 **: L'induction de la tolérance des lymphocytes T dans le thymus.**[243] Les interactions entre les thymocytes et les cellules épithéliales thymiques (TECs) se produisent par la liaison des récepteurs des cellules T aux antigènes. Les cellules autres que les TECs, y compris les cellules dendritiques et les macrophages, présentent également des antigènes aux thymocytes en développement dans le cortex et la moelle. Dans le cortex, les lymphocytes T ne pouvant pas interagir avec les cTECs ou présentant une trop grande affinité pour le complexe majeur d'histocompatibilité des cTECs sont éliminés, c'est la sélection négative. Dans l'espace médullaire, les lymphocytes T capables d'interagir faiblement avec les mTECs sont sélectionnés, c'est la sélection positive. Ceux pour lesquels, leurs interactions avec les mTECs sont trop fortes, subiront l'apoptose, ou deviendront des lymphocytes Treg. cTEC : TEC cortical, mTEC : TEC médullaire, Cellule Treg : cellule T régulatrice.

La tolérance centrale des lymphocytes B est le résultat de deux mécanismes. Le premier est l'édition des BCRs (*B cell receptor*) auto-réactifs par un processus de réarrangement qui implique les gènes RAG (*recombination-activating gene*). Cela peut transitoirement participer à l'émergence de lymphocytes B immatures poly-réactifs. La modification du BCR doit donc conduire à un nouveau récepteur ne liant plus d'auto-antigène.[244,245] Si l'avidité initiale du BCR est trop forte, ou si les stratégies de

réarrangement du BCR ont échoué, le clone de lymphocyte B est éliminé.[246,247] Il apparaît néanmoins que ce mécanisme ne soient pas le principal. En effet, les lymphocytes B auto-réactifs ne sont éliminés que lorsque le mécanisme d'édition du BCR a été épuisé.[244] Malgré ces deux processus d'élimination de clones B auto-réactifs, certains lymphocytes B retrouvés en périphérie sont aptes à fixer des antigènes du soi. Néanmoins un mécanisme d'anergie, probablement médié par les lymphocytes T,[248] permet d'éviter la production d'auto-anticorps.[249] Les lymphocytes B auto-réactifs périphériques vont, en partie, mourir par apoptose,[250] de manière dépendante du gène Bim (*Bcl-2-like protein 11*).[251]

Mécanisme de tolérance périphérique

La tolérance périphérique des lymphocytes T est par la suite assurée par plusieurs mécanismes, l'ignorance, la délétion, l'anergie, l'inhibition et la suppression.[252] L'ignorance des lymphocytes T face à un antigène est un des principaux mécanismes de tolérance. Il a été mis en évidence grâce, par exemple, à l'observation de lymphocytes T auto-réactifs à l'insuline chez des individus non diabétiques.[253] C'est le résultat de lymphocytes n'ayant tout simplement jamais été correctement primés par l'épitope pour lequel ils sont spécifiques.[254] Cela peut être dû à une trop faible expression de l'antigène,[255] ou bien lorsque celui-ci n'est pas, ou pas efficacement présenté par des cellules présentatrices d'antigènes (APCs pour *antigen presenting cells*) (l'antigène n'atteint pas l'organe lymphoïde ou le contexte n'est pas propice).[256,257] De ce fait, les lymphocytes T auto-réactifs restent alors exclus du tissu où l'épitope est exprimé. La délétion de clones auto-réactifs est également un moyen de préserver l'intégrité d'un tissu. Après activation, les lymphocytes T et B sur-régulent l'expression de Fas (*apoptosis antigen 1*) ce qui les rend sensibles à l'action de FasL, qui induit l'apoptose.[258,259] Par ailleurs, cela donne notamment lieu à une sorte de suicide chez des lymphocytes T activés,[260] car ils expriment Fas et FasL. Ce phénomène a pour but d'empêcher une réponse immunitaire trop forte (ce qui peut être le cas avec des auto-antigènes), et qui serait délétère pour le tissu environnant. L'anergie des lymphocytes T représente une sorte de désactivation après le priming, et ce, dû à l'absence de molécules de co-stimulation nécessaire au processus d'activation du lymphocytes T.[261] C'est aussi le cas lorsque l'environnement est

immunosuppresseur, par la présence d'IL10 ou de TGFβ par exemple.[262] L'inhibition de la réponse T est également un mécanisme bien décrit. Il se traduit par l'expression de molécules de contrôle immunitaire (*checkpoint*) par des APCs ou des cellules du stroma qui permet d'empêcher l'activation des lymphocytes.[261]

Induction d'un environnement tolérogène dans le foie

Le foie a un rôle immunitaire important de par ses liens avec le système digestif et son exposition continue à des antigènes bactériens provenant de la nourriture ou même à des toxines. Il constitue la dernière barrière pour éviter la pénétration de pathogènes provenant de l'appareil digestif dans la circulation générale. De ce fait, le foie, grâce à de nombreuses cellules immunitaires résidentes, est le siège d'une forte réponse innée.[263] Cependant, il induit également une importante tolérance immunitaire afin d'éviter l'activation de réponses adaptatives locales sources d'éventuels dommages hépatiques. En effet, à la vue des stimulations quasi continuelles du foie avec des antigènes bactériens, cela risquerait d'induire une inflammation chronique.[42]

Dans des conditions basales, bien que le foie soit relativement riche en APCs, ces dernières sont responsables de l'induction d'une importante tolérance. (***Tableau 7***).

De par l'abondance des KCs dans le foie, ces cellules constituent un mécanisme primordial afin d'éviter la rupture de la tolérance. En condition physiologiques, elles ont la capacité à induire une importante tolérance face à des antigènes provenant du bolus alimentaire ou des antigènes bactériens de pathogènes déjà éliminés. Cela est possible par leur faible expression de CMH de classe II et de molécules de co-stimulation, rendant l'activation des lymphocytes T ineffective, ou même via la production de prostaglandine (PG) E_2 qui réduit la capacité des DCs à induire une réponse immunitaire.[262] Ils produisent dans le même temps de l'oxyde nitrique (NO pour *nitric oxide*),[264] ou de l' IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase*),[265] inhibant directement les lymphocytes T. En outre, les KCs ont également en charge la phagocytose des cellules apoptotique dans le foie. Lors de ce phénomène, la sécrétion d'IL10 par les KCs est largement augmentée permettant de contenir d'éventuels dégâts hépatiques.[266] De la même manière que les KCs, les DCs et les LSECs sont également capables de phagocyter des cellules mortes ou mourantes dans le foie. Ces

trois types cellules sont alors activées de telles sortes à sécréter des cytokines de type Th2 plutôt que Th1, ce qui permet de moduler la réponse immunitaire en empêchant l'activation d'une réponse cytotoxique forte et de favoriser la tolérance.[267] Le rôle pro ou anti-inflammatoire des KCs est en réalité dépendant de leur polarisation, elle-même dépendante des signaux moléculaires sécrétés : PAMPs, DAMPs ou autres. On définit classiquement les deux types de polarisation comme indiqué : M1, macrophage classiquement activé avec une fonction pro-inflammatoire, et M2, macrophage alternativement activé.[268,269] Les macrophages M1 sont caractérisés par un phénotype $IL12^{hi}$ et $IL10^{lo}$, produisent d'importante quantité d'IL23,[270] et résultant d'une activation par l'interféron (IFN) γ, le TNFα ou d'autres cytokines pro-inflammatoires.[271,272] A l'inverse, les macrophages M2 ont d'abord été définis comme $IL12^{lo}$ et $IL10^{hi}$, résultant d'une activation par l'IL4.[273,274] Depuis, plusieurs sous-catégories de macrophages M2 ont pu être décrites.[272,275] Ils peuvent être induits par l'IL4 ou l'IL13 en macrophages M2a, ils peuvent réprimer l'induction de l'inflammation de type 1 et favoriser une immunité de type 2,[276,277] sont impliqués dans la réponse allergique et aux parasites,[278,279] et participent à la fibrose et au remodelage tissulaire,[277,280,281] et expriment l'arginase.[274] De ce fait, cela les rend peu compétents pour lutter contre les pathogènes intracellulaires,[282] mais permet la production de proline, impliquée notamment dans la cicatrisation.[278,283] L'exposition à des complexes immuns reconnus par des récepteurs du Fc et des agonistes des TLR (*toll like receptors*) polarise les macrophages en type M2b.[284] Ils favorisent une réponse auxiliaire de type 2 via notamment la sécrétion d'IL4, et augmentent la production d'IgG.[285,286] Ils produisent une grande quantité d'IL10 et de NO,[274] mais aussi d'autres cytokines pro-inflammatoire, leur conférant un rôle immuno-modulateur mais pas tellement anti-inflammatoire.[272,283] Finalement, les macrophages M2c sont le résultat d'une stimulation par l'IL10, le TGFβ ou les glucocorticoïdes.[287] Ils sont fortement immunosuppressifs en induisant des lymphocytes Treg ou en sous-régulant le nombre de cellules positives pour le CMH-II,[288,289] jouent un rôle protecteur contre la fibrose via notamment la sécrétion d'IL10 et de TGFβ.[288,290] Ils sont également acteurs du remodelage tissulaire.[291] Au sein des tumeurs, les macrophages ont généralement un phénotype M2, principalement M2c, avec des propriétés pro-angiogéniques,[292] immunosuppressives et favorisant les lymphocytes Treg.[288] Dans le foie, les KCs

polarisés en un phénotype M2 semblent avoir un rôle protecteur important du parenchyme hépatique, que ce soit dans le cas d'infection,[293,294] de troubles métaboliques,[295] ou afin d'empêcher un rejet de greffe,[296] notamment en régulant la réponse T via la sécrétion d'IL10, de TGFβ.[297] Par ailleurs, ils sont impliqués dans l'installation de la fibrose hépatique, sans promouvoir l'inflammation,[298] probablement via le TGFβ.[299] A l'état basale, les KCs semblent arborer un phénotype M2 afin de conserver l'intégrité du foie et d'éviter une sur-activation due à l'exposition constante d'antigènes bactériens.[300] Cependant, ce phénomène de forte tolérance peut également être problématique, par exemple dans le cas d'infections à des hépatites virales qui peuvent évoluer vers la chronicité. Il apparaît en effet que, dans la cas d'infection au virus de l'HBV, la sécrétion d'IL10 et de TGFβ par les KCs, empêche la mise en place d'une réponse antivirale capable d'éliminer le virus.[301,302] A l'inverse, dans plusieurs états pathologiques tels que la NAFLD ou l'hépatite alcoolique, ces mêmes cellules ont également été décrites pour leur rôle dans la progression des atteintes hépatiques.[303,304]

Les DCs, cellules présentatrices professionnelles, sont aussi entièrement impliquées dans cette tolérance hépatique. Chez l'homme, deux sous-populations de DCs sont distinguées dans le foie : Les pDCs (*plasmacytoid dendritic cells*), $CD11c^{low}B220^{+}$, minoritaires mais dont la proportion dans le foie, est très supérieure aux organes lymphoïdes secondaires.[305] Les cDCs (*conventional dendritic cells*) qui sont majoritaires, et généralement divisés en mDCs (*myeloid dendritic cells*) $CD11c^{+}CD8\alpha^{-}CD11b^{+}$ ou lympoid DCs $CD11c^{+}CD8\alpha^{+}CD11b^{-}$. Cependant cette classification semble peu adaptée au foie, où un nombre important de cDCs sont $CD8\alpha^{-}CD11b^{-}$.[306] Alors que les cDCs sont généralement de puissantes APCs et participent aux différentes réponses médiées par les lymphocytes T auxillaires,[307] les pDCs sont d'importantes productrices d'interférons de type I après reconnaissance de DAMPs ou PAMPs par l'intermédiaire des TLRs (ex. ARN ou ADN viraux).[308] Cependant, les DCs infiltrés dans le foie ont en grande partie un phénotype immature en comparaison aux DCs des organes lymphoïdes secondaires, avec un plus faible nombre de molécules du CMH-II et co-stimulatrices de l'immunité.[306] Plus spécifiquement, les mDCs hépatiques sont naturellement dans un état tolérogène du fait de la sécrétion d'IL6, IL10 et TGFβ par les cellules du stroma du foie, produisant à

leur tour de l'IL10 et de l'IL4 mais pas d'IL12.[309,310]. De ce fait, ils induisent une hypo-réactivité plutôt qu'une activation des lymphocytes T,[311] car ils expriment un taux de TLR4 plus faible, ce qui les rend moins sensibles au LPS.[312] Ils favorisent aussi la différenciation des lymphocytes T naifs en Treg et Th2 plutôt que Th1.[310,311] De la même manière, les pDCs sont de mauvais inducteurs de lymphocytes T. Ils présentent à l'état basal, un phénotype immature par rapport au pDCs spléniques.[313] De plus, ils expriment fortement NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain 2*), auquel se fixent les peptides bactériens MDP (*muramyl dipeptide*). Cela a pour conséquence la sur-régulation de l'expression d'IRF4 (*interferon regulatory factor 4*), un régulateur négatif de la signalisation des TLRs, bloquant la mise en place des signaux de co-stimulation permettant d'activer les lymphocytes T.[314] De plus, leur expression de PD-L1 (*programmed death-ligand 1*) sont anormalement élevés, par rapport à celle de CD86, ce qui inhibe l'induction des lymphocytes T conventionnels et favorisent les lymphocytes Treg.[315] Finalement, les pDCs peuvent également sécréter de l'IL10, immunosuppressive, et induisent son expression par les lymphocytes T.[316] En effet, les pDCs produisent aussi de l'IDO, qui permet de primer les lymphocytes Treg, producteur d'IL10.[317]

D'autres cellules du foie peuvent également participer au phénomène de tolérance. Les hépatocytes et LSECs expriment en surface des molécules de rétrocontrôle négatif de l'immunité, tel que PD-L1, qui atténuent les réponses adaptatives T et évitent l'induction de réponses auto-immunes. Par ailleurs, les LSECs n'expriment pas l'IL12, même après activation, ce qui les empêche de participer à la polarisation des lymphocytes T auxiliaires.[11,318] Par ailleurs, l'abondance d'IL10 dans le foie a également pour cause, la sur-régulation, chez les cellules NK, de l'expression de NKG2D (*killer cell lectin like receptor K1*), récepteur inhibiteur. De ce fait, cela baisse leur réactivité.[319] Les NKT invariants (iNKT), sous-type majoritaire des NK, activable notamment au contact d'α-GalCer, un composé isolé de l'éponse marine *Agelas mauritianus*,[320] sont aussi acteurs de la tolérance hépatique. Selon leur polarisation, les NKTs sécrètent des cytokines plutôt pro- ou anti-inflammatoires. Il semble que le destin des iNKT soit fortement dépendant des stimuli, des cytokines localement présentes, mais aussi du type de cellules ayant présentées l'antigène (cela peut être des APCs telles que les DCs ou KCs, ou bien des hépatocytes, les LSECs ou même les

HSCs). Et bien que les cellules iNKT soient principalement des productrices d'IFNγ dans le foie, elles sont également à l'origine de la sécrétion d'IL4 ou d'IL17. Ces cellules « patrouillent » continuellement dans les sinusoïdes avant d'être activées. Dans le cas d'une infection par un pathogène affectant les KCs, elles sécrèteront alors une grande quantité d'IFNγ pour une réponse antimicrobienne. En revanche, si les antigènes présentés sont endogènes, la polarisation sera majoritairement en faveur des iNKT produisant de l'IL4 ; ces derniers étant bénéfiques pour la régénération hépatique. Leur polarisation, et donc leur production de cytokines, semblent avoir un rôle prépondérant dans le modelage du l'environnement immunitaire dans le foie, mais également de manière plus systémique.[101]

Cell type	Mechanisms	Effect	Outcome
Myeloid DCs	Production of PGE_2	Inhibition of T cell proliferation; apoptosis of activated T cells	Tolerance
	Production of IL-10	Generation of T_{Reg} cells and T_H2 cells through IL-10-dependent mechanisms; decreased production of TNF, IL-6 and ROS by monocytes	Tolerance
	Modulation of function by TGFβ	Induction of T_{Reg} cells with PD1-dependent regulatory function	Tolerance
	Secretion of IL-27	Induction of T cell hyporesponsiveness	Tolerance
	Co-stimulation; IL-12p70 production	T cell activation and/or proliferation	Immunity
	Increased MHC class II and co-stimulatory molecule expression	T_H1 cell polarization	Immunity
Plasmacytoid DCs	IL-10 production; low Delta 4/Jagged1 Notch ligand ratio	Skewing to T_H2 cell differentiation; $CD4^+$ T cell apoptosis	Tolerance
	Expression of B7-H1	Impaired T cell stimulatory function	Tolerance
	Low level of peptide–MHC complex and co-stimulatory molecule expression	Induction of anergy or deletion of antigen-specific T cells and T_{Reg} cell function	Tolerance
	High IFNα production	NK, NKT and $CD8^+$ T cell activation	Immunity
Kupffer cells	Production of PGE_2 and 15d-PGJ_2	Inhibition of antigen-specific T cell activation	Tolerance
	IL-10 and TGFβ production	Suppression of inflammatory cytokine production	Tolerance
		Proliferation and programming of T_{Reg} cells	Tolerance
	CD1-dependent presentation of bacterial antigens	Activation of NKT cells	Immunity
LSECs	Expression of B7-H1	B7-H1-mediated T cell tolerance after initial stimulation	Tolerance
	Expression of LSECtin	Inhibition of CTL function	Tolerance
	Expression of CD95L	$CD4^+$ T cell tolerance after transendothelial migration	Tolerance
	Expression of CD95L	Death of activated T cells	Tolerance
	Absence of IL-12 production; uncertain	Failure to induce functional T_H1 cells but generation of regulatory T cells	Tolerance
	Inhibition of DC-mediated stimulation of naive T cells	Veto of $CD8^+$ T cell activation	Tolerance
	Viral infection causing expression of undefined co-stimulatory molecules	Full CTL differentiation	Immunity
Hepatocytes	Failure to provide co-stimulation	AICD in naive T cells	Tolerance
	B7-H1 expression	Inhibition of CTL effector function	Tolerance
	Ectopic expression of autoantigen	Generation and proliferation of T_{Reg} cells	Tolerance
	NKT cell co-activation	Induction of IL-10-producing $CD8^+$ T cells	Tolerance
	Upregulated MHC class II expression	Activation of $CD4^+$ T cells	Immunity
	Post-vaccination activated $CD8^+$ T cells upregulate hepatocyte MHC class I expression	Activation of naive $CD8^+$ T cells	Immunity
Stellate cells	Expression of B7-H1 or TRAIL by activated stellate cells	Regulation of T cell responses through B7-H1 or TRAIL-mediated apoptosis	Tolerance
	Retinoic acid and TGFβ independent	Proliferation of T_{Reg} cells	Tolerance
	Antigen presentation to CD1- and MHC-restricted NKT and T cells	Activation and/or proliferation of T cells and NKT cells	Immunity

Tableau 7 : Les cellules présentatrices d'antigènes dans le foie et leurs mécanismes de tolérance. (modifié de Thomson and Knolle, Nat. Rev. Immunol., 2010)[318] 15d-PGJ2 : 15-deoxy-delta12,14-PGJ2, AICD : activation-induced cell death, CTL : cytotoxic T lymphocyte, DC : dendritic cell, IFNα : interferon-α, IL : interleukin, L : ligand, LSEC : liver sinusoidal endothelial cell, LSECtin : liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin, NKT

cell : natural killer T cell, PD1 : programmed cell death 1, PGE2 : prostaglandin E2, ROS : reactive oxygen species, TGFβ : transforming growth factor-β, TH2 cell : T helper 2 cell, TNF : tumour necrosis factor, TRAIL : TNF receptor apoptosis-inducing ligand, TReg cell : regulatory T cell.

B. Mécanismes de l'auto-immunité

Pathologies auto-immunes

L'auto-immunité est une réponse pathologique du système immunitaire adaptatif dirigée contre des antigènes du soi. Les maladies auto-immunes peuvent affecter spécifiquement un organe, comme le diabète de type-1 qui cible les cellules bêta des îlots pancréatiques de Langerhans, ou avoir un effet systémique comme le lupus érythémateux qui touche les tissus conjonctifs (peau, tendons, muscles…). Les symptômes sont généralement visibles chez les patients bien après la perte de la tolérance et l'initiation de la réaction immunitaire. [228,321] Le traitement des maladies auto-immunes consiste généralement en la prise de corticostéroïdes, puissants immunosuppresseurs, qui vont permettre de réduire la réponse immunitaire et diminuer la sévérité de la pathologie. Dans certains cas plus graves, la prise d'agents chimiothérapeutiques, qui provoquent une leucopénie, peut également être considérée. En outre, pour certaines maladies, comme le diabète de type I ou la thyroïdite de Hashimoto, il convient également de supplémenter le patient avec des hormones que le corps ne produit plus du fait de la destruction du tissu qui en assurait la sécrétion. La plasmaphérèse, qui permet d'éliminer une partie des anticorps du sang, dont les auto-anticorps, est aussi un traitement possible. Avec l'émergence des immunothérapies, le développement d'anticorps monoclonaux ciblant de manière plus spécifique certains leucocytes ou cytokines devrait devenir de plus en plus fréquent.[322,323]

On estime qu'entre 7 et 9% de la population mondiale serait atteinte par un syndrome auto-immun. Ces pathologies ont généralement une prédominance féminine ce qui pourrait indiquer un rôle des hormones sexuelles dans la modulation de cette réponse.[324] Les pathologies auto-immunes semblent émerger de susceptibilités génétiques héréditaires mais également de l'impact de l'environnement. En outre, plusieurs analyses GWAS ont permis d'établir un certain nombre de polymorphismes fortement associés avec la perte de tolérance. Notamment, plusieurs gènes relatifs au

système immunitaire, tels que les gènes du HLA, de certaines cytokines ou récepteurs, ou même de facteurs de transcription, ont pu être identifiés (Ptpn22 [*protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*], Ctla-4 [*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*], Il23r [*interleukin 23 receptor*] et I*l2ra* [*interleukin 2 receptor alpha chain*]).[325] Il est en revanche rare qu'un unique locus puisse expliquer la pathologie. Cependant, quelques exceptions existent telle qu'une mutation ponctuelle dans le gène du facteur de transcription AIRE (*autoimmune regulator*) qui cause le syndrome APECED (*polyendocrinopathie auto-immune type 1*).[326] Les porteurs de certains polymorphismes de gènes impliqués dans le processus de tolérance centrale semblent également plus susceptibles de développer une maladie auto-immune. Certains lncRNA (*long non-coding RNA*) our miRNA (*microRNA*) ont également été liés à des syndromes auto-immuns.[327,328]

Les facteurs environnementaux ont également un rôle dans le déclenchement d'un syndrome auto-immun chez les personnes possédant une susceptibilité. Par exemple, l'exposition à des substances exogènes ou des infections, persistantes ou non, peuvent déclencher une réponse contre le soi. Les mécanismes sous-jacents à l'apparition des maladies auto-immunes ne sont actuellement pas bien compris.[228] Cependant, les liens avec les infections sont de plus en plus étudiés. Tout d'abord, le phénomène de mimétisme moléculaire implique que des peptides du non-soi (étrangers) aient une homologie structurelle suffisamment importante avec des épitopes du soi. De ce fait, des épitopes provenant de pathogènes peuvent, dans le contexte d'une infection déclencher une réponse immunitaire qui pourra ensuite réagir de manière croisée avec des peptides du soi et provoquer l'attaque de tissus sains. Il a déjà été permis d'établir une relation entre infection et auto-immunité.[329,330] Par exemple, dans le cas d'infections aux streptocoques de groupe A, les patients ont un risque de développer des anticorps dirigés contre la myosine.[331] Une autre explication du rôle de l'environnement dans l'initiation d'une réponse auto-immune est la « libération » d'épitopes du soi normalement « cachés » du système immunitaire. On les appelle "épitopes cryptiques", car ils sont généralement très peu présentés à la surface des APCs, ou bien sont complétement séquestrés dans des tissus où les APCs ne peuvent les capturer. De ce fait, ils n'induisent pas de tolérance centrale des lymphocytes T et B (car non présentés dans le thymus ou la moelle

osseuse).[332,333] La dissémination de ces épitopes (ou *epitope spreading*) est souvent le résultat d'une lyse cellulaire, soit par un virus qui aurait infecté la cellule, soit par un dommage physico-chimique comme les rayons ultra-violets ou des molécules cytotoxiques, soit par une primo-réponse immunitaire liée au mimétisme moléculaire. De plus, il est suspecté que des cellules subissant un fort stress cellulaire présentent un peptidome anormal, comprenant notamment des peptides de protéines dénaturées, des conformères, des antigènes cryptiques ou même des peptides nouvellement formés.[334,335] Finalement, en cas d'infection et/ou de dommage tissulaire, la présence de PAMPs ou DAMPs et donc l'induction d'une réponse immunitaire, peut largement participer à la perte de tolérance par le mécanisme appelé activation *bystander* (spectatrice). Cela peut être dû à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui permettent un contexte favorable à la levée de tolérance, à l'*epitope spreading* ou bien à l'activation de lymphocytes T auto-réactifs déjà primés.[336]

La perte de tolérance au soi peut également provenir d'un déséquilibre entre les populations de lymphocytes T régulateurs et effecteurs, ou bien encore d'une dysfonction de ces lymphocytes T régulateurs. Un défaut dans l'induction de la tolérance centrale ou périphérique est également observé chez les patients atteints de maladies auto-immunes tel que le lupus.[228,337]

Perte de tolérance dans le foie et auto-immunité

Le foie reçoit en grande partie du sang provenant de l'appareil digestif, dont la composition est riche en PAMPs d'origine bactérienne. En condition physiologique, l'induction d'une forte tolérance dans le foie permet d'éviter l'activation d'une réponse inflammatoire. (***Figure 13***) Cependant, une inflammation localement située dans l'intestin, souvent le résultat d'une dysbiose ou bien d'un trouble immunitaire, fragilise la paroi intestinale et peut provoquer en une inflammation hépatique voire une réponse auto-immune.[173] Cela peut s'expliquer notamment par le phénomène de translocation bactérienne dans le cas du syndrome de l'intestin perméable. Si la muqueuse intestinale ne retient plus les bactéries du microbiome, ces dernières passent dans la circulation et sont acheminées jusqu'au foie où elles peuvent déclencher une réponse inflammatoire, via leurs PAMPS et les PRRs.[338] En outre, la

présence de bactéries dans le milieu intérieur peut aussi induire une réponse auto-immune à cause du mimétisme moléculaire de certaines protéines bactériennes avec des molécules du soi, comme cela semble être le cas pour la CBP.[339] Par ailleurs, chez les patients souffrant d'une dysbiose, l'activation aberrante de lymphocytes T (dans les tissus lymphoïdes associés au tube digestif) peut provoquer leur migration vers le foie. Ces derniers sont ensuite potentiellement à l'origine d'une réponse inflammatoire et auto-immune.[178] Le foie a aussi pour rôle de métaboliser de nombreux xénobiotiques ; de ce fait, il est sans cesse exposé à des molécules cytotoxiques qui peuvent provoquer une lyse cellulaire. Cela participe au phénomène d'*epitope spreading*, mais peut aussi modifier certaines protéines, les rendant immunogènes, et donc participer à la perte de tolérance en combinaison avec le relargage de DAMPs.[340]

Suite à la perte de la tolérance, il y a mise en place d'une réponse immunitaire ciblant spécifiquement un ou plusieurs antigènes.

Après la découverte de l'IL17, l'augmentation de sa sécrétion a été reliée à plusieurs pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, ou même le lupus. De ce fait, la réponse de type Th17 a été considérée comme un acteur principal de la réponse auto-immune du fait de l'action pro-inflammatoire de l'IL17. Cette dernière permet d'induire la production de cytokines pro-inflammatoire, tel que l'IL-β, le TNFα et l'IL-6,[341] et de chimiokines qui permettent notamment le recrutement de neutrophiles.[342,343] En outre, la réponse Th17 permet de générer une réponse humorale en favorisant la génération de centres germinatifs auto-réactifs et en induisant la production d'IgG2a par les lymphocytes B.[344,345] Elle est également impliquée dans la formation des lésions tissulaires, notamment en stimulant la production de MMPs (métalloprotéases matricielles) par les neutrophiles.[346] Cependant, dans plusieurs modèles murins de pathologies auto-immunes, bien que l'absence d'IL17 minore le phénotype, cette cytokine ne semble pas forcément nécessaire au développement de certains syndromes auto-immuns. Dans plusieurs modèles murins comme le lupus ou la sclérose en plaque, l'injection chez les souris d'IFNγ provoque une aggravation de la pathologie. Il apparaît en fait que beaucoup de pathologies combinent une réponse Th17 et Th1, avec une synergie

complexe.[347] En outre, la réponse Th1 permet de coordonner une réponse cellulaire cytotoxique. En effet, la réponse Th1 a également été extensivement étudiée pour son implication dans les réactions d'hypersensibilité retardée. Celle-ci implique l'action cytotoxique de lymphocytes T $CD8^+$ détruisant la cellule cible,[348] ici une cellule saine. Son implication semble claire dans le cadre du lupus, la polyarthrite rhumatoïde ou du diabète de type I.[349] La réponse Th1 favorise notamment la commutation isotopique des lymphocytes B et induit la sécrétion d'IgG2, auto-réactifs et efficaces pour médier une cytotoxicité dépendante des anticorps.[350] Cependant, plusieurs questions soulèvent également la possibilité d'un rôle protecteur de la réponse Th1 dans certaines pathologies auto-immunes. Dans un modèle de souris d'encéphalopathie auto-immune ou d'uvéite, la perte de la réponse Th1 ou la délétion de l'IFNγ permettaient d'amoindrir la gravité de la maladie,[351,352] et ce, en en supprimant la réponse Th17, ce qui affaiblit le phénotype de la pathologie. De plus l'IFNγ apparaît essentiel dans l'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T activés, mécanisme qui permet de maintenir un équilibre immunitaire et d'empêcher la prolifération aberrante de clones auto-réactifs.[353,354] Concernant la réponse Th2, son rôle peut être double. Dans le cas de l'encéphalopathie auto-immune ou de la sclérose en plaque par exemple, elle semble exacerber la maladie. Cela est dû à l'importante production d'anticorps, notamment IgG1, qui survient au cours d'une réponse Th2. De ce fait, elle pourrait aggraver les réactions d'hypersensibilité liées aux auto-anticorps ou aux complexes. A l'opposé, dans un certain nombre d'autres pathologies auto-immunes, la réponse Th2 a été reliée à l'induction de la tolérance et à la diminution de la sévérité du syndrome. Cela semble provenir de la capacité des lymphocytes Th2 à inhiber la réponse Th17 et Th1.[355]

Dans le foie, la proportion particulièrement haute de lymphocytes NK, NKT et γδ permet également de s'interroger sur leur implication dans des pathologies auto-immunes. Les derniers sont divisés en deux groupes chez les hommes, selon leur chaîne Vδ exprimée : Vδ1 ou Vδ2. Les premiers principalement intra-épithéliaux, ont des fonctions régulatrices, ou bien effectrices cytotoxiques. Les seconds, principalement circulants, sont impliqués dans la réponse contre les pathogènes. Chez les patients souffrants d'HAI, la proportion de Vδ1 dans le sang était anormalement

haute par rapport à celle des Vδ2, ce qui indiquerait un rôle pathologique pour les Vδ1. De plus, la production d'IFNγ, de granzyme B par les lymphocytes T γδ était supérieure chez les malades. A l'inverse, leur expression d'IL4 était plus importante chez les sujets sains, en accord avec une phénotype tolérogène.[356] Les lymphocytes NKT, qui sont aussi classifiés en deux groupes : les iNKT exprimant un TCR semi invariant composé des chaînes Vα24 et Jα18, et les autres NKT appelés NKT II. Les premiers sont largement impliqués dans les maladies auto-immunes, et notamment dans la CBP et l'HAI.[162,357] En revanche, les NKT II semblent avoir un rôle protecteur contre les pathologies auto-immunes, en rendant les lymphocytes iNKT anergiques, notamment via l'activation de pDCs.[358] Finalement les lymphocytes NK semblent avoir un rôle controversé dans les maladies auto-immunes, à la fois protecteur ou déclencheur.[359] Chez les patients CBP, une augmentation des lymphocytes NK, avec une activité cytotoxique supérieure, indique qu'ils sont impliqués dans la destruction des canaux biliaires.[141] Par ailleurs, ils pourraient aussi participer aux dommages lors d'HAI. Ils sont en effets les acteurs principaux de la lyse hépatique dans un modèle d'hépatite induit, proche de l'HAI.[360]

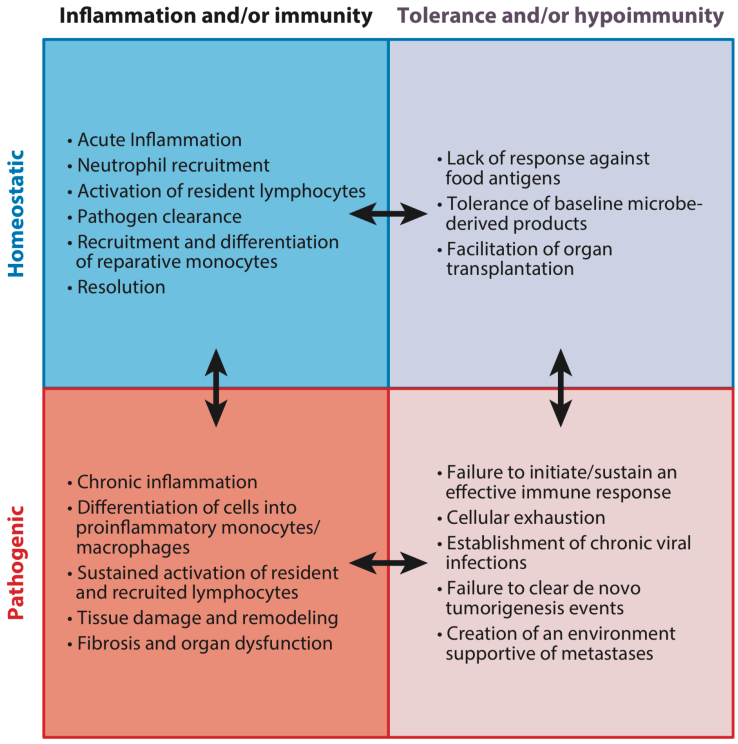


Figure 13 : La balance entre tolérance et inflammation dans le foie.[101] La réponse immunitaire dans le foie est généralement tolérogène ou hypo-immune (en haut à droite). Cet environnement empêche l'induction de réponse immunitaire aux antigènes alimentaires fréquent ou à de faibles taux de molécules microbiennes qui pénètrent quotidiennement dans le corps par la circulation porte. Dans les cas où un pathogène parvient jusqu'au foie, une réponse immunitaire rapide et aiguë s'ensuit, conduisant à une inflammation auto-limitante, à l'élimination du

pathogène et à une réparation tissulaire si nécessaire. Dans les cas où l'inflammation n'est pas limitée et devient chronique, un recrutement cellulaire important et des lésions tissulaires peuvent en résulter. En présence d'une inflammation soutenue, ces dommages sont souvent réparés de manière inappropriée, entraînant un remodelage des tissus, une fibrose et un dysfonctionnement des organes. De même, une immunité insuffisante peut également être délétère. L'incapacité à déclencher une réponse immunitaire appropriée en présence d'une infection virale ou d'un cancer peut entraîner le développement d'une maladie chronique, d'un dysfonctionnement tissulaire et d'une défaillance hépatique.

C. Mécanismes de l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme immunologique physiologique déclenché à la suite d'une sérieuse perturbation de l'homéostasie cellulaire ou tissulaire, telle la présence de pathogènes ou des dommages tissulaires. Elle est principalement médiée par le système immunitaire innée mais celui-ci coopère avec le système adaptatif pour résoudre le traumatisme. La réponse adaptative est à la fois humorale et cellulaire.

Bien qu'une réaction inflammatoire contrôlée soit plutôt bénéfique pour le maintien de la physiologie tissulaire, lorsque celle-ci se perpétue de manière anormale, elle devient pathologique et on parle alors d'inflammation chronique. Cette dernière peut être la conséquence d'une infection chronique (ex. HBV, HCV) ou bien la manifestation d'une maladie auto-immune.[361] (***Figure 14***) En revanche, dans le cas de maladies inflammatoires chroniques, la cause de ce phénomène n'est généralement pas expliquée. L'inflammation ne semble être ni déclenchée par une infection, ni une quelconque lésion. Il apparaît plutôt que cela soit dû à un défaut physiologique du tissu même ou bien du système immunitaire. Par ailleurs, l'obésité, une alimentation riche en graisse saturée, le tabagisme et des problèmes hormonaux par exemples, sont considérés comme facteurs de risque au développement d'inflammation chronique.[361,362]

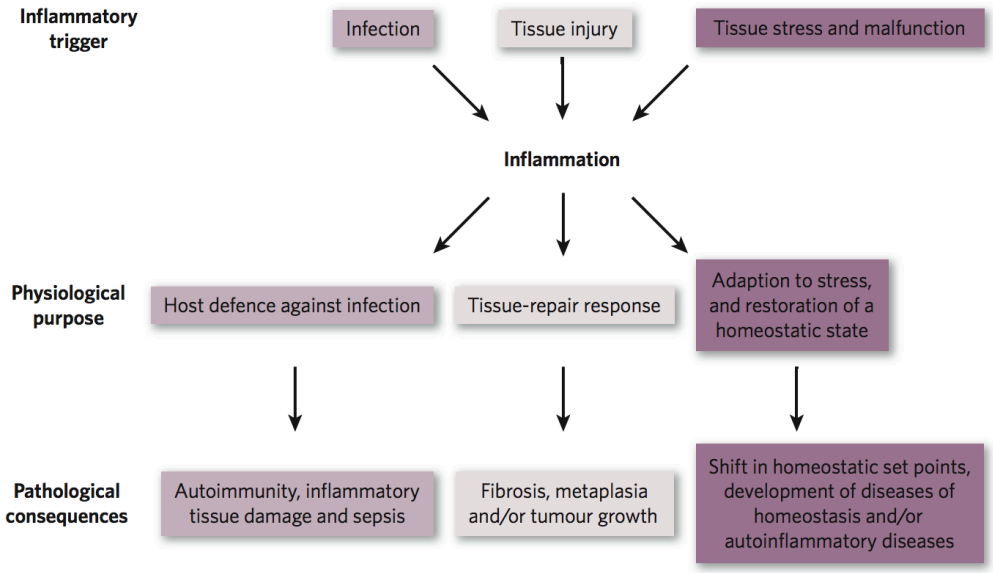


Figure 14 : Les causes et causalités de l'inflammation.[363] Selon le déclencheur, la réponse inflammatoire a un objectif physiologique et des conséquences pathologiques différents. Des trois stimulis initiateurs possibles, seule l'inflammation induite par une infection est associée à l'induction d'une réponse immunitaire. Une infection induit une réponse immunitaire contre le pathogène avec possibilité de développer une auto-immunité, des dommages tissulaires dus à l'inflammation ou une septicémie. Une lésion tissulaire entraîne une réparation de ce même tissu qui peut mener à une fibrose ou à la formation d'une tumeur dans le cas extrême. Un stresse tissulaire provoque une réponse adaptative au stress afin de permettre un retour à l'homéostasie. Si cette réponse au stress est inefficace, cela peut mener à un état pathologique du tissu et l'induction d'une maladie auto-immune et inflammatoire.

Dans le cas d'une inflammation causée par une infection ou bien par une molécule endogène/exogène délétère ou des dommages cellulaires/tissulaires, l'environnement contient alors, respectivement, des PAMPs ou bien des DAMPs. Ces derniers peuvent ensuite se fixer sur leurs PRRs, tels que les TLRs, NLRs (*NOD-like receptor*) et FPRs (*formyl peptide receptors*), exprimés par les macrophages, monocytes, neutrophiles, DCs, et KCs dans le foie. Cela active alors une première réponse impliquant la sécrétion de plusieurs facteurs :[363]

- différentes **molécules vasodilatatrices qui augmentent la perméabilité vasculaire** pour faciliter l'extravasion et l'infiltration des leucocytes au site de l'infection ou de la lésion. On peut notamment citer l'histamine et la sérotonine, produites et stockées dans des granules par les mastocytes, basophiles et plaquettes. En outre, les facteurs de coagulation XII et VII, respectivement activés via contact (en réponse à un dommage de surface) et via des facteurs tissulaires (en réponse à un traumatisme), permettent de générer de la thrombine et plasmine impliquées dans la fibrinolyse, causant une vasodilatation et

augmentant la perméabilité des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, le facteur de coagulation XII permet d'activer la synthèse de bradykinine, qui possède également un effet vasodilatateur, ainsi qu'un rôle dans la médiation de la douleur. [363]

- le système du **complément** peut s'enclencher donnant lieu à la formation de la protéine C5a qui participe au recrutement et à l'activation des granulocytes et monocytes. Par ailleurs, cela active également la dégranulation de ces cellules, permettant le relargage de molécules vasodilatatrices.[364]
- des **médiateurs lipidiques** de l'inflammation, tous dérivés des phospholipides. L'environnement inflammatoire, tels que les cytokines, chimiokines et autres signaux associés à des dommages, donne lieu à la sécrétion d'éicosanoides. Plus particulièrement, des prostaglandines de la série 2 (PGE_2, PGD_2, PGI_2), des leucotriènes, des thromboaxanes A_2 (TXA_2) et des lipoxines (LX) et résolvines sont générés. Les prostaglandines, produites par quasi tous les types cellulaires, ont principalement une fonction vasodilatatrice. De plus, PGI_2 empêche également l'agrégation plaquettaire, PGD_2 favorise une réponse Th2 en recrutant des lymphocytes T, éosinophiles et basophiles, et enfin PGE_2 est impliquée dans la signalisation de la douleur et l'induction de la fièvre. Les leucotriènes sont synthétisés par les leucocytes et permettent la régulation de la réponse immunitaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire. En outre, les leucotriènes B_4 ont également un fort pouvoir activant et attractant des neutrophiles. TXA_2, synthétisé par les plaquettes activées, a une fonction prothrombique qui permet de compenser la fonction de PGI_2. Finalement, les lipoxines et résolvines sont plutôt synthétisées lors de la fin de l'inflammation aiguë. Elles permettent de résoudre l'inflammation et la réparation tissulaire par leur action inhibitrice sur les leucocytes pro-inflammatoires et contribuent à amoindrir la signalisation de la douleur. Une autre classe de médiateurs lipidiques produits par les plaquettes, cellules endothéliales, ou certains leucocytes, ont également un rôle pro-inflammatoire. Les facteurs d'activation plaquettaire induisent le recrutement de leucocytes, leur activation et dégranulation, mais augmente également la perméabilité vasculaire.[365]

- des **cytokines pro-inflammatoires** sont également sécrétées dans les 1ères phases de l'inflammation, principalement IL1β, IL6 et TNFα. L'IL1β, produite essentiellement par les macrophages/monocytes, fibroblastes ou cellules endothéliales, favorisent la production de prostaglandines ainsi que la dégranulation des granulocytes. Le TNFα, produit par les macrophages/monocytes activés ou certains lymphocytes T ou NK, induit également la production de PGE_2, mais aussi celle de collagénase. Il permet également l'activation de macrophages/monocytes. Tout comme l'IL6, le TNFα stimule tout particulièrement la production par le foie de protéines de la phase aiguë telle que la CRP, favorisant l'opsonisation des pathogènes, les facteurs du complément et de coagulation, ou des protéines impliquées dans le recrutement de leucocytes. En parallèle, l'IL6 produite par certaines APCs, lymphocytes T, ou les fibroblastes, participe à la maturation des lymphocytes B en plasmocytes, et à l'activation les lymphocytes T. L'IL11 est aussi souvent présente lors d'une inflammation. Son rôle est très analogue à celui de l'IL6, et peut la remplacer. L'IL18, produite par les macrophages et activatrice des lymphocytes T et NK, est un composant important de l'inflammasome avec l'IL1β. Ces cytokines sont produites sous forme de pro-cytokines après un premier signal impliquant la voie NF-κB (*nuclear factor-kappa B*) puis clivées en cytokines fonctionnelles par la caspase 1 activée par un second signal. D'autres cytokines sont fréquemment secrétées durant l'inflammation, généralement un peu plus tardivement, et associées avec l'activation de réponses Th17 (ex. IL17, IL23) ou Th1 (ex. IFNγ, IL12).[366]
- des **chimiokines** principalement impliquées dans le recrutement des monocytes pro-inflammatoires et des neutrophiles sont également produites lors de l'inflammation telles que le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), CCL2 et l'IL8. Ces dernières peuvent être sécrétées par une grande quantité de cellules, leucocytes ou autres, généralement pré-activés par des macrophages. Ils ont pour rôle l'attraction de granulocytes sur le site traumatisé. L'IL8 a un très fort pouvoir chimioattractant et activateur pour les neutrophiles et le GM-CSF peut aussi provoquer le recrutement de monocytes et DCs. D'autres chimiokines telles que

MIP1 et *2*, MCP1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) ou NAP2 (*neutrophil activating protein 2*) participent aussi activement à l'inflammation aiguë en attirant et activant macrophages, monocytes et neutrophiles au site de l'inflammation.[367]

- des **protéases** qui permettent un remodelage tissulaire. Ce phénomène favorise l'infiltration des leucocytes vers le site inflammé, mais permet également de dégrader la MEC lors d'une lésion hépatique pour favoriser son remplacement lors du processus de régénération tissulaire. Cela peut aussi être primordial dans l'élimination de la fibrose en formation. En outre, la sécrétion de MMPs joue également un rôle dans l'activation de certaines cytokines pro-inflammatoire, produite sous une forme inactive[363,368]

Le début de la réaction inflammatoire commence donc par le recrutement de leucocytes, très largement des neutrophiles, mais également des macrophages. (***Figure 15***) Une fois au site de l'infection ou de la lésion, ils sont alors activés par les PAMPs, DAMPs ou les cytokines en présence. De ce fait, les neutrophiles peuvent alors éliminer le pathogène extracellulaire, en les phagocytant, mais également grâce aux NETs, et surtout en sécrétant le contenu de leurs granules, à savoir des molécules antibactériennes, des protéines générant des ROS et des protéases.[369] Ces molécules ne ciblent pas spécifiquement les pathogènes et vont causer des dommages locaux dans le tissu. En revanche, si le pathogène est intracellulaire ou si les dommages sont directement tissulaires, les macrophages pro-inflammatoire résidents et recrutés sont activés et permettent d'éliminer les cellules infectées ou les débris cellulaires grâce à leur fort pouvoir phagocytaire. Cependant, après l'élimination du pathogène ou du xénobiotique, les macrophages adoptent un phénotype favorisant réparation tissulaire, avec l'aide des fibroblastes.[370]

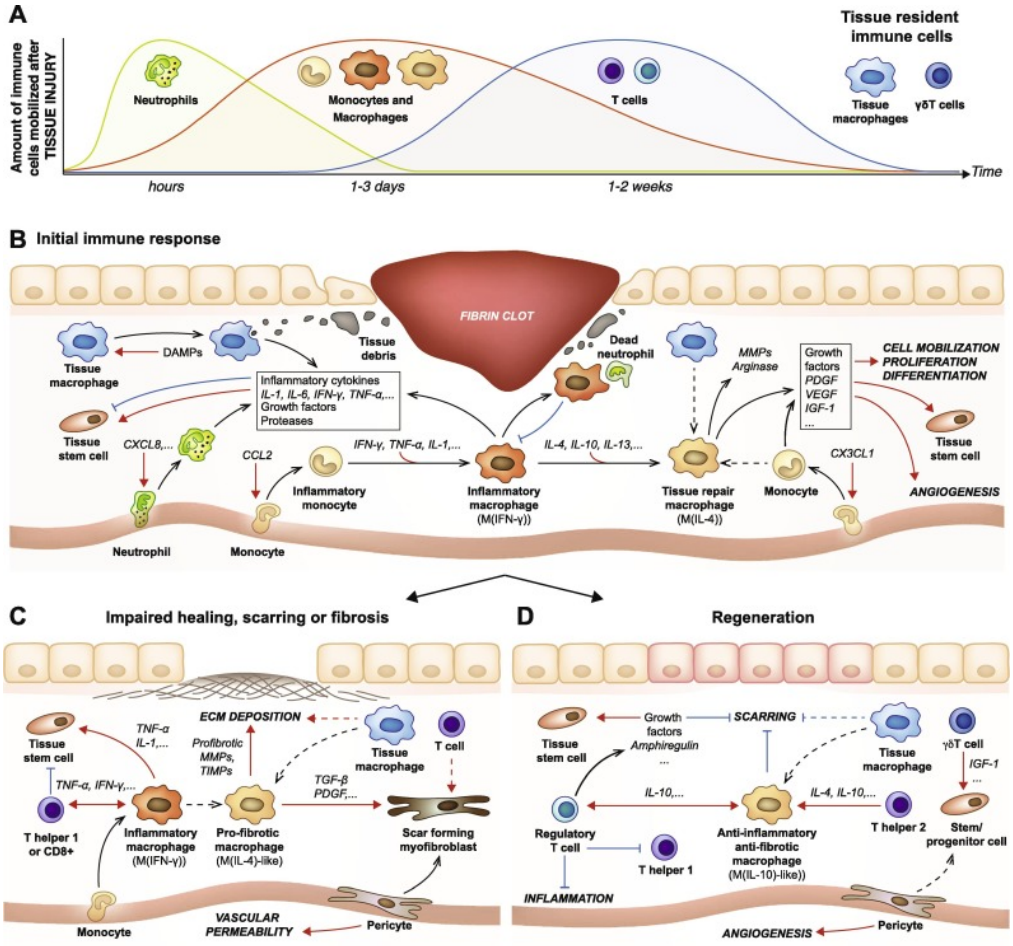


Figure 15 : La réponse immunitaire et les mécanismes de régénération tissulaire induits après une lésion.[371] A) Cinétique de la mobilisation des cellules immunitaires après une lésion tissulaire. Les cellules résidentes tissulaires, y compris les macrophages résidents tissulaires et les cellules γδT détectent les dommages tissulaires et déclenchent la mobilisation d'autres cellules immunitaires. Les neutrophiles sont suivis par les monocytes/macrophages et les lymphocytes T. B) Aperçu de la phase inflammatoire initiale après une lésion tissulaire. Les événements chronologiques sont représentés de gauche à droite. Les dommages tissulaires sont détectés par les macrophages résidant dans les tissus via les DAMP. Les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires circulantes recrutées sur le site de la blessure, favorisant l'inflammation et le recrutement des monocytes/macrophages. L'inflammation est initialement maintenue par les macrophages pro-inflammatoires M(IFN-γ), qui sécrètent de l' IFN-γ, avant d'être finalement résolue à l'aide des macrophages M(IL-4), qui produisent de l'IL-4. C) Aperçu des mécanismes immunitaires qui peuvent nuire à la cicatrisation du tissu ou conduire à une fibrose. Les macrophages M(IFN-γ) stimulent les lymphocytes T effecteurs dans une boucle à rétroaction positive. Les cellules effectrices T peuvent également inhiber la capacité de régénération des cellules souches progénitrices résidentes dans les tissus via des cytokines inflammatoires. Les macrophages de type M(IL-4), avec une activité pro-fibrotique encouragent le dépôt de protéines de la matrice extra-cellulaire et la fibrose subséquente (cicatrisation), empêchant la régénération complète du tissu d'origine. Les péricytes augmentent la mobilisation des cellules immunitaires et se différencient en myofibroblastes formant du tissu cicatriciel via des facteurs de croissance tels que le TGFβ1. D) Aperçu des mécanismes immunitaires pro-régénératifs. Une quantité critique de macrophages affichant un phénotype anti-inflammatoire/anti-fibrotique (par exemple M(IL-10)) contribuent à la régénération par une collaboration avec des Treg, qui à leur tour aident à maintenir le phénotype anti-inflammatoire/anti-fibrotique via sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10. Les Treg peuvent également améliorer la capacité de régénération des cellules souches progénitrices endogènes par la sécrétion de facteurs de croissance. Les cellules T helper 2 induisent/maintiennent des macrophages anti-fibrotiques et anti-inflammatoires. Les flèches noires indiquent une voie de différenciation ou une sécrétion de modulateurs immunitaires/morphogènes. Les flèches noires en pointillés indiquent un chemin de différenciation hypothétique. Les flèches rouges indiquent l'induction. Les flèches bleues indiquent l'inhibition. CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2, CXCL8 : C-X-C motif chemokine ligand 8, CX3CL1 : C-X3-C motif chemokine ligand 1, DAMPS : Damage-associated molecular pattern, IFN- γ : Interferon γ, IGF-1 : Insulin growth factor 1, IL- : Interleukin, MMPs : Matrix metallopeptidases, PDGF : Platelet-derived growth factor, TIMPs : Tissue inhibitors of metalloproteinases, TNF-α : Tumor necrosis factor α, VEGF : Vascular endothelial growth factor.

Résolution de l'inflammation ou chronicité

La résolution de l'inflammation, et le retour à un état de tolérance, se produit après élimination complète du signal initiateur de la réponse inflammatoire (agent infectieux, molécule endogène ou exogène, lésion tissulaire…). En parallèle, plusieurs mécanismes permettent de contenir cette inflammation et d'accélérer le retour à la normale. L'activation des TLRs peut induire plusieurs boucles de rétrocontrôle négatif telles que la production de TLRs solubles (qui piègent les ligands), le recrutement de protéines régulatrices (intermédiaires de signalisation), la réduction de l'expression de ces mêmes TLRs ou bien leur destruction.[372] La production de médiateurs lipidiques, d'abord pro-inflammatoires, va également évoluer. En effet, bien que la production de PGE_2 favorise l'inflammation, celle-ci initie en parallèle un changement dans la production de ces médiateurs lipidiques par les neutrophiles. En résulte la sécrétion de LXs, anti-inflammatoires, qui participe activement à la résolution de l'inflammation.[373] Par ailleurs, les neutrophiles, après assimilation d'un pathogène ou de débris cellulaires, voient leur pouvoir pro-inflammatoire réduit, agissant comme mécanisme de régulation.[374] En effet, après phagocytose menant à leur mort cellulaire, ces derniers produisent des pré-médiateurs lipidiques capables d'induire la production de résolvines et LXs par les macrophages voisins (chargés d'éliminer les neutrophiles en apoptose).[375] Ces deux types de médiateurs lipidiques ont un effet anti-inflammatoire et immunosuppresseur, qui participent à l'arrêt de la propagation de la réponse inflammatoire. Il faut également noter que l'inflammation, médiée par les macrophages en réponse au LPS, est négativement régulée lors de la phagocytose par le biais de la protéine SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*).[376] Finalement, le rétrocontrôle négatif de l'inflammation est très largement soutenu via la sécrétion par les macrophages de : l'IL10 sous l'effet de PGE_2,[377] et du TGFβ après phagocytose.[378] Cela provoque alors le recrutement de lymphocytes T régulateur et la polarisation en Th2 et M2, des lymphocytes et macrophages respectivement. Les macrophages et monocytes, anciennement pro-inflammatoires vont finalement permettre de régénérer le tissu endommagé. Ces derniers, après avoir éliminé les débris cellulaires ou la MEC pathologiques, vont permettre aux fibroblastes de former une nouvelle matrice afin de restaurer l'architecture du tissu, mais vont également

favoriser la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires au fonctionnement du tissu.[370]

L'évolution de l'inflammation vers la chronicité peut être due à :

- une stimulation pro-inflammatoire persistante dans le cas de l'exposition prolongée à une xénobiotique (ex : l'aclool) par exemple.
- une réponse immunitaire très excessive et/ou prolongée comme dans le cas d'une inflammation causée par l'obésité.
- une réponse immunitaire sous-efficiente qui mène à la chronicité d'une infection.[379]

Un tissu endommagé peut lui-même participer au développement d'une inflammation chronique. En effet, les modalités de la mort cellulaire ont un impact très important sur la détection ou non de DAMPs ou PAMPs. L'apoptose par exemple, est souvent considérée comme tolérogène. En revanche, dans certaines situations telle une infection virale, une mort cellulaire capable d'activer une réponse immunitaire permet de lutter contre la dissémination du pathogène. C'est notamment le cas lors de la nécrose qui, contrairement à l'apoptose, abouti à la dissémination d'antigènes, de DAMPs mais également d'une grande partie du contenu cellulaire dans l'environnement, et de ce fait induit une forte inflammation. Celle-ci peut servir d'adjuvent à l'amorçage d'une réponse adaptative spécifique d'un éventuel pathogène intracellulaire ou antigène tumoral.[380] En outre, l'état des cellules est surveillé en permanence par les macrophages résidents, mais également par les cellules NK, capables de détecter des cellules à la physiologie anormale et de les éliminer si nécessaire. L'état physiologique ou de stress de la cellule transparaît en fonction des protéines exposées à sa surface (ex. MHC-I). Jusqu'à un certain stade de stress, la cellule est capable de mettre en place des mécanismes adaptatifs afin de pallier les dysfonctions. Lorsque que le stress est trop important, les cellules meurent, soit par apoptose, soit par nécrose qui va induire une inflammation locale. Cependant la mort par apoptose n'est toujours tolérogénique. En effet, on distingue également une forme immunogène de l'apoptose appelée mort cellulaire immunogène (ICD pour *immunogenic cell death*). Elle est particulièrement décrite dans le cadre des

traitements cytotoxiques du cancer, s'apparente à l'apoptose tolérogène de par la signalisation intracellulaire impliquée (ex. activation de la caspase 3), et le fait qu'elle empêche le déversement du contenu cellulaire dans l'environnement. Cependant, les cellules mourantes vont, au cours de l'ICD, relarguer/sécréter ou exposer à leur surface différents signaux de danger tel que l'ATP (adénosine-triphosphate), HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*), la calréticuline, et les interférons de type I. Ces signaux vont permettre le recrutement et l'activation locale d'APCs, principalement des DCs, qui possèdent les récepteurs "senseurs" adéquats. Ces derniers vont phagocyter les cellules mourantes, présenter leurs épitopes antigéniques aux lymphocytes T via les CMH de surface, et activer une réponse immunitaire adaptative anticancéreuse.[381,382]

Inflammation hépatique

Dans le foie, les causes d'inflammation peuvent être d'origine infectieuse, par exemple avec les virus des hépatites, mais aussi métabolique, avec des pathologies comme la NASH.[383]

Dans le foie, la tolérance est la règle et les KCs sont des acteurs majoritaires de cet état. Cependant, lors de dommages hépatiques et induction d'une inflammation locale, la tolérance médiée par les KCs peut être outrepassée.[384] De ce fait, dans un environnement pro-inflammatoire, les KCs perdent leurs fonctions immunosuppressives. Cela pourrait s'expliquer par leur repolarisation vers un phénotype M1. Ils peuvent alors sécréter du TNFα, de l'IL12, IL1β et IL18, capables d'induire une forte inflammation et une réponse de type 1.[385] Les KCs produisent aussi d'importante quantité d'IL6 qui est un des médiateurs majeurs de l'inflammation dans le foie, grâce à son action sur les leucocytes mais également par son effet mitotique sur les hépatocytes.[386] L'IL6 et le TNFα ont d'ailleurs été incriminés dans la carcinogenèse du CHC, notamment dans le cadre de l'obésité.[387] Cependant, il semble que la fibrose hépatique et l'inflammation soit fortement dépendante du recrutement de monocytes pro-inflammatoire CCR (*C-C motif chemokine receptor*) 2^{+},[388] et ce par l'action de la chimiokine CCL2.[389] Ces monocytes fraîchement recrutés pourraient dériver de monocytes non classiques $CD16^{+}CD14^{+}$, dont le phénotype pro-inflammatoire a été mis en évidence.[390] Par la suite, les macrophages résidents et

monocytes recrutés vont agir en synergie afin d'éliminer le pathogène puis pour restaurer l'homéostasie tissulaire.[391] Les lymphocytes NKT ont également la capacité d'arborer un phénotype pro-inflammatoire, producteur d'IFNγ, mais également de sécréter de l'IL4, qui favorise une réponse Th2 et la réparation tissulaire, et ce lors de dommages hépatiques sans infection. Cela accélère alors la résolution de l'inflammation.[392] A noter dans le foie, la présence de MAITs (*mucosal-associated invariant T lymphocytes*), qui sont des lymphocytes T avec un TCR invariant, infiltrés dans l'espace péribiliaire. Leur rôle dans l'inflammation hépatique n'est pas vraiment connu, mais ils ont une forte activité antibactérienne et antifongique, et possèdent un phénotype mixe Th1/Th17.[393] Par ailleurs, ils sont retrouvés en plus grand nombre chez les patients CSP, et particulièrement activés chez les personnes souffrant de MICI, ce qui laisse penser qu'ils peuvent avoir un rôle pro-inflammatoire.[394] En outre, il faut noter que le microbiote intestinal permet de moduler l'inflammation hépatique. En effet, une dysbiose est souvent observée chez les patients atteints d'inflammation hépatique, et des antigènes bactériens ou PAMPs atteignent facilement le foie grâce à sa vascularisation. Lorsqu'il y a altération qualitative du microbiote, c'est-à-dire une augmentation de la proportion de bactéries pathogènes, on peut observer : une diminution des acides biliaires dans l'intestin, une détérioration de la perméabilité intestinale et une perte de l'homéostasie immunitaire. De ce fait, les bactéries délétères sur-représentées peuvent transloquer jusqu'au foie via la circulation et provoquer une réaction inflammatoire.[395]

D. Inflammation et risque de cancer

L'inflammation chronique au sein d'un tissu constitue l'un des principaux facteurs de risque associés au développement tumoral. Par exemple, les personnes souffrant de la maladie de Crohn ou d'une rectocolite hémorragique, ont un risque plus élevé de développer un cancer colorectal.[396] Par ailleurs, la prise quotidienne d'anti-inflammatoires non stéroïdiens est associée avec une diminution du risque de cancer colorectal.[397] Cette inflammation peut évidemment avoir des causes diverses telles que des maladies du système immunitaire, une infection chronique ou le tabagisme.[398] Elle peut aussi être exacerbée par le régime alimentaire, la

consommation d'alcool et l'obésité par exemple. Il est estimé qu'environ 10% des cancers qui se développent sont dus à une mutation d'origine germinale, pour les 90% restant, c'est bien l'acquisition d'une ou plusieurs mutations somatiques qui est à l'origine de la tumorigenèse. Un environnement inflammatoire a été relié à une augmentation du taux de mutation dans le tissu. De plus l'inflammation a également un effet proliératif positive, permettant de pérenniser ces mutations lors de l'établissement de la tumeur. L'inflammation favorise donc l'oncogenèse selon 3 principaux axes :[399]

- **augmentation de l'instabilité génomique** et de l'accumulation d'aberrations génétiques. Tout d'abord, un certain nombre de leucocytes inflammatoires, macrophages et neutrophiles principalement, produisent d'importantes quantités de ROS et d'espèces réactives du nitrogène (RNS pour *reactive nitrogen species*) qui provoquent des dommages au niveau de l'ADN et de ce fait augmentent la possible accumulation de mutations.[400] Si ces anomalies génétiques ont lieu dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, l'instabilité génomique sera d'autant plus prononcée. Le TNFα est également capable d'induire la production de ROS chez les cellules épithéliales ce qui pourrait être une autre cause de mutations favorisant la transformation des cellules précancéreuses.i[401] Deuxièmement, plusieurs cytokines pro-inflammatoires tels que les TNFα et l'IL1β, IL4, et l'IL13 et peuvent induire l'expression de la protéine AID (*activation-induced cytidine deaminase*).[402,403] Cette protéine AID a pour but d'augmenter l'instabilité génomique chez les lymphocytes B lors du phénomène d'hypermutation somatique nécessaire à la maturation du BCR. Dans les cellules tumorales, elle semble la cause de l'accumulation de mutations dans les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN comme TP53 (*tumour protein 53*) et MYC.[404] Troisièmement, plusieurs molécules inflammatoires, comme le TNFα, l'IL1β, PGE_2 et les ROS, induisent l'expression de HIF (*hypoxia-inducible factor*) 1α qui sous-régule l'expression des gènes de la voie MMR (*mismatch DNA repair*) impliquée dans la réparation de l'ADN.[405,406] En outre, les ROS ont la capacité d'impacter directement l'activité des enzymes de la voie MMR.[407] Ces mécanismes jouent un rôle important dans l'augmentation de l'instabilité génomique et donc participent à l'accumulation d'aberrations

génétiques. Finalement, il a également été démontré que l'inflammation avait un effet sur l'état de méthylation de gènes avec une activité anti-tumorale ou impliquée dans les voies de réparation de l'ADN.[408]

- **soutien à la prolifération cellulaire** : un certain nombre de cytokines est secrété lors d'épisodes inflammatoires : IL1, TNFα, IL6, IL13, IL22 et IL23.[366] Ces dernières vont donc activer plusieurs voies de signalisation intracellulaires telles que les voies NF-kB, STAT3 ou AP-1 (*activator protein 1*).[409] Leurs effets seront effectifs sur les leucocytes, boucle de régulation positive de l'inflammation, mais aussi sur les cellules constitutives du tissu inflammé. Cela va alors stimuler les gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. (***Figure 16***) Notamment, la signalisation, effective sur les cellules épithéliales, et trans-signalisation, possible sur la quasi-totalité des cellules, de l'IL6 a démontré son importance dans l'activation de STAT3 et donc son rôle dans l'oncogenèse.[410,411] Par ailleurs, le TNFα, l'IL1β, l'IL22 et l'IL17a via l'activation de STAT3 ou NF-κB, sont aussi des facteurs promouvant la prolifération cellulaire et l'invasion tumorale,[387,412,413] mais également la mobilisation des cellules souches.[414,415] En parallèle, l'inflammation au sein d'un tissu est parfois synonyme de réparation tissulaire. Durant celle-ci, des hormones de croissance peuvent être sécrétées, soit pour activer des fibroblastes, soit pour permettre la prolifération afin de remplacer les cellules lysées. Ces hormones de croissance sont également des signaux pro-prolifératifs.[416–418] Dans un environnement inflammatoire, les cellules pré-malignes vont donc voir leur taux de division cellulaire augmenter. Cette hausse est un facteur important d'acquisition de nouvelles mutations chez les cellules en transformation. Dans le cas de l'inflammation, elle est renforcée par l'instabilité génomique déjà induite, comme exposé ci-dessus. Par ailleurs, l'activation de NF-κB a pour conséquence d'induire une dé-différentiation de certaines cellules leur permettant d'acquérir un phénotype semblable à une cellule souche (*stem cell-like*).[419] En outre, l'IL1β, le TGFβ, le TNFα et l'IL6 par exemple, favorisent aussi l'EMT des cellules. Ces différents phénomènes impliquent une forte perturbation du cycle cellulaire, ce qui participe à la transformation de cellules saines et à leur pouvoir invasif et métastatique.[420]

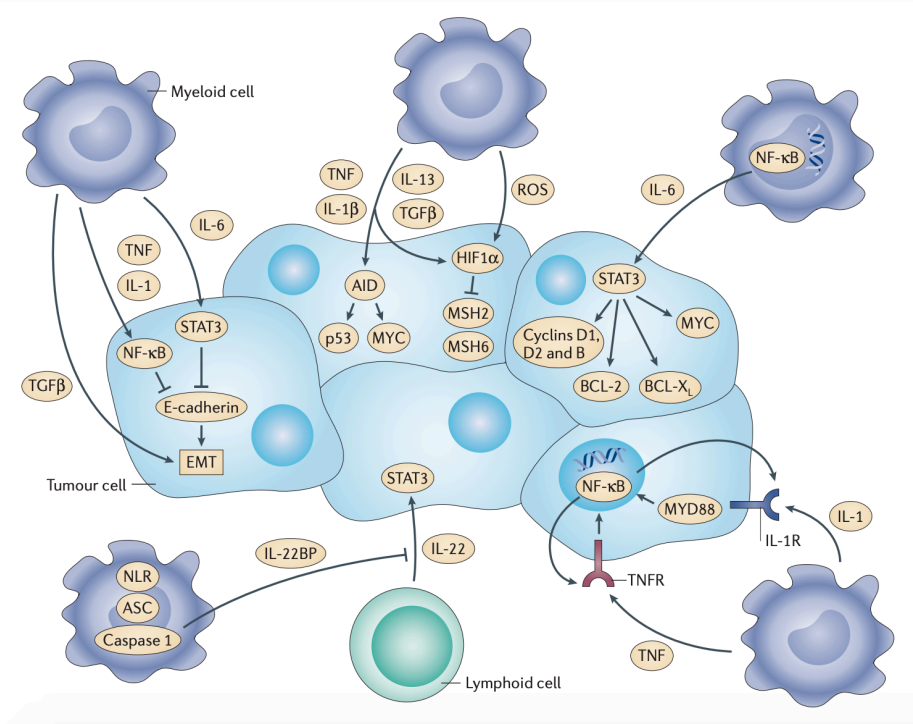


Figure 16 : Les cytokines pro-inflammatoires et leurs effets sur la prolifération cellulaire.[399] Les cellules myéloïdes (violet) infiltrant les tumeurs contribuent à la cancérogenèse de diverses manières. Les cytokines pro-inflammatoires induisent STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) et le facteur nucléaire κB (NF-κB) dans les cellules cancéreuses, ce qui conduit à la suppression de l'apoptose et à la promotion de la progression du cycle cellulaire. La sécrétion d'IL-22BP (interleukin-22 binding protein) dépendante de l'inflammasome inhibe l'induction de STAT3 provoquée par l'IL-22, elle-même sécrétée par les lymphocytes (vert). La déstabilisation génomique peut être favorisée par l'expression ectopique de AID (activation-induced cytidine deaminase) médiée par les cytokines et par la suppression dépendante de l'hypoxie des mécanismes de réparation de l'ADN. De plus, la signalisation par STAT3 et NF-κB induit également une transition épithéliale – mésenchymateuse (EMT) en régulant à la baisse l'expression des marqueurs de différenciation épithéliale. ASC : apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, HIF1α : hypoxia-inducible factor 1α, IL-1R : IL-1 receptor, MYD88 : myeloid differentiation primary response 88, NLR : NOD-like receptor, ROS : reactive oxygen species, TGFβ : transforming growth factor-β, TNF : tumour necrosis factor, TNFR : TNF receptor.

– **remodelage tissulaire et promotion de l'angiogenèse** : l'installation d'une tumeur s'accompagne d'un changement dans l'architecture du tissu qui facilite la division des cellules. La mise en place d'un nouveau système vasculaire doit aussi permettre l'acheminement des nutriments, dont la demande est en hausse lors d'un cancer. L'inflammation promeut à la fois l'angiogenèse et le remodelage tissulaire, ce qui rend l'environnement favorable à la tumorigenèse. Lors de l'inflammation, l'activation de NF-kB et STAT3, principalement dans les cellules myéloïdes, induit l'expression d'IL8, CXCL (*C-X-C motif chemokine ligand*) 1 et 8, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et HIF1a. Ces molécules déclenchent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.[421,422] En outre, HIF1a stimule le recrutement des cellules endothéliales et autres leucocytes.[423] Finalement, la production de MMPs par les macrophages et neutrophiles, stimulée par diverses

cytokines pro-inflammatoires, induit un remodelage de la matrice extracellulaire favorable à l'implantation des cellules transformées et l'envahissement du tissu. Par ailleurs, lors de l'inflammation la perméabilité vasculaire est augmentée, ce qui facilite le passage de cellules tumorales dans la circulation générale et donc le processus métastatique.[401]

IV. Cancer et contexte immunitaire

A. Mécanisme tumoral et immunosurveillance

Définition d'un cancer

Le cancer est la première cause de mortalité en France et la deuxième dans le monde derrière les maladies cardiovasculaires.[424] On estime à environ 400 000 le nombre de nouveaux cas de cancers par an en France, et à plus de 18 millions dans le monde. Le nombre de décès en France approche les 160 000 par an, et il est évalué à plus de 9 millions dans le monde. Chez les hommes, les cancers de la prostate, du poumon et du colon sont les plus fréquents. Quant aux femmes elles, sont principalement touchées par les cancers du sein, du colon et des poumons.[425]

On distingue les tumeurs malignes des tumeurs bénignes. Alors que ces dernières ne s'étendent pas dans le tissu sain adjacent et restent localisées ; les premières peuvent envahir l'organe où elles sont localisées, menant à des pertes de fonctions, mais également métastaser vers un tissu distant, via la circulation générale ou le système lymphatique. Cependant, une tumeur bénigne peut devenir maligne. Il existe une multitude de type de tumeurs. Elles peuvent être classifiées selon l'organe où elles sont localisées ou bien selon le type cellulaire dont elles dérivent. Les carcinomes sont des tumeurs se développant à partir d'un épithélium, les sarcomes quant à eux, proviennent des tissus conjonctifs, ils sont plutôt rares. Les leucémies sont des cancers des précurseurs des leucocytes en maturation de la moelle osseuse. Les lymphomes se développent à partir des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques ou la rate.[426]

Tumorigenèse

La tumorigenèse est le résultat d'une transformation de cellules saines en cellules tumorales. L'initiation d'une tumeur commence avec l'accumulation d'altérations génétiques. Ces dernières apparaissent aléatoirement dans le génome au cours de divisions cellulaires, et cela, de manière spontanée ou induite par la présence d'agents xénobiotiques. Ces mutations sont sélectionnées car elles apportent un avantage prolifératif aux cellules qui les ont acquis. Préférentiellement, elles vont toucher les gènes de ménage (*housekeeping genes*). Ces gènes encodent des protéines participant aux fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie des cellules, comme le métabolisme énergétique, la transcription, la traduction la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, la signalisation des messages de croissance ou de mort cellulaire… De ce fait, alors que certaines altérations génétiques peuvent conduire à la mort de la cellule et ne pas être sélectionnées, d'autres vont lui permettre de se diviser de manière incontrôlée et d'accumuler d'autant plus de mutations. Certaines études estiment que l'acquisition d'au moins 4 à 5 mutations somatiques sont nécessaires à la tumorigenèse dont l'activation de proto-oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Ces mutations et cette instabilité génomique s'accompagne de changements épigénétiques, d'une perturbation du cycle cellulaire, d'une dé-différentiation cellulaire, allant vers un état mésenchymateux dans les stades plus avancés, et l'acquisition de nouvelles fonctions. Là où les cellules devenues dominantes, c'est-à-dire les plus proliferatives et les moins sensibles aux signaux de mort, sont alors clonalement sélectionnées. Elles vont alors recruter des cellules de soutien, notamment des fibroblastes ou CAFs (pour *cancer-associated fibroblasts*), des leucocytes pro-tumoraux et des cellules endothéliales, afin de constituer un stroma favorable à l'établissement d'une tumeur maligne. Ce faisant, elles vont pouvoir continuer d'envahir le tissu sain, puis à terme, acquérir un phénotype suffisamment mésenchymateux pour pouvoir envahir les tissus adjacents voire métastaser dans des tissus distants.[426–428] (***Figure 17***)

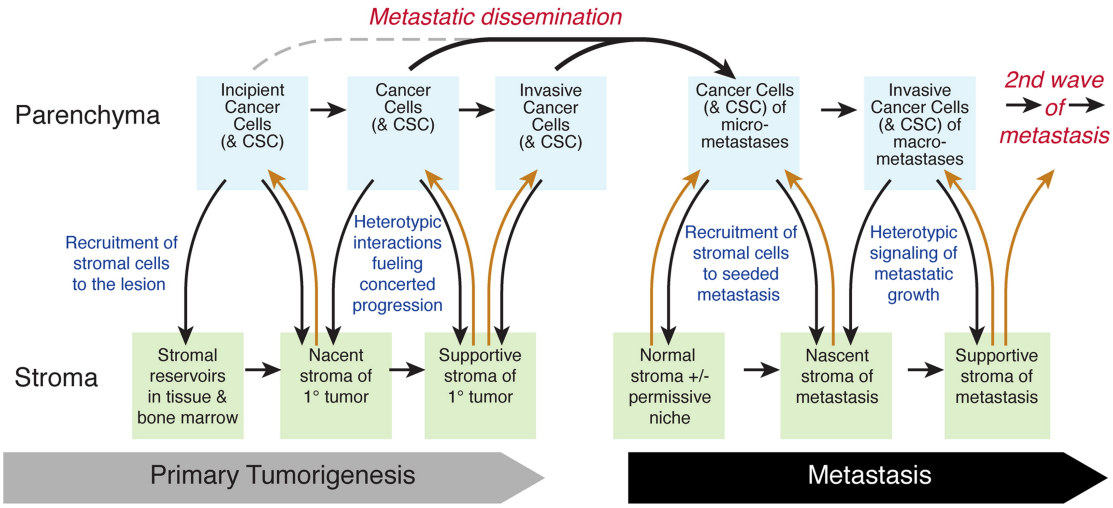


Figure 17 : Le processus de tumorigenèse. (modifier depuis Hanahan et Weinberg, Cell 2011)[428] La signalisation intracellulaire n'est pas statique et change au cours de la progression tumorale, du fait des interactions bidirectionnelles entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales. Ces dernières favorisent le phénotype agressif du cancer, impliqué dans la croissance tumorale, l'invasion et dissémination métastatique. A noter, la prédisposition à métastaser peut apparaître précocement, celle-ci pouvant être acquise durant la transformation de la cellule d'origine ou bien durant les premières lésions cancéreuses. Certains organes (parfois appelés `` sols fertiles '' ou `` niches métastatiques '') peuvent être particulièrement permissifs à la dissémination métastasique et à l'implantation de certaines cellules cancéreuses. Cela est la conséquence de propriétés locales qui sont soit intrinsèques au tissu normal ou induites à distance par actions systémiques de certaines tumeurs. Les cellules souches cancéreuses peuvent être différentiellement impliquées dans les étapes de tumorigenèse primaire et de métastase.

Principales caractéristiques du cancer

Le cancer est une maladie multiple pour laquelle il a été difficile de synthétiser les caractéristiques qui lui sont propres, et en même temps communes à tous les sous-types de cancers. En 2000, Hanahan et Weinberg publient « The Hallmarks of Cancer » qui réunit ce qui permet de différencier le cancer en tant que pathologie et les fonctions acquises par les cellules tumorales. Cet article revu en 2011 porte à 10 le nombre de capacités distinctives des cancers (***Figure 18***) :

- **autosuffisance vis-à-vis des signaux prolifératifs** : les cellules tumorales peuvent acquérir la fonction de sécréter elles-mêmes des facteurs de croissance et d'exprimer les récepteurs correspondants, parfois de manière aberrante ou mutée, ou bien de stimuler les cellules du stroma afin qu'elles soient la source de facteurs prolifératifs.
- **insensibilité aux signaux anti-prolifératifs** : plusieurs programmes cellulaires permettent de réguler négativement la prolifération cellulaire et dont l'inactivation par mutation favorise la transformation des cellules.

- **évitement du système immunitaire** : au sein du stroma, les cellules cancéreuses mettent en place différents mécanismes afin d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale. L'environnement micro-tumoral est hautement immunosuppressif.
- **immortalité réplicative** : les cellules malignes, afin d'éviter la sénescence ou l'apoptose, expriment des télomérases, qui empêchent le rétrécissement des télomères. L'importance de la temporalité de l'activation des télomérases lors de la tumorigenèse n'est en revanche pas encore bien comprise.
- **promotion de l'inflammation** : les leucocytes pro-tumoraux recrutés dans le stroma possèdent un phénotype inflammatoire, ce qui promeut le développement de la tumeur et conduit à un cercle vicieux.
- **aptitude à l'invasion et aux métastases** : les capacités des cellules cancéreuses à envahir les tissus adjacents ou distants reposent notamment sur des altérations dans les gènes associés à l'adhésion cellule-cellule, cellule-MEC et impliqués dans la migration cellulaire. Le processus d'EMT permet également d'acquérir un phénotype mésenchymateux doté de capacités d'invasion, de migration, de sécrétion de MMPs, nécessaires à la formation de métastases.
- **induction de l'angiogenèse** : cette capacité des cellules tumorales à induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est précoce dans l'établissement de la tumeur. Elle est le résultat de la sécrétion principalement de VEGF, mais aussi d'autres facteurs pro-angiogéniques, par les cellules tumorales elles-mêmes dans les premières étapes de la carcinogenèse, puis plus tard majoritairement par le stroma tumoral via divers facteurs.
- **instabilité génomique et mutations** : l'acquisition des différentes caractéristiques nécessaires à la progression tumorale dépend principalement de l'accumulation des mutations qui activent ou favorisent les gènes pro-tumoraux et inhibent ou inactivent les gènes pro-tumoraux. Cela repose principalement sur l'instabilité génomique qui résulte elle-même de mutations dans les voies de détection des lésions et de réparation de l'ADN.
- **résistance à la mort cellulaire** : les cellules cancéreuses présentent fréquemment une délétion du gène de TP53, un senseur intrinsèque de l'homéostasie de l'ADN,

ce qui empêche l'induction de l'apoptose malgré une importante instabilité génomique. En outre, une sur-régulation de l'expression de régulateurs anti-apoptotiques ou de facteurs prolifératifs, une plus faible synthèse de régulateurs pro-apoptotiques ainsi que des courts-circuits dans les voies extrinsèques de l'apoptose sont également très fréquentes.

- **dérégulation du métabolisme énergétique** : l'effet Warburg indique que le métabolisme énergétique des cellules tumorales est reprogrammé. A l'inverse des cellules saines, les cellules cancéreuses favorisent la glycolyse, sous-exploitant ainsi la chaîne respiratoire. Malgré la faible efficacité énergétique de la glycolyse, cela permet d'augmenter le stock d'intermédiaires métaboliques. Ces derniers alimentent les voies de formation des nucléosides et acides aminés nécessaires à la formation des macromolécules et organelles requis pour l'assemblage des progénies cellulaires.[428,429]

Figure 18 : Les caractéristiques distinctives du cancer. (modifier depuis Hanahan et Weinberg, Cell 2011)[428] Les cellules malignes partagent un ensemble de caractéristiques communes distinctives intrinsèques et extrinsèques.

L'immunosurveillance des cancers

Depuis le début du 20ème siècle, le rôle du système immunitaire a été décrit comme ayant un rôle protecteur contre l'initiation de néoplasies. Cela semble d'autant plus évident quand on observe une augmentation significative du nombre de cancers chez

les patients atteints du SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise) ou prenant des médicaments immunosuppresseurs.[430] Dès les années 50, Burnet et Thomas ont émis l'hypothèse que les cellules transformées pourraient être éliminées par un mécanisme immunitaire, empêchant l'apparition de signes cliniques[431]. Au début des années 2000, l'importance de l'IFNγ contre le développement de tumeurs est particulièrement mis en exergue.[432] En découle la description du phénomène d'immuno-édition des cancers qui façonne l'immunogénicté des tumeurs. Ce processus se déroule en 3 étapes : la phase d'élimination, la phase d'équilibre et le phase d'échappement.[433] Tout d'abord, le système immunitaire, plus spécifiquement le système immunitaire adaptatif et les lymphocytes NK, peuvent détecter les cellules défectueuses/transformées ou exprimant des antigènes anormaux afin les éliminer. C'est la phase d'élimination ou l'immunosurveillance. Il arrive que le système immunitaire ne parvienne pas à éliminer les cellules cancéreuses et n'en contrôle plus les divisions incontrôlées ; c'est l'échappement tumoral. Cela donne lieu à la formation d'une tumeur maligne qui met en place des mécanismes afin d'éviter la lyse par le système immunitaire. Entre ces deux phases d'élimination et d'échappement a lieu la phase d'équilibre durant laquelle des cellules tumorales sont lentement sélectionnées pour leurs propriétés de prolifération et de faible immunogénicité, et évitent peu à peu les pressions du système immunitaire. Cette phase est la plus longue et peut durer plusieurs années avec la formation progressive d'une tumeur, au début bégnine, puis finalement maline lors de l'acquisition de mutations suffisantes pour échapper définitivement à l'action anti-tumorale des leucocytes. Ce processus plus ou moins rapide s'appelle l'immuno-édition. Il repose sur deux aspects : le système immunitaire est capable d'une part de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales, et d'autre part, il peut façonner l'immunogénicité des tumeurs qui émergeront.[432] Ce dernier phénomène repose en fait sur l'élimination des cellules cancéreuses suffisamment immunogènes, pendant que les cellules tumorales moins immunogènes passent inaperçues et évitent la destruction par les leucocytes (***Figure 19***) :

- **la phase d'élimination** : celle-ci repose principalement sur une réponse anti-tumorale médiée en grande partie par le système immunitaire adaptatif.[434] La production d'IFNγ ainsi que l'action cytolytique des lymphocytes T et NK semble à l'origine de l'initiation de cette immunosurveillance.[435,436] Avant initiation d'une

réponse anti-tumorale spécifique, il convient au système immunitaire de reconnaître les cellules cancéreuses. Cela peut se faire de manière spécifique grâce à la reconnaissance d'antigènes de différentiation (restreints au tissu d'origine de la tumeur), de néo-antigènes mutés, d'antigènes amplifiés et surexprimés, d'antigènes cryptiques, d'antigènes viraux, des antigènes carcinoembryogéniques et d'antigènes normalement restreints aux cellules germinales testiculaires.[437–439] Selon la classe du CMH qui présente l'antigène, une réponse T $CD4^+$ ou $CD8^+$ sera initiée. Les cellules tumorales peuvent également être ciblées de manière indépendante d'un antigène présenté sur les molécules de CMH. Les lymphocytes NK, et dans une moindre mesure les lymphocytes NKT et certains T $CD8^+$, expriment des récepteurs capables de promouvoir ou d'inhiber leur activation et leur action cytotoxique. Alors que les récepteurs inhibiteurs reconnaissent des molécules de surface naturellement exprimées par le tissu sain, les récepteurs activateurs reconnaissent des molécules normalement pas ou peu exprimées en condition physiologique mais sur-régulés lors d'un stress cellulaire (infection virale ou tumorigenèse).[440] Dans le cadre de l'immunosurveillance, la molécule NKG2D semble avoir un rôle clé. Elle se fixe aux protéines MICA/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) qui sont exprimées par les cellules tumorales mais pas les cellules saines. Cette interaction permet d'enclencher la réponse cytolytique des lymphocytes NK. En outre, la sécrétion d'IFN de type I par les cellules tumorales au début de la tumorigenèse permet l'induction d'une réponse immunitaire spécifique par l'activation des DCs.[441] Concernant la sécrétion d'IFNγ, celle-ci semble provenir précocement des lymphocytes T γδ (peut-être car leur activation est rapide et ne nécessite pas de présentation par le CMH), son action est multiple.[442] Elle permet d'activer les lymphocytes T $CD4^+$ Th1 et les T $CD8^+$ cytotoxiques, d'engager l'activité cytocide des macrophages, mais également de sur-réguler l'expression des molécules de CMH sur les cellules tumorales (les rendant plus immunogènes) ou sur les APCs (augmentant la possibilité de faire de la présentation) et enfin d'accroitre les processus de présentation antigénique. Vient ensuite l'activité cytolytique des cellules activées : le relargage de perforine, par les lymphocytes T, NKT ou NK, ou l'induction de l'apoptose via l'interaction de TRAIL, exprimés par

les lymphocytes NK activés, avec TRAILR2 (*TRAIL receptor 2*). Ces deux mécanismes, la perforine et l'apoptose dépendante de TRAIL, ont été démontrés comme primordiaux dans l'immunosurveillance du cancer.[443,444]

- **la phase d'équilibre** : bien que ce soit celle qui dure le plus longtemps, elle n'a jamais été réellement observée chez l'homme, probablement par l'absence de signes cliniques ou de détection d'une néoplasie. Certaines cellules tumorales, après avoir échappées à l'immunosurveillance de l'hôte, vont alors pouvoir proliférer tout en intégrant de nouvelles mutations. C'est une phase de dormance durant laquelle s'installe un équilibre entre la prolifération de cellules transformées et l'élimination par les leucocytes d'une partie de celles-ci : les plus immunogènes. Contrairement à la phase d'élimination qui impliquait les composantes adaptatives et innées de l'immunité, la phase d'équilibre tient uniquement à l'action des lymphocytes T et éventuellement B. De ce fait, le système immunitaire continue d'agir en prévenant le développement d'une tumeur maligne tout en sculptant également son immunogénicité.[433]
- **la phase d'échappement** : lorsque la tumeur réussi à échapper au contrôle du système immunitaire, celui-ci n'arrête pas de lutter, son action continue mais voit cependant son efficience drastiquement réduite. Il semble en effet que le système immunitaire, après élimination des clones les plus immunogènes, ne soit plus capable d'éliminer les cellules restantes très faiblement immunogènes, et de ce fait, les laissant se diviser.[445] Il faut noter que de nombreuses études associent un pronostic plus favorable aux patients possédant un infiltrat intra-tumoral enrichi en lymphocytes T. Cependant, les cellules cancéreuses usent de nombreux mécanismes permettant d'inhiber la réponse immunitaire, soit en se cachant de ce dernier (insensibilité à l'IFNγ et donc : sous-régulation de l'expression du CMH, sous-régulation des récepteurs de TRAIL ou FasL ou des autres récepteurs de l'activation des lymphocytes NK, expression de ligands de *checkpoint* de l'immunité qui rendent les T anergiques…) soit en rendant l'environnement micro-tumoral immunossuppresseur (recrutement de lymphocytes Treg, MDSCs MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*), DCs non fonctionnelles, sécrétion de TGFβ et PGE_2, promotion d'une inflammation pro-

tumorale…). Ces mécanismes seront détaillés plus tard dans le cadre plus spécifique du CC.[433,439]

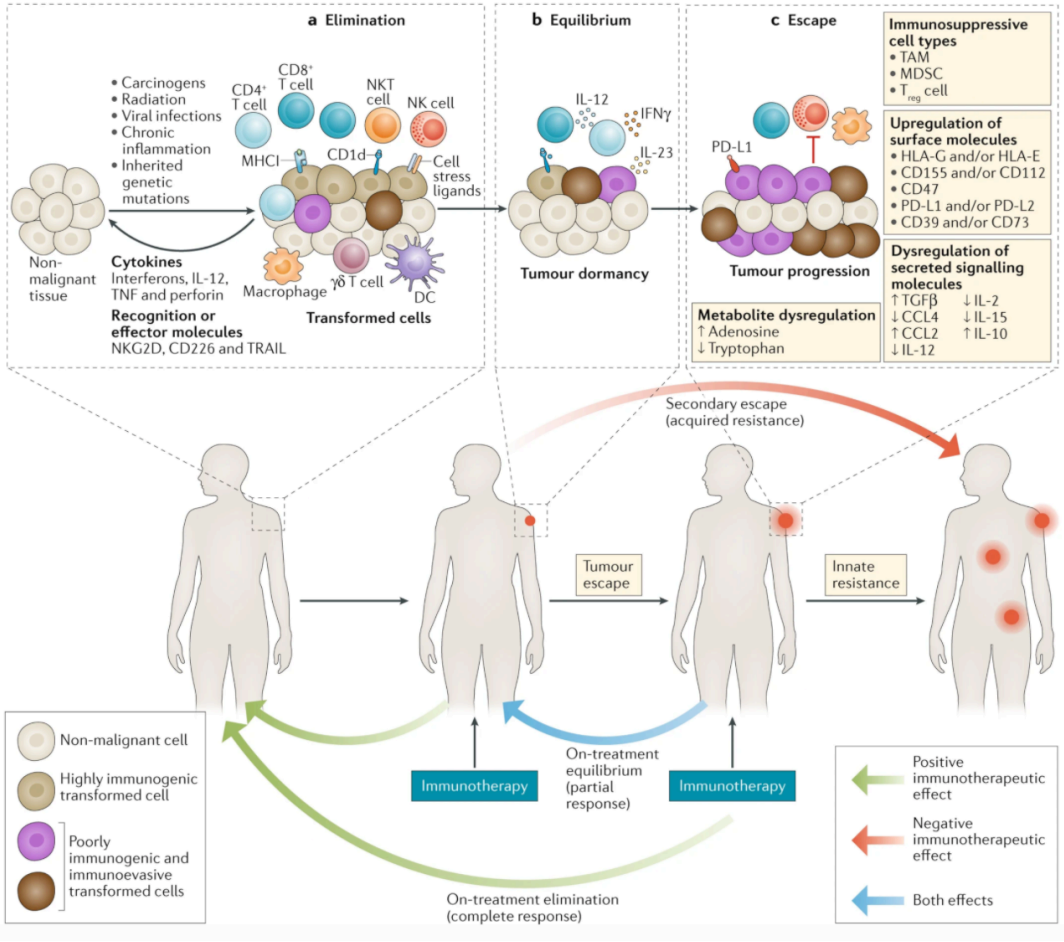


Figure 19 : Le mécanisme de l'immuno-édition tumorale.[446] a) Pendant la phase d'élimination, le système immunitaire inné et adaptatif coopèrent pour reconnaître les cellules transformées qui ont échappé à la suppression intrinsèque des tumeurs et pour les éliminer avant que celles-ci ne deviennent cliniquement détectables. En cas de destruction des cellules tumorales, ces éliminations constituent le seul mécanisme du processus d'immuno-édition. B) Les tumeurs capables de survivre à la phase d'élimination peuvent évoluer vers la phase d'équilibre, dans laquelle la croissance nette est limitée par le système immunitaire. L'immunogénicité cellulaire est également éditée par le système immunitaire adaptatif. C) Les tumeurs éditées peuvent alors entrer dans la phase d'échappement, au cours de laquelle leur croissance n'est pas limitée. Cela en grande partie en raison de l'activation de voies immunosuppressives et/ou immuno-évasives. Les tumeurs échappées sont celles qui sont cliniquement détectables. Si l'immunothérapie ne favorise pas les réponses immunitaires anti-tumorales ou si la suppression immunitaire induite par la tumeur n'est pas surmontée, aucune réponse ne sera observée et le patient sera considéré comme ayant une résistance innée. En revanche, une immunothérapie efficace peut ramener les tumeurs à la phase d'élimination, ce qui se traduit par une réponse complète. Alternativement, si l'immunothérapie utilisée ne parvient pas à surmonter complètement la suppression immunitaire induite par la tumeur, la tumeur pourrait être forcée à un équilibre pendant le traitement, qui serait caractérisé par une réponse partielle. La prolifération de clones, de cellules tumorales sélectionnées accord et capables de supprimer l'immunité anti-tumorale, peut entraîner une rechute, qui serait caractérisée cliniquement comme une résistance acquise aux traitements. CCL : C-C motif chemokine ligand, DC : dendritic cell, HLA : human leukocyte antigen, IFN-γ : interferon γ, IL- : interleukin, MDSC : myeloid-derived suppressor cell, MHCI : major histocompatibility complex class I, NKG2D : NK cell receptor D, NK cell : natural killer cell, NKT cell : natural killer T cell, PD-L1/2 : programmed cell death 1 ligand 1/2, TAM : tumour-associated macrophage, TGF-β : tumor growth factor β, TRAIL : tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand, Treg cell : regulatory T cell.

B. Réponse immuntaire anti-tumorale

Caractéristiques immunitaires de l'environnement micro-tumoral

Même après l'échappement du cancer au système immunitaire, une réponse anti-tumorale reste quiescente même si inefficace, comme en témoigne les lymphocytes que l'on peut retrouver à la marge des tumeurs ou à l'intérieur du tissu tumoral. Cependant, cet infiltrat semble très divers entre différents types de cancer, mais également entre les patients. Bien que certains leucocytes, généralement du système immunitaire inné, participent à la progression tumorale, les lymphocytes T infiltrés dans la tumeur sont souvent facteurs de bon pronostic chez les patients. De ce fait, l'infiltrat tumoral a été classifié selon le nombre de lymphocytes T infiltrés et leur localisation. (***Figure 20***) Les tumeurs dites "chaudes" sont fortement infiltrées, au sein même du stroma, alors qu'à l'opposé, les tumeurs "froides" sont presque désertes en lymphocytes (voire ne comptent quasiment aucun leucocyte). A ces deux types s'ajoute les tumeurs dites "exclues" dans lesquelles un nombre non négligeable de lymphocytes est détecté mais seulement à la marge invasive de la tumeur et non pas à l'intérieur même du tissu tumoral. Les lymphocytes ne semblent pas compétents pour pénétrer le stroma tumoral. Finalement certaines tumeurs présentent un micro-environnement tumoral faiblement infiltré malgré l'absence de barrières physiques qui pourrait freiner le recrutement. Ce phénotype est appelé immunosuppresseur car c'est cet effet qui freine l'infiltration des lymphocytes dans le stroma tumoral. Plus récemment, dans des tumeurs chaudes, un type d'infiltrat particulier, qui se caractérise par la présence de lymphocytes B et Tfh et de TLS (*tertiary lymphoid structure*) a été décrit. Ces dernières ont montré une valeur pronostique positive dans le cancer du côlon et certains cancers du sein, et ceci grâce à l'augmentation du recrutement de CTLs et Th1. D'autres caractéristiques sont aussi fréquemment considérées pour décrire l'environnement immunitaire micro-tumoral, telles que l'expression du CMH de classe I ou de PD-L1 par les cellules tumorales, et la quantité de TGFβ ou encore la charge mutationnelle (TMB pour *tumor mutational burden*) du cancer. Cette dernière, qui représente le nombre total de mutations retrouvées dans le génome des cellules cancéreuses, a été significativement corrélée à une meilleure réponse aux immunothérapies.[447] En effet, les mutations acquises par les cellules

tumorales peuvent, en affectant la partie codante d'un gène, et en admettant que le nouveau peptide généré puisse être présenté sur les CMH, déclencher une réponse immunitaire contre un antigène ne bénéficiant pas d'une tolérance. Dans cette lignée, un plus grand nombre d'altérations génétiques favorise la présentation d'un plus grand nombre de peptides immunogènes, et augmente donc la possibilité d'une réponse spécifique anti-tumorale. Ces différents paramètres permettent d'estimer le potentiel de réponse d'un patient à une immunothérapie.[448–450] Une classification des tumeurs en 4 sous-groupes a été établie selon le taux d'infiltration des lymphocytes T et la TMB :

- **le type 1 : TMB élevée et haute infiltration de lymphocytes T.** C'est le cas des tumeurs chaudes. Une réponse immunitaire basale mais inefficace existe déjà dans l'environnement micro-tumoral. Ce type de tumeur apparaît le plus à même de répondre aux immunothérapies, et particulièrement aux anticorps inhibibant les *checkpoints* inhibiteurs de l'immunité.
- **le type 2 : TMB faible et infiltration très limitée de lymphocytes T.** Ce type de microenvironnement correspond à des tumeurs froides (ou éventuellement exclues). Les cancers classifiés en type 2 sont les plus challengeant d'un point de vu thérapeutique et sont généralement de « mauvais pronostic ». Cette situation correspond à une totale ignorance du système immunitaire envers la tumeur, probablement dû à un défaut dans la présentation d'antigènes, causée par exemple par l'exclusion d'APCs fonctionnels (principalement des DCs).
- **le type 3 : TMB élevée et faible infiltration de lymphocytes T.** Les tumeurs exclues possèdent généralement un stroma de type 3. Ces cancers ne sont généralement pas sensibles aux immunothérapies classiques et le ciblage d'autres caractéristiques tumorales peut améliorer l'infiltration lymphocytaire T. Par exemple, des traitements s'attaquant à la réponse à l'hypoxie et à la néo-angiogenèse permettent d'affecter des régions tumorales où la vascularisation anormale empêche l'infiltration des leucocytes. En outre, cibler la migration des lymphocytes T à l'aide de chimiokines peut aussi être une option.
- **le type 4 : TMB faible et infiltration de lymphocytes T.** Ce type d'environnement tumoral correspond à un phénotype immunosuppressif. Le stroma comprend une

forte inflammation, qui participe à l'agressivité de la néoplasie, avec une importante densité de leucocytes pro-tumoraux (Macrophages M2, MDSCs, lymphocytes Treg…). Ces cancers pourraient bénéficier d'immunothérapies. Cependant, des inhibiteurs de molécules immunosuppressives, telles que TGFβ ou IDO, ou une action ciblant les leucocytes pro-tumoraux semblent être les plus pragmatiques.[446,448,449]

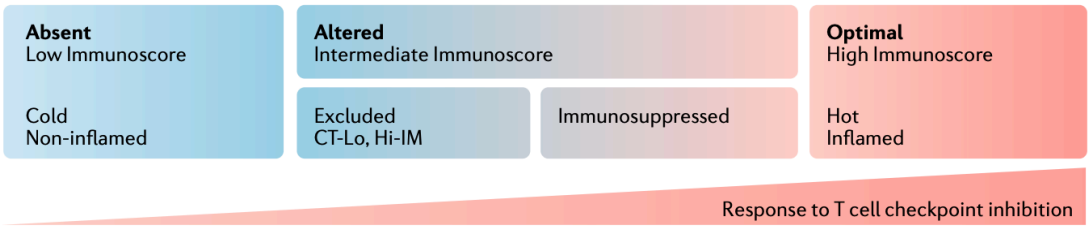


Figure 20 : Les différents types d'infiltrats immunitaires, selon le nombre de lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral. (modifié de Galon et Bruni, Nat. Rev. Drug Discov., 2019)[448] Représentation schématique des quatre sous-types immunitaires de tumeurs, classés selon un immunoscore (qualité et quantité de l'infiltrat) croissant de gauche à droite, ainsi que la correspondance avec leur réponse aux traitements par inhibiteurs des checkpoints de l'immunité. Il convient de noter que dans les tumeurs altérées exclues, les infiltrats de cellules T $CD3^+$ et $CD8^+$ sont faibles au centre de la tumeur et élevés à la marge invasive, ce qui représente globalement un Immunoscore intermédiaire. Les tumeurs altérées immunosuppressives présentent à la place un schéma plus uniforme d'infiltration des cellules T $CD3^+$ et $CD8^+$ (faible). CT : centre of tumour, Hi : high, IM : invasive margin, Lo : low.

Consensus sur la réponse immunitaire anti-tumorale

Une réponse anti-tumorale peut-être réactivée au cours d'un cancer. C'est notamment le cas lors d'immunothérapies mais également de certaines chimiothérapies qui induisent une mort cellulaire immunogène, résultant en la réactivation d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. L'efficacité de celle-ci repose donc principalement sur le *priming* de clones de lymphocytes T spécifiques de la tumeur et l'induction d'une mémoire qui permet une réponse de longue durée. En particulier, les lymphocytes T résidents mémoires (Trm pour *tissue-resident memory T cells*) semblent associés à une réponse plus rapide et efficace sur le long terme que les lymphocytes T centraux mémoires (Tcm). De plus, leur détection dans la tumeur, grâce au marqueur CD45RO, est corrélée avec une augmentation de la survie. En parallèle, le système immunitaire inné joue principalement un rôle de soutien dans le *priming* de cette réponse anti-tumorale. Celle-ci a été mesurée dans plusieurs résections et échantillons de patients, après différents traitements, et associée avec la signature moléculaire d'une réponse Th1 et CTL, c'est-à-dire la

sécrétion d'IFNγ et l'activation de sa voie de signalisation intracellulaire. Cela provoque alors l'expression de diverses molécules : 1) les molécules de CMH de classe I et II sur les APCs et cellules tumorales qui permettent la présentation des antigènes tumoraux et le *priming* des lymphocytes T , 2) la sécrétion de CCL2 et CCL7 qui permet de recruter les monocytes et macrophages M1, via CCR2, 3) la sécrétion de CCL3 et CCL4 qui attire les DCs au site de la tumeur, via CCR5, 4) la production de CXCL9 et CXCL10 qui se fixent sur CXCR (*C-X-C motif chemokine receptor*) *3* pour recruter les lymphocytes Th1. De plus, les marqueurs de lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$) et NK (CD56) sont détectés, ainsi que l'expression de granzymes, perforine, granulysine et caspases qui témoignent d'une réponse cytotoxique. Cette réponse immunitaire anti-tumorale se déroule en plusieurs étapes successives (***Figure 21***) :[451,452]

1. **le relargage des antigènes** suite à la lyse des cellules tumorales.
2. **le chargement des APCs avec les antigènes** associés à la tumeur : cette étape ne peut se réaliser efficacement que si la mort des cellules tumorales est immunogène (ICD ou nécrose) via la sécrétion ou l'exposition de DAMPs (ex. ATP, HMGB1, calreticuline) et la production d'IFNs de type I qui participent au recrutement et à la maturation des DCs. Ces dernières peuvent alors prélever les antigènes et les charger sur les CMH de classe I et II. En outre, les IFNs de type I stimulent la sécrétion d'IFNγ et de cytokines permettant le recrutement de lymphocytes T, NK et de monocytes.[380,381]
3. **la présentation des antigènes aux lymphocytes T** : les DCs migrent ensuite dans les ganglions lymphatiques, ou dans des structures lymphoïdes tertiaires intra-tumorales, pour présenter les antigènes aux lymphocytes T. Au sein même de la tumeur, malgré la présence de DCs, il semble que cette étape de priming ne soit pas efficiente, probablement dû à l'environnement immunosuppresseur qui perturbe-l'activité des DCs, en particulier leur capacité à sécréter l'IL12 (signal de différentiation en lymphocytes Th1) et les IFN de type I, ou à surexprimer des signaux de co-stimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T (ex. CD80/86 et CD40 pour l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ ou CD70, 4-1BBL (*4-1BB ligand*), GITRL (*GITR ligand*) et OX40L (*OX40 ligand*) pour l'activation des lymphocytes T $CD8^+$). Les mDCs sont principalement impliquées dans la présentation antigénique initiatrice de la réponse anti-tumorale. On distingue

deux sous-groupes de mDCs : les CD103$^+$ DC1 et les CD11b$^+$ DC2. Les premières sont spécialisées dans la présentation antigénique croisée et l'induction d'une réponse T cytotoxique, alors que les secondes présentent majoritairement les antigènes sur le CMH de classe II aux lymphocytes T CD4$^+$. De plus, la production d'IL12, de CXCL9 et CXCL10 favorisent la polarisation des lymphocytes T CD4$^+$ vers un phénotype Th1 et participe à l'activation des CTLs.[451–453]

4. **recrutement des lymphocytes T activés** dans l'environnement micro-tumoral : la sécrétion de CXCL9 et CXL10 permet l'attraction des CTLs et lymphocytes T CD4$^+$ Th1 activés et primés vers le site tumoral.[451,454]
5. **pénétration des lymphocytes T dans l'environnement micro-tumoral** : lors de leur arrivée, les lymphocytes T expriment des molécules d'adhésion qui leur permettent de pénétrer dans le stroma tumoral. Cependant, elles doivent outrepasser divers mécanismes immunosuppresseurs comme l'exposition à des *checkpoints* immunitaires inhibiteurs et la sécrétion par les leucocytes pro-tumoraux de molécules immunosuppressives comme IL10, TGFβ, PGE_2, adénosine et galectine-1. Malgré tout, les lymphocytes T CD4$^+$ Th1 sécrètent de l'IL2, du TNFα et de l'IFNγ qui permettent de recruter des macrophages M1 et lymphocytes T et NK, de promouvoir l'activité cytotoxique des macrophages et des lymphocytes NK et T CD8$^+$ et de favoriser le *priming* et la polarisation des lymphocytes Th1 et Tc1.[451,452,455,456]
6. **reconnaissance et lyse des cellules tumorales** : la sécrétion d'IFNγ par les lymphocytes Th1 permet notamment d'augmenter l'expression des molécules du CMH et favorise le *processing* des peptides pour leur présentation, et de fait promeut l'action des CTLs. Les CTLs et les lymphocytes NK peuvent alors détecter les cellules tumorales et initier la dégranulation de molécules cytotoxiques (perforine et de granzymes), et induire l'apoptose par l'action de TRAIL ou FasL. Bien que les lymphocytes NK aient un fort pouvoir anti-tumoral, ceux-ci ne semblent pas posséder un rôle majeur dans la réussite au long terme de la réponse anti-tumorale. Cependant, l'action des NKs peut soutenir l'induction d'une réponse spécifique des antigènes tumoraux en initiant l'*epitope spreading* grâce à leur capacité de lyse.[451,457,458] Leur efficacité est probablement amoindrie du fait des différentes stratégies mises en place par les cellules tumorales pour se

préserver de leur action : sécrétion de TGFβ[458], surexpression de molécules du HLA-G qui inhibe KIR exprimé par les cellules NKs,[459] sous-régulation de l'expression de MICA/B ou sécrétion de formes solubles de MIC qui perturbent la signalisation par NKG2D.[460,461]

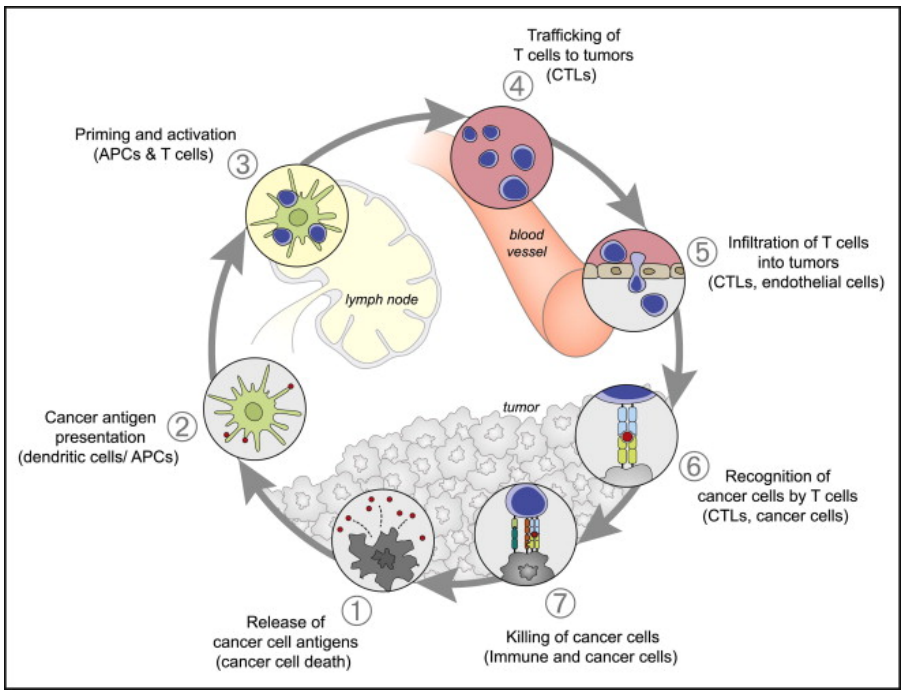


Figure 21 : Le cycle de l'immunité anti-tumorale.[451] La génération d'une immunité contre le cancer est un processus cyclique qui peut se propager automatiquement, conduisant à une accumulation de facteurs immunostimulants qui devraient en principe amplifier la réponse des lymphocytes T. Le cycle est également caractérisé par des facteurs inhibiteurs qui conduisent à des mécanismes de régulation immunitaire, ce qui peut limiter l'immunité. Ce cycle peut être divisé en sept étapes principales : la libération d'antigènes par la cellule cancéreuse, assimilation des antigènes par les APC, activation et amorçage des lymphocytes T par les APC dans le ganglion lymphatique, circulation des CTLs jusqu'à la tumeur, infiltration des lymphocytes T dans la tumeur, reconnaissance des cellules cancéreuses par CTL et finalement, destruction des cellules cancéreuses par l'action cytotoxique des lymphocytes. Chaque étape est décrite et complétée avec les types cellulaires impliqués et le site où elle se déroule. APC : antigen presenting cell, CTL : cytotoxic T cell.

Les différents types de réponses immunitaires dans le cancer

A l'inverse de la réponse Th1, la réponse Th2 est généralement associée à un mauvais pronostic. Cela s'explique notamment par son inhibition de la réponse Th1. De plus, les lymphocytes Th2 sécrètent de l'IL4, IL5 IL6, IL10 et IL13 qui favorisent une anergie des lymphocytes et une réponse humorale plutôt que cytotoxique. En outre, les IL4, IL10 et IL13 favorisent la polarisation des macrophages et des neutrophiles vers un phénotype alternatif, M2 et N2 respectivement, et empêchent la maturation des DCs et leur fonction de présentation. Par ailleurs, cela augmente aussi la production de

iNOS (*inducible nitric oxyde synthase*) et d'arginase par les macrophages ce qui bloque la prolifération et l'activation des lymphocytes T $CD8^+$. En outre, la présence de lymphocytes B dans l'environnement micro-tumoral, sans présence de TLS, a été reliée à un plus mauvais pronostic. Ces derniers pourraient participer à la progression tumorale par différents mécanismes. Leur sécrétion d'IL10 et de TGFβ favorisent la prolifération cellulaire et le recrutement de MDSCs et de lymphocytes Treg. La production d'anticorps et leur dépôt pourrait promouvoir l'angiogenèse, et aussi une inflammation chronique médiée par activation des cellules myéloïdes dotées de récepteurs à la région Fc (fragment cristallisable) des Ig. Il semble également que des lymphocytes B arborent un phénotype régulateur au sein du stroma tumoral. Cependant, l'acquisition de ce phénotype régulateur n'est pas bien comprise, notamment si cela provient d'une transition qui s'opère lors de leur recrutement dans la tumeur. Néanmoins, pour certains types de tumeurs comme les cancers du sein, des ovaires ou les lymphomes de Hodgkin, l'infiltration de lymphocytes Th2 et/ou l'expansion clonale de lymphocytes B sont associées à un bon pronostic, probablement via la production d'anticorps et la fonction de présentation antigénique des lymphocytes B.[451–453,457,462,463]

La réponse médiée par des lymphocytes Th17 semble avoir une double valeur pronostique : mauvaise dans le cas des cancers colorectaux et du poumon et le CHC, bon chez les patients souffrant de cancers gastriques ou de l'œsophage.[463] En effet, il apparaît que la principale cytokine produite par ces lymphocytes Th17, l'IL17A, présente une activité pro- ou anti-tumorale selon le contexte. D'une part, elle peut induire une réponse anti-tumorale en augmentant la réponse médiée par les lymphocytes B et T $CD8^+$.[450,464,465] D'autre part, l'IL17A peut favoriser une inflammation chronique (via la sécrétion d'IL1β, CXCL8, CXCL2, CCL20, IL6…),[466] le recrutement de MDSCs et l'angiogenèse (sécrétion de VEGF) ce qui peut favoriser la progression tumorale.[467,468] Néanmoins, l'IL17 n'est pas uniquement sécrétée par les Th17 mais aussi par les MDSCs, certains macrophages et neutrophiles, ainsi que les lymphocytes T γδ.[466] Les lymphocytes Th17 sécrètent également de l'IL17F et de l'IL21 qui possèdent également une action pro-angiogénique.[469] Elles produisent aussi deux ectonucléotidases (CD39 et CD73) qui favorisent la dégradation d'ATP et ADP

(adénosine-diphosphate) et adénosine particulièrement immunosuppressive pour les lymphocytes Th1 et Tc1.[470] En parallèle, probablement via la production de CCL20 et CCL2, les lymphocytes Th17 promeuvent le recrutement de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et de DCs dans la tumeur et la migration de ces APCs dans les ganglions lymphatiques drainant la tumeur. De plus, les Th17 semblent aussi avoir la capacité d'acquérir, après activation, le complexe du CMH provenant d'un DCs, déjà associé à un peptide, et d'en faire la présentation aux lymphocytes T $CD8^+$.[471] Par ailleurs, les lymphocytes Th17, contrairement aux Th1 et Th2, ont une très grande plasticité cellulaire qui leur permet de transiter vers des phénotypes pseudo-Th1, -Th2 ou -Treg. La transition vers un phénotype pseudo-Th1 semble à sens unique et est favorisée par l'IL12, l'IL23, l'IL1β et un faible taux ou une absence de TGFβ. La conversion des lymphocytes Th17 en pseudo-Th1, qui expriment encore certaines caractéristiques des Th17, apparaît relativement courante *in vivo*. Aussi, des lymphocytes T présentant un phénotype mixte Th17/Treg ont été décrits chez l'homme et la souris, ils sont la preuve d'une forte plasticité existante entre ces deux polarisations. De plus, la différentiation vers les phénotypes Th17 et Treg comporte des points communs, dont notamment l'effet du TGFβ. Les lymphocytes T mixtes Th17/Treg produisent de l'IL17 et présentent une activité immunosuppressive dépendante de l'expression du facteur de transcription FoxP3 (*forkhead box P3*). Ces T mixtes Th17/Treg pourraient être impliqués dans les processus auto-immuns. La polarisation vers le phénotype Th17 est favorisée par l'IL6, alors que la transition vers le sous-type Treg est influencée par l'IL1β, l'IL21, l'IL23 et l'IL2. Des lymphocytes mixtes Th17/Th2 existent également chez l'homme et peuvent sécréter les cytokines, signatures des deux phénotypes. Cependant la plasticité des lymphocytes Th17 vers Th2 n'est pas réciproque et est médiée par la présence d'IL4.[472] Plus récemment, il a été mis en évidence qu'en situation non pathologique les Th17 acquièrent un phénotype Tfh (caractérisé par l'expression de BCL-6, CXCR5, IL21 et PD-1 [*programmed cell death 1*]), notamment dans les organes lymphoïdes secondaires, et permettent le développement d'une réponse B.[465,469] Au sein de la tumeur, le recrutement des lymphocytes Th17 semble reposer sur différentes cytokines, dépendamment de l'environnement, telles que CCL20, CCL17, CCL22, MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), CCL5, CCL2 ou encore CCL4, qui sont principalement produites par des cellules myéloïdes. En outre,

la sécrétion d'IL1β, IL6, IL23 et de TGFβ par les cellules cancéreuses et les CAFs favorisent une différentiation en Th17.[473] Dans le stroma tumoral, des lymphocytes T $CD4^+$ Th17/Th1 secrétant de l'IL17, du TNFα et de l'IFNγ ont été retrouvés dans plusieurs types de cancers. Ces cellules T $CD4^+$ Th17/Th1 ont la capacité de sécréter du CXCL10 et CXCL9, qui permettent le recrutement des lymphocytes T, et de favoriser l'activité cytotoxique des macrophages/monocytes, lymphocytes T $CD8^+$ et NK. Il apparaît même que ces T $CD4^+$ Th17/Th1 aient un rôle anti-tumoral plus important que les lymphocytes Th1. Cette aptitude est reliée à leur production concomitante d'IL17 et d'IFNγ.[472,474] La polarisation des lymphocytes Th17 vers un phénotype Treg n'a pas pu être démontrée *in vivo*, même si des preuves existent *in vitro*. En outre, les lymphocytes Th17/Treg, observés dans l'environnement micro-tumoral, dérivent généralement de lymphocytes Treg.[469] La fonction suppressive de ces lymphocytes Th17/Treg semble être fonction du contexte tumoral. Par exemple, la sécrétion d'IDO par les pDCs préserve le phénotype régulateur des lymphocytes Treg, alors que la sécrétion d'IL6 favorise une plasticité vers un phénotype Th17.[475] Cependant, la polarisation de clones T Th17 vers un phénotype Th1 ou Treg dans l'environnement micro-tumoral doit encore être questionnée et semble dépendre des cytokines localement sécrétées. Une revue systématique a pu établir que dans la tumeur, l'IL17A était en réalité corrélée à un mauvais pronostic mais qu'une plus grande fréquence de lymphocytes Th17 était, quant à elle, associée avec un meilleur pronostic.[476]

L'étude de l'environnement micro-tumoral a permis de mettre en évidence la formation fréquente de TLS au niveau des marges invasives de tumeurs solides, et leur association avec un meilleur pronostic dans plusieurs types de cancers. Ces TLS semblent similaires aux follicules secondaires des ganglions lymphatiques. Ils sont constitués d'une zone riche en lymphocytes T naïfs et mémoires avec des DCs matures, et d'une zone folliculaire avec des lymphocytes B matures entourés de plasmocytes.[450] (***Figure 22***) Ces structures se retrouvent principalement dans la zone adjacente au stroma tumoral et sont générées lors d'une stimulation inflammatoire chronique. La sécrétion d'IL17A et de CXCL13 par des lymphocytes, macrophages et cellules stromales induit la sécrétion par ces dernières de CCL19, CCL21, CXCL12 et CXCL13. Ces chimiokines induisent la migration de lymphocytes T et B et de DCs et

favorisent la formation de TLS. L'effet favorable des TLS sur le pronostic des patients s'explique par leur structure et emplacement permettant la génération d'une réponse immunitaire anti-tumorale, et plus spécifiquement d'une réponse effectrice et mémoire, primordiale pour un effet au long terme.[477–479] Les TLS permettent aux DCs de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T et de les activer. Cela favorise leur prolifération et leur différentiation en T $CD4^+$ Th1 ou $CD8^+$ cytotoxiques. De ce fait, les TLS favorisent une réponse Th1/Tc1, capable d'orchestrer une réponse anti-tumorale,[480] mais également de générer des lymphocytes Tfh qui participent à la maturation des lymphocytes B et à l'organisation des TLS.[481] Dans la zone folliculaire, la détection de BCL-6 et d'IL21 indique une réponse médiée par les lymphocytes B avec expansion clonale. En outre, la présence de lymphocytes Tfh est également associée à une augmentation de la réponse B. De ce fait, les lymphocytes B interagissent avec les DCs folliculaires présentatrices d'antigènes tumoraux et génèrent des immunoglobulines matures de forte affinité antigénique.[463] Il en résulte la formation de lymphocytes B matures, mémoires ou de plasmocytes et la sécrétion d'anticorps. Parmi ces immunoglobulines, certaines vont se fixer aux cellules tumorales et induire une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC pour *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) ou une cytotoxicité dépendante du complément (CDC pour *complement-dependent cytotoxicity*).[450,477,482] Par ailleurs, les IgG produites localement peuvent augmenter la capacité de présentation des DCs en favorisant leur activation par fixation aux récepteurs de la région Fc et en sur-régulant leur expression de molécules co-stimulatrices (ex. CD86).[483] Finalement, les lymphocytes B présents dans les TLS sont en mesure de présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$.[482] Chez des patients, la densité de TLS a été corrélée avec celle des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans la tumeur, et associée à une augmentation de leurs marqueurs d'activation, de chimiotaxie et de cytotoxicité, et à un phénotype effecteur mémoire.[480,483,484] Par ailleurs, les lymphocytes T $CD4^+$ and $CD8^+$ mémoires générés dans un TLS peuvent rejoindre l'environnement tumoral ou la circulation générale, grâce à CCL21 exprimé par les vaisseaux lymphatiques.[479] Dans ce dernier cas, les lymphocytes peuvent y « patrouiller » sur une longue période et prévenir des métastases. En revanche, dans certains types de tumeurs, les TLS sont associés avec un stade plus avancé et un mauvais pronostic. Cela pourrait être dû à la

facilité de métastaser vers les ganglions lymphatiques dès lors que des cellules cancéreuses ont pénétré dans un TLS. De plus, la détection de lymphocytes Treg et/ou de MDSCs dans des TLS pourrait avoir une influence négative sur la capacité de ces dernières à induire une réponse T et B anti-tumorale.[450]

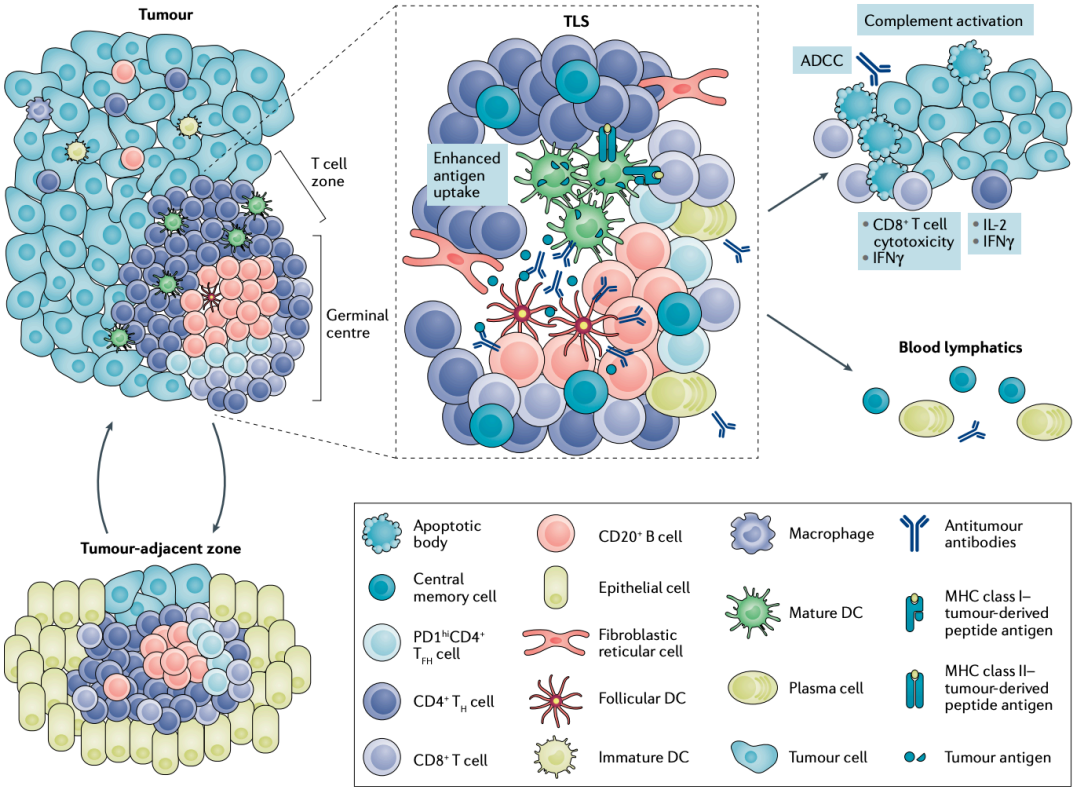


Figure 22 : L'organisation d'une structure lymphoïde tertiaire.[450] Le schéma montre une structure lymphoïde tertiaire (TLS) située dans une tumeur avec une zone de lymphocytes T CD3⁺ contenant des cellules dendritiques (DC) DC-LAMP+ (DC-lysosome-associated membrane glycoprotein) et des cellules fibroblastiques reticulaires (FRC), et une zone de lymphocytes B CD20+ avec un centre germinal, des plasmocytes, des complexes immuns formés d'anticorps et d'antigènes tumoraux, et des DCs folliculaires (FDC). L'action, à la fois, des lymphocytes T effectrices cytotoxiques CD8⁺, et des lymphocytes B générées dans le TLS, permettent la destruction de la tumeur in situ via l'induction directe de la mort cellulaire, ou par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) médiée par les macrophages et/ou les lymphocytes NK (natural killer), et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC). Les lymphocytes T et B centraux mémoires générés dans les TLSs peuvent circuler et protéger contre les métastases. Dans certains cancers, les TLSs situés dans des régions inflammées adjacentes à la tumeur, peuvent servir de niche pour les cellules tumorales progénitrices ou les cellules cancéreuses à l'origine d'une rechute. IFNγ : interferon γ, IL-2 : interleukin-2, MHC : major histocompatibility complex, PD1 : programmed cell death 1.

C. Contexte immunitaire du cholangiocarcinome

Le microenvironnement du CC est considéré comme desmoplastique avec un grand nombre de CAFs. Cet environnement est également infiltré par des cellules immunitaires pro-tumorigéniques et pro-inflammatoires.[485] Il a été mis en évidence que les CAFs jouent un rôle actif dans la progression du cancer grâce au remodelage

de la MEC et à la communication avec les différents compartiments immunitaires pro-inflammatoires.[486,487]

Macrophages associés à la tumeur (TAMs pour *tumor-associated macrophages*)

Les macrophages associés aux tumeurs sont l'un des principaux composants de l'environnement micro-tumoral. Ils jouent un rôle majeur dans la progression tumorale et le remodelage du microenvironnement. Dans le contexte spécifique du cancer, les TAMs présentent principalement un phénotype M2 avec de puissantes propriétés pro-tumorigènes et immunosuppressives.[488,489] (***Figure 23***) Les TAMs produisent de grandes quantités de MMPs, de RNS et ROS[489,490], diverses cytokines[485] et des facteurs pro-angiogéniques tels que l'IL8 et du VEGF.[489,491]

Au sein du CC, les TAMs dérivent principalement de monocytes circulants qui sont positifs pour CD14 et CD16, et ne semblent pas liés aux KCs. Ils sont attirés par le microenvironnement tumoral via la signalisation par CCL2 et le CSF1 (*colony stimulating factor 1*) sécrétés par les CAFs,[489] et activés via la voie IL6/STAT3.[485,492] CCL2 semble critique pour le recrutement des TAMs au niveau de l'environnement du CC,[493] et pourrait être secrété, en plus des CAFs, par les KCs et les TANs (*tumor associated neutrophils*).[491] D'autres cytokines, telles que les chimiokines CCL3, CCL4 et CXCL12[494] ou les interleukines IL1β, IL4, IL10 et IL13, sont également impliquées dans l'attraction des macrophages et monocytes dans la tumeur.[492]

Les macrophages acquièrent leur phénotype M2, principalement via la signalisation IL6/STAT3.[495] En effet, les cellules CC produisent des quantités importantes d'IL6 et de TGFβ, deux molécules impliquées dans la polarisation des macrophages, qui agissent également avec l'IL10 et le CSF1 sécrétées par les cellules tumorales et les cellules immunitaires infiltrées.[495] De plus, un sous-type de cellules de CC avec un phénotype *stem cell-like*, est impliqué dans la sécrétion d'ostéoactivine, d'IL13 et d'IL34 qui potentialisent activement le recrutement de TAMs et leur polarisation en type M2.[496]

Lorsqu'ils sont présents dans le microenvironnement tumoral, les macrophages M2 libèrent une grande quantité de molécules favorisant la progression du cancer et le processus de métastases : du TNFα, de l'IL6 et du TGFβ qui favorisent la croissance

tumorale ; du VEGFA qui contribue à l'angiogenèse ; des MMPs qui participent au remodelage de la MEC; ainsi que de l'IL4, IL8, IL10, et du CCL2, CCL22 et CCL17 qui attirent des cellules immunosuppressives comme les TANs, les MDSCs et les Treg. En outre, le métabolisme des TAMs M1 est principalement basé sur la production d'iNOS, qui convertit l'arginine en NO toxique pour les cellules cancéreuses. Cependant, les TAMs M2 expriment l'enzyme arginase 1 qui métabolise l'arginine en ornithine et favorise la polarisation vers le phénotype M2 et altère l'activité anti-tumorale des lymphocytes T.[485,495,497,498] De plus, il a été démontré que la voie Wnt/β-caténine favorise la croissance du CC et contribue à la polarisation de TAMs vers un phénotype M2. En effet, il semble que les cellules CC produisent certains ligands Wnt qui peuvent ensuite recruter et activer alternativement les macrophages. En parallèle, le Wnt dérivé des macrophages prend en charge la prolifération des cellules CC par la signalisation canonique Wnt.[499,500]

Chez les patients souffrant de divers cancers, le nombre, le phénotype et/ou la localisation des macrophages dans la tumeur a montré une valeur pronostique.[501–507] Dans le CC, une forte densité de macrophages M2 (c'est à dire des macrophages $CD163^{+}$) est associée avec une promotion de la tumeur et un plus grand caractère invasif,[490,498] mais est également corrélée au nombre de Treg inflitrés.[495] Ainsi, la survie sans rechute des patients souffrant de iCC, ainsi que la survie globale des sujets atteints de eCC, semblaient plus faibles lorsque les tumeurs étaient enrichies en M2.[495,498] Dans d'autres études cependant, la détection de TAMs $CD68^{+,}$ au niveau du front invasif du CC corrélait avec un plus faible taux de rechute et pourrait servir de marqueur pronostique indépendant pour la survie.[507] A l'opposé, la présence de TAMs $CD68^{+}$ au centre de la tumeur est associée avec un plus mauvais pronostic.[507]

Enfin, certains macrophages exprimant le récepteur de l'angiopoïétine TIE2 (macrophages appelés TEM) sont détectés dans de nombreuses tumeurs malignes, et favorisent l'angiogenèse en surexprimant du VEGF, ce qui favorise l'invasion tumorale. Dans certains modèles, on leur a également attribué des fonctions immunosuppressives en convertissant les cellules T conventionnelles en phénotype Treg via la sécrétion d'IL10,[491] et en altérant la maturation des DCs et donc le *priming* de lymphocytes T.[508] De façon intéressante, dans le cas de CC hilaires, les TEMs étaient associés avec un bon pronostic.[509]

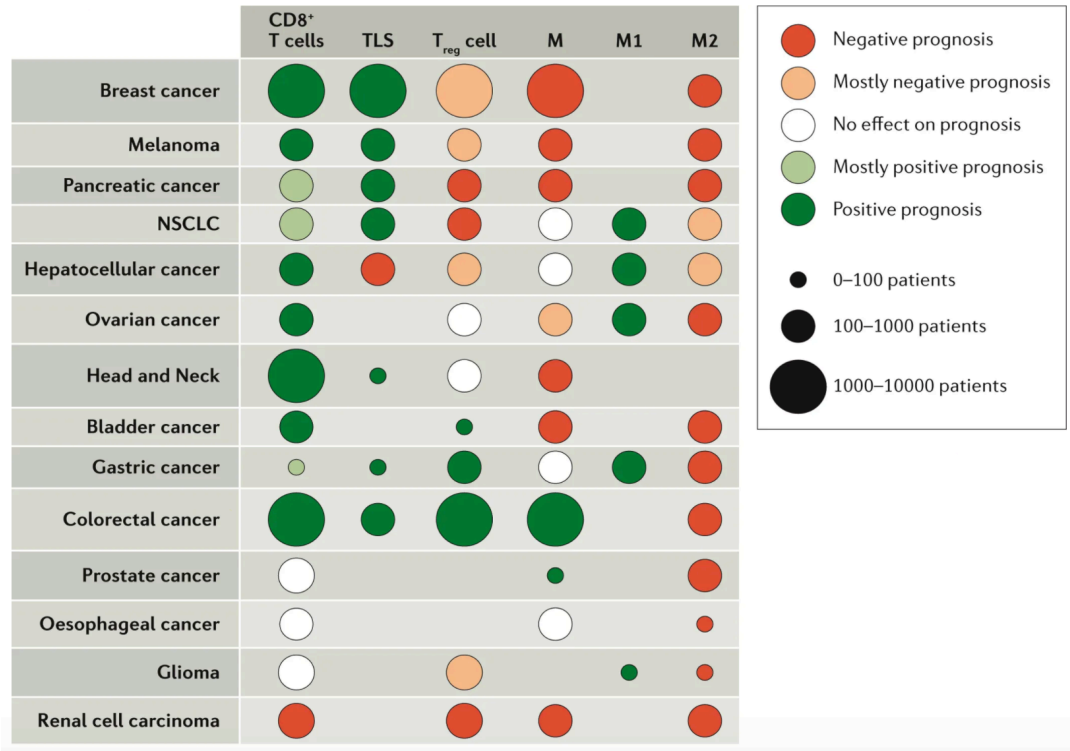


Figure 23 : L'effet de l'infiltrat immunitaire dans l'environnement micro-tumoral sur le pronostic des patients.[463] Les données de 200 études incluant environ 25000 patients, ont été analysées afin d'établir une valeur pronostique sur la survie globale des lymphocytes T CD8+, des structures lymphoïdes tertiaires (TLS), des lymphocytes T régulateurs (Treg), des macrophages (M) CD68+ et plus spécifiquement des sous-type M1 ou M2. Les pastilles de couleur foncée indiquent une forte association pronostique positive (verte) ou négative (rouge) après analyse de toutes les études pertinentes, les pastilles de couleur plus claires indiquent une association pronostique principalement positive (vert clair) ou négative (orange) dans la majorité des études analysées. Les cercles blancs indiquent aucune corrélation statistiquement significative, ou qu'une association pronostique suspecte a été observée dans plusieurs études. La taille des cercles indique le nombre de patients inclus dans les études : les petits cercles correspondent à 0-100 patients, les cercles de taille moyenne correspondent à 100-1000 patients et les grands cercles correspondent à 1 000-10000 patients.

Neutrophiles associés à la tumeur

Le rôle des neutrophiles dans le cadre d'un cancer pose encore des questions. Cependant, leur association fréquente avec un mauvais pronostic met en évidence un certain rôle pro-tumoral.[510] En effet, les TANs semblent acquérir un phénotype alternatif au sein du site tumoral, de la même manière que les macrophages. La polarisation N1 et N2 est couramment utilisée pour décrire, respectivement, le phénotype anti-tumoral ou pro-tumoral des neutrophiles.[510,511]

Plusieurs molécules sont impliquées dans le recrutement de neutrophiles dans la tumeur comme : les GM-CSF, G-CSF, VEGF et IL1β qui sont produits par les CAFs et d'autres leucocytes infiltrés ; les IL8 et IL6 qui sont sécrétées par les cellules cancéreuses et les macrophages; les CXCL1, CXCL2, IFNγ et TNFα qui sont produites

par les lymphocytes T et les neutrophiles eux-mêmes (rétrocontrôle positif).[497,510] Au sein du CC, l'attraction des neutrophiles semble principalement médiée par la sécrétion de CXCL5 par les cellules tumorales, et via les voies de signalisation PI3K/ AKT (*protein kinase B*) et ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*).[512]

Une fois infiltrés dans le microenvironnement tumoral, les neutrophiles présentent souvent un phénotype N2. La polarisation des TANs est principalement médiée par le TGFβ qui provient des cellules tumorales[511] ou des TAMs.[489] L'IL8 et le CXCL5 contribuent aussi à leur polarisation vers un phénotype pro-tumoral.[513]

Les TANs libèrent de nombreux facteurs de croissance, enzymes et cytokines tels que 1) le HGF qui favorise la croissance tumorale, 2) l'oncostatine M, la cathepsine G, la protéinase-3, les MMP8 et 9 et l'élastase qui participent au remodelage du microenvironnement tumoral, 3) CXCL1, CXCL8 et CCL3 qui attirent les leucocytes ou 4) CXCL2, CXCL6, VEGF, et encore la MMP9 qui stimulent l'angiogenèse. Ils contribuent à établir un microenvironnement pro-inflammatoire et pro-tumoral et augmentent le potentiel métastatique des cellules malignes.[510,514] Comme les macrophages M2, les TANs N2 produisent également des quantités importantes d'arginase qui inhibent la fonction effectrice des lymphocytes T,[511] secrètent du CCL2 et CCL7 qui participent au recrutement des TAMs, et du CCL17 qui attire les Treg.[492,512] Par ailleurs, les neutrophiles pourraient également favoriser les métastases via l'action de leur NET, comme cela a été suggéré dans un modèle de CHC.[515]

En parallèle, des neutrophiles dotés de fonctions anti-tumorales ont également été détectés dans de nombreux types de cancer. Ils agissent comme des neutrophiles classiques et pourraient améliorer la réponse anti-tumorale médiée par les cellules T, ainsi que par certaines cellules immunitaires innées.[514]

Dans le cadre d'eCC, un niveau élevé de TAN $CD66^+$ est corrélé avec une densité de Treg plus élevée et une infiltration de lymphocytes T $CD8^+$ plus faible.[516] Un niveau élevé de TANs $CD66^+$ intratumoraux a été associé à un mauvais taux de survie non seulement chez les patients atteints d'eCC mais également chez les patients atteints d'iCC.[513,516] De même, dans un panel de 291 échantillons de patients atteints d'eCC ou d'iCC, la densité des neutrophiles, positifs pour CD15, était plus élevée dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain proximal. De plus, une augmentation de la détection de CD15 dans le lit tumoral a été reliée à une durée de survie sans rechute plus

courte.[517] Dans l'ensemble, les neutrophiles infiltrant le CC ont tendance à être corrélés avec une mauvaise issue clinique. De nos jours, le ratio neutrophiles/lymphocytes est exploité comme marqueur de pronostic en clinique, et une méta-analyse a conclu qu'un ratio élevé était de mauvais pronostic dans le CC (taux de survie plus faible).[518]

Cellules myéloïdes suppressives

Les MDSCs sont un groupe de cellules immunitaires hétérogènes, dérivées de progéniteurs myéloïdes immatures, avec de puissantes propriétés immunosuppressives impliquées dans la progression tumorale ainsi que dans d'autres pathologies liées à l'immunité. Leurs actions immunosuppressives reposent notamment sur la synthèse de ROS et la production d'enzymes comme l'arginase, iNOS, COX2 (*prostaglandin-endoperoxide synthase 2*) et IDO, ainsi que des cytokines comme TGFβ ou IL10. Ces molécules abrogent les réponses des lymphocytes T spécifiques de l'antigène, en affectant directement ces cellules ou par l'induction d'un environnement fortement immunosuppressif. Outre cette action sur les leucocytes, elles impactent également la croissance tumorale en favorisant l'angiogenèse, en induisant la sécrétion de VEGF et du FGF (*fibroblast growth factor*), et le remodelage du microenvironnement via la promotion de la libération de MMP9. Dans de nombreux histotypes de cancer, un nombre élevé de MDSCs (dans le microenvironnement tumoral et la circulation) a été associé à un stade plus avancé de cancer et à un mauvais pronostic.[519–521]

Dans plusieurs modèles murins de tumeurs malignes, les CAFs qui produisent FAP (*fibroblast activation protein*) attirent les MDSCs dans le microenvironnement tumoral de manière dépendante de CCL2/STAT3, mais également via la sécrétion d'IL6 et d'IDO.[492,522] La sécrétion de CXCL1 et CXCL2 par les cellules tumorales est également impliquée dans le recrutement des MDSCs au site de la tumeur.[522]

Jusqu'à présent, le rôle des MDSCs a été sous-étudié dans le cadre du CC. Néanmoins, dans une cohorte de patients, le tissu malin est apparu plus infiltré par les MDSCs que le tissu sain environnant, suggérant un rôle pro-tumoral.[521]

Les lymphocytes NK

Peu de choses sont connues sur les cellules NK dans le cadre du CC. Néanmoins, dans plusieurs autres cancers, y compris le CHC, une augmentation du nombre de NK de leur activité cytotoxique a été associée à de meilleurs résultats cliniques.[491,523]

Chez les patients atteints par la CSP, les polymorphismes du récepteur d'activation, des cellules NK, NKG2D, sont associés à un risque plus élevé de développer un CC.[524] Comme NKG2D est principalement exprimé sur les cellules NK, cette observation pourrait indiquer un rôle important des cellules NK dans l'immunosurveillance du CC. Dans cette ligne, l'activité cytotoxique anti-tumorale des cellules NK, expansées ex vivo, a récemment été observée contre un modèle de CC implanté chez des souris immunodéficientes.[525] Cependant, la faisabilité d'une telle thérapie dépendra de la capacité des cellules NK à s'infiltrer dans le microenvironnement tumoral et à provoquer une réponse cytotoxique appropriée dans un hôte immunocompétent.[523]

Lymphocytes T et B

Les lymphocytes T, en reconnaissant de manière spécifique un antigène, peuvent orchestrer une réponse hautement cytotoxique contre les cellules malignes. Par exemple, le transfert adoptif de cellules T spécifiques de CC expansées *ex vivo* a montré une amélioration remarquable de la maladie chez un patient CC.[526] Bien que le développement d'une masse néoplasique soit reconnue comme un échec de l'immunosurveillance chez l'hôte, cette dernière stratégie et d'autres approches immunothérapeutiques sont en cours d'évaluation.[428]

Dans le microenvironnement tumoral, les mécanismes de tolérance immunitaire bloquent ou affaiblissent la réactivité des lymphocytes T. Premièrement, les DCs infiltrées présentent souvent une maturation anormale, une présentation antigénique défectueuse ou un phénotype fortement immunosuppresseur ou tolérogène, empêchant de ce fait l'amorçage des cellules T $CD8^+$ et $CD4^+$.[527,528] De plus, ces DCs expriment fréquemment des molécules inhibitrices (par exemple PD-L1) qui limitent l'activation des lymphocytes T.[528] La polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs dans le microenvironnement tumoral joue également un rôle majeur dans l'échec de l'immunité anti-tumorale. En effet, la libération d'IL10 et de TGFβ par les MDSCs et les

TAMs,[528,529] mais également la sécretion de CCL2 par les TANs, TAMs et CAFs, attirent et amplifient les lymphocytes Treg au sein même de la tumeur.[491,512,522] Les DCs jouent également un rôle dans le recrutement des lymphocytes Treg dans la tumeur tandis que ces mêmes lymphocytes, en retour, favorisent le phénotype régulateur des DCs par l'expression constitutive de CTLA-4.[527,528] De plus, IL10 sécrétée par les MSDCs et les TAMs tend à favoriser une réponse des lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ Th2 avec l'engagement des cellules B, plutôt que des réponses Th1 ou Tc1. Ces deux dernières possèdent une importante fonction dans immunosurveillance du cancer.[529,530] Il en résulte un cercle vicieux où une population prédominante de lymphocytes Treg produit de l'IL10 et du TGFβ et recrute donc d'autres cellules immunitaires innées immunosuppressives, ce qui induit la polarisation des DCs en un phénotype régulateurs produisant de l'IDO, empêchant finalement le système immunitaire de rejeter le tissu malin.[528,529]

Chez les patients atteints d'iCC, comme pour de nombreux cancers, les lymphocytes T $CD8^+$ restent principalement sur le front invasif de la tumeur. Au contraire, les cellules positives à l'IL17A ont été principalement trouvées dans les régions intratumorales et pourraient être liées à la progression de la tumeur.[513] La détection des lymphocytes T $CD8^+$ intratumoraux a été corrélée à une plus faible fréquence de métastases ganglionnaires et à un meilleur pronostic global dans différentes cohortes de CC.[531,532] Plus généralement, une quantité plus élevée de lymphocytes totaux infiltrés, de lymphocytes B, T $CD4^+$ et $CD8^+$ a été décrite comme un marqueur de pronostic favorable dans une cohorte de patients atteints de CC.[533] Concernant la valeur pronostique des lymphocytes Treg, sa pertinence reste débattue. En effet, des résultats contrastés ont été rapportés indiquant une association avec un bon[533] ou mauvais[516,534] pronostic dans une et deux cohortes de patients souffrant d'un CC, respectivement.

Échappement immunitaire

L'une des caractéristiques du cancer est la capacité des cellules tumorales à échapper à l'immunosurveillance de l'hôte.[428] C'est pourquoi, les cellules cancéreuses ont mis en place plusieurs mécanismes afin de façonner le système immunitaire à son avantage. Premièrement, les cellules cancéreuses, y compris le CC, recrutent des

cellules immunitaires qui arborent des activités pro-tumorales, par la sécrétion de différentes molécules immunosuppressives. Parmi ces derniers, le TGFβ et l'IL10 attirent les lymphocytes Treg, les TANs, les TAMs et les MDSCs qui peuvent façonner les DCs en un phénotype régulateur,[491,511,535] en parallèle l'IL6 favorise la polarisation des macrophages dans un phénotype M2 et permet le recrutement des MDSCs.[536]

L'enrichissement du nombre de CAFs au sein des tumeurs de CC réprime également l'immunité anti-tumorale adaptative en sécrétant des cytokines immuno-inhibitrices et en recrutant des acteurs immunitaires pro-tumorigènes.[491,496] En densifiant la MEC, ils participent aussi à l'exclusion physique des lymphocytes T. De plus, la production de CXCL12 par les CAFs perturbe la migration des lymphocytes T vers la tumeur.[537]

Les cellules tumorales peuvent inhiber directement la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par les lymphocytes T en surexprimant certains *checkpoints* de l'immunité, tels que PD-L1 ou HHLA2 (*human endogenous retrovirus-H long Terminal repeat-associating*),[50] ou en sous-régulant l'expression à la surface du CMH de classe I.[37] Chez les patients atteints d'un CC, l'expression de PD-L1 n'est pas toujours avérée et semble principalement provenir des leucocytes plutôt que des cellules tumorales.[50,51] L'expression de PD-L1 a cependant été corrélée avec une baisse du nombre de lymphocytes T $CD8^+$ infiltrés dans la tumeur,[539] et un mauvais diagnostic.[540,541] Également, l'expression du CMH de classe I apparaît sous-régulée chez certains patients avec un CC,[542] alors qu'un taux normal est associé avec une infiltration de lymphocytes T et un pronostic plus favorable.[541] Il est aussi probable que les cellules de CC produisent du PGE_2 et de l'adénosine, ce qui peut directement inhiber la fonction des lymphocytes T et leur activation.[14]

D'autres mécanismes pourraient aussi favoriser l'échappement immunitaire du CC. Par exemple, l'absence de DAMPs émis par les tumeurs se développant lentement pourrait de ce fait favoriser la tolérance.[528,529] En outre, le système vasculaire sanguin désordonné, que l'on retrouve dans le stroma tumoral, peut déclencher l'apoptose des lymphocytes T, principalement des $CD8^+$. Cela favorise ainsi un plus faible ratio de lymphocytes T $CD8^+$ par rapport aux Treg.[537]

Le CC ne fait pas exception à la règle et sa croissance repose sur le développement de mécanismes d'échappement immunitaires, notamment avec le recrutement de leucocytes dotés de fonctions immunosuppressives. Il faut également prendre en

compte que l'environnement du foie est naturellement tolérogène ce qui peut également participer à la faible activité anti-tumorale des leucocytes infiltrés ou à la marge du CC.

Application d'immunothérapies pour le traitement du CC

Le CC est un cancer de mauvais pronostique et pour lequel le choix de thérapies reste très limité. L'émergence des immunothérapies en cancérologie depuis une vingtaine d'années permet d'espérer le développement de nouveaux traitements plus efficaces. De plus, les cellules T $CD8^+$ médiant l'immunité anti-tumorale peuvent être détectées et ont été associées à un pronostic favorable. Ainsi, il est envisageable d'imaginer la mise en œuvre d'approches immunothérapeutiques pour la prise en charge du CC.[532] (***Figure 24***)

Cependant, contrairement à certaines tumeurs, comme le mélanome ou le cancer du poumon, la réussite de ce type de traitement pour le CC ne semble pas forcément évidente. En effet, il apparaît tout d'abord, que le CC soit un cancer avec un faible taux de mutation, le rendant alors moins immunogène. Dans une cohorte de plus de 300 patients, plus de 80% de ces derniers avaient un TMB inférieur à 6 - ce qui correspond à la limite pour un TMB faible - et moins de 3% avaient un TMB considéré comme haut, au-dessus de 20. Deuxièmement, le CC, de manière analogue au cancer du pancréas par exemple, possède un stroma tumoral desmoplastique, qui semble associé à son mauvais pronostique. L'environnement micro-tumoral du CC, riche en CAFs activés, pourrait empêcher l'infiltration de leucocytes, peut-être à cause d'une matrice extracellulaire particulièrement pathologique, ou favoriser la polarisation de macrophages en type M2.[543] En outre, il a été démontré que les cellules stellaires pancréatiques pouvaient séquestrer les lymphocytes T $CD8^+$, et donc de les empêcher d'accéder à la tumeur.[544] Un phénomène similaire médié par les HSCs pourrait avoir lieu dans le cas du CC. Il semble en effet que les lymphocytes T $CD8^+$ ne soient que peu infiltrés dans l'environnement tumoral, mais semblent pourtant présents dans le tissu adjacent.[541,545] En tenant compte de ces deux paramètres, le CC semble appartenir au type 2 de tumeur, ou tumeurs froides, du fait de leur faible TMB et un infiltrat de lymphocytes assez limité.[449]

Bien que cela ne place pas le CC comme une tumeur très répondante aux immunothérapies, certains patients avec un infiltrat ou TMB plus élevé pourraient tout de même bénéficier de ces traitements. Par exemple, une étude génomique a démontré que plus de 45% des patients avec un cancer biliaire présentaient une augmentation de l'expression d'au moins un *checkpoint* de l'immunité. De plus, les malades avec la plus forte expression de ces *checkpoints* avaient statistiquement un plus faible taux de survie.[540] Dans une autre étude, l'expression de PD-1, CTLA-4 et GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein*) a été détectée chez tous les sujets, sur les lymphocytes T infiltrés dans la tumeur de CC. L'expression de ces *checkpoints* était plus importante dans la tumeur comparée au foie sain, et la fonction effectrice des lymphocytes T infiltrés pouvait être améliorée grâce au blocage de PD-1 et CTLA-4, et à la stimulation de GITR.[545] Ces résultats sont encourageants pour les patients dont l'expression de *checkpoints* de l'immunité est augmentée dans la tumeur. En outre, le nombre de lymphocytes T $CD8^+$ infiltrés dans l'environnement tumoral a été corrélé avec le taux d'expression du CMH de classe I ce qui indique qu'une réponse anti-tumorale est potentiellement déjà existante.[541]

Actuellement, pas moins de 31 études ont été enregistrées sur ClinicalTrial.gov pour évaluer diverses immunothérapies chez les patients présentant un diagnostic de CC. Ces traitements reposent sur l'administration, en monothérapie ou en régimes combinés, i) d'anticorps monoclonaux (mAbs) ciblant un antigène tumoral, ii) de mAbs bloquant les *checkpoints* inhibiteurs de l'immunité PD-1, PD-L1 ou CTLA-4, iii) d'agonistes des *checkpoints* stimulateurs de l'immunité OX40 (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4*), iv) de lymphocytes T autologues ou exprimant un récepteur antigénique chimérique (*CAR T cells*), v) de vaccination par DCs ou vi) de virus oncolytiques ; cette dernière approche ayant le potentiel de "réchauffer" le tissu malin mal infiltré par les cellules immunitaires effectrices.[546,547]

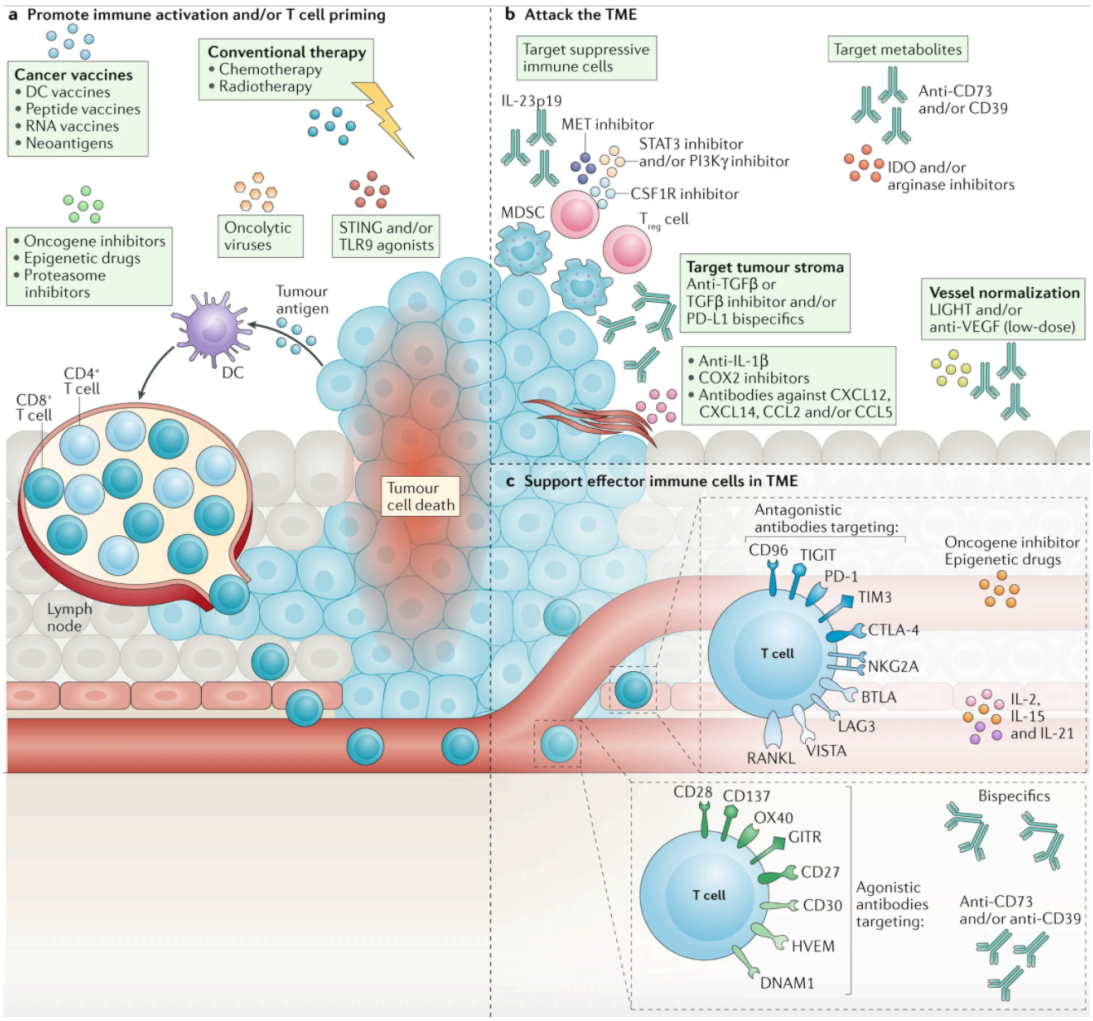


Figure 24 : Les différentes stratégies anti-cancer par immunothérapies et leurs cibles.[446] Afin d'assurer la sensibilité à la thérapie et d'empêcher l'acquisition d'une résistance aux immunothérapies anticancéreuses, le développement de thérapies combinées qui favorisent l'activation des cellules immunitaires et l'amorçage des lymphocytes T (panneau a), lève l'immunosuppression induite par le microenvironnement tumoral (TME) (panneau b) et soutenir les fonctions effectrices des cellules immunitaires dans le TME (partie c) sera essentielle. DC : dendritic cell, IDO : indoleamine 2,3-dioxygenase, MDSC : myeloid-derived suppressor cell, PD-1 : programmed cell death 1, PD-L1 : programmed cell death 1 ligand 1, RANKL : receptor activator of NF-κB ligand, STAT3 : signal transducer and activator of transcription 3, TLR9 : Toll-like receptor 9, Treg cell : regulatory T cell.

D. Auto-immunité, cholangites et cancer

Syndromes paranéoplasiques

Le lien entre auto-immunité et cancer est actuellement particulièrement étudié dans le cadre des syndromes paranéoplasiques. (***Figure 25***) Ces syndromes auto-immuns, sont fortement semblables à des maladies auto-immunes existantes chez des patients sans tumeur, mais leur manifestation est secondaire au cancer, et ils ne constituent pas une pathologie à part entière. Ces syndromes ont une présentation souvent plus sévère que la maladie auto-immune correspondante, avec des

symptomes/manifestations cliniques supplémentaires, et ils ne répondent que très peu aux traitements couramment utilisés. En effet, il semble que leur étiologie soit différente de la pathologie auto-immune classique. Par exemple, le développement de pyoderma gangrenosum, dans le cadre d'une leucémie ou d'un myélome, peut se faire à des sites atypiques et avec des lésions différentes des patients sans tumeurs. Par ailleurs, lors d'un pemphigus vulgaris, les auto-anticorps classiquement retrouvés sont des IgG4, alors que sa manifestation paranéoplasique apparaît médiée par des IgG1, et IgG2 dans une moindre mesure. De plus ces anticorps reconnaissants des épitopes plus divers dans le cadre d'un cancer en comparaison avec la maladie auto-immune seule.[548] De ce fait, un syndrome auto-immun paranéoplasique ne semble donc pas déclenchée dans les mêmes conditions que pour une maladie auto-immune. La perte de tolérance suit probablement deux chemins moléculaires distincts.

Tout d'abord, il peut arriver que l'antigène présenté par les cellules tumorales soit également partagé avec les cellules saines correspondantes. De plus, il n'est pas rare que les cellules tumorales, au-delà des néo-antigènes mutés exposés à leur surface, présentent–de manière aberrante des antigènes du soi, tel que des antigènes normalement non présentés, cryptiques, ou présentés uniquement dans le système nerveux central par exemple (qui est isolé du système immunitaire en temps normal).[437,438] La mise en place d'une réponse anti-tumorale naturelle, même si ineffective dans l'environnement micro-tumorale, peut alors réagir avec des cellules saines.[549] En outre, une primo-réponse immunitaire anti-tumorale, ou bien l'action de traitements cytotoxiques anticancéreux, peuvent favoriser l'*epitope spreading* depuis les cellules tumorales lysées. De ce fait, ces situations contribueraient à activer une réponse contre le soi.[550,551] Ce phénomène se retrouve également lors d'immunothérapies, notamment avec des traitements tels que le transfert adoptif de lymphocytes, des vaccins viraux/peptidiques ou des anticorps ciblant un antigène tumoral.[552] Par ailleurs, les anticorps ciblant les *checkpoints* PD-1, PD-L1 ou CTLA-4 sont également à l'origine de nombreux syndromes paranéoplasiques. Ces thérapies ont pour objectif de lever l'anergie ou l'inactivation de la réponse T dans l'environnement micro-tumorale. Cependant ils peuvent également déréguler des mécanismes permettant une tolérance périphérique. Le blocage de CTLA-4, principalement exprimé par les lymphocytes Treg, provoque leur déplétion in vivo,[553]

ce qui perturbe donc la tolérance périphérique, maintenue par les lymphocytes Treg. De plus, les anti-CTLA-4, en levant les potentielles inhibitions à l'activation des lymphocytes T, conduit également à la diversification des clones T circulant, ces derniers ayant un TCR avec une faible avidité.[554] L'évolution de ce répertoire de TCR permet de limiter l'échappement tumoral, en limitant les stratégies de « dissimulation » de la tumeur, mais peut également promouvoir des clones T auto-réactifs. A l'inverse, les anti-PD-1 sont efficaces en levant l'anergie de clones T $CD8^+$ déjà activés.[555] Parce que leur mode d'action est différent, ces deux immunothérapies ne sont pas associées avec les même syndromes paranéoplasiques.[556]
Certains cancers affectent, directement du fait de leur type cellulaire, les mécanismes de tolérance et conduisent à l'émergence d'auto-immunités paranéoplasiques. Ainsi, un thymome, qui affecte l'épithélium du thymus, peut perturber l'induction de la tolérance centrale au niveau de thymus. Cela résulte en des syndromes auto-immuns multi-organes.[557] Certaines leucémies comme les leucémies lymphoïdes chroniques, ou des lymphomes non-Hodgkiniens, troublent directement la tolérance périphérique. En effet, les cellules tumorales peuvent très largement contribuer au priming d'une réponse immunitaire, soit en favorisant l'infiltration et la différentiation lymphocytaire,[558] ou bien par la sur-régulation anormale de molécules de co-stimulation.[559]

Ces syndromes auto-immuns sont généralement résolus grâce au contrôle de la tumeur et de son expansion. Cela indique que leur développement est directement lié au développement même du cancer, et donc probablement à une réponse anti-tumorale dérivant en réponse auto-immune. De ce fait, lorsque la source de stimulation, c'est-à-dire la tumeur, disparaît, le syndrome auto-immun finit lui aussi par disparaitre. Finalement, nous pourrions qualifier le développement d'une tumeur par une trop grande anergie ou tolérance du système immunitaire face à du soi pathologique, alors que le déclenchement d'une réponse auto-immune se positionne à l'inverse par une perte de la tolérance contre du soi sain. C'est pourquoi l'exploitation de réponse auto-immune apparaît comme une stratégie payante pour le traitement de tumeurs malignes. Dans plusieurs cas de cancer, l'induction de syndrome paranéoplasique est corrélée avec un meilleur pronostique. Au plus fort

apparaît la réponse auto-immune au plus efficace semble la thérapie anti-cancéreuse.[560] C'est en tout cas ce que semble indiquer certaines études sur des patients avec un mélanome ou un cancer rénale.[561,562]

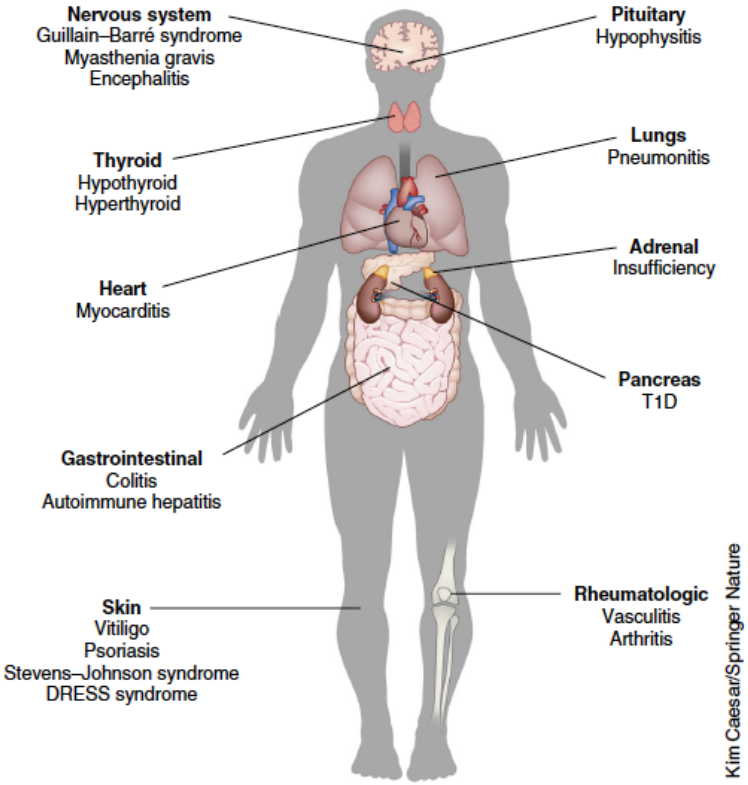


Figure 25 : Les potentiels syndromes auto-immuns paranéoplasiques.[556] Pour chaque organe sont listées les potentielles maladies auto-immunes auxquelles correspondent les syndromes paranéoplasiques que peuvent développer les patients atteints d'un cancer. T1D : diabète de type 1

Risque de cancer et auto-immunité

Un exemple est particulièrement frappant et concerne le mélanome. Chez plus de 5000 patients traités avec des immunothérapies (ex. traitements immunostimulants, vaccins, anticorps, transferts adoptifs de lymphocytes), l'incidence du vitiligo était supérieure à la population saine. Les patients qui développaient ce syndrome avaient un pronostic significativement amélioré. (***Figure 26***) L'induction d'une forte tolérance dans l'environnement de la tumeur est cruciale pour sa croissance. C'est pourquoi il est envisageable que des patients qui développeraient un syndrome auto-immun paranéoplasique puissent outrepasser la tolérance induite par la tumeur et conduire à une perte de tolérance périphérique. De ce fait une réponse anti-tumorale efficace pourrait être apparentée à une réponse contre du soi.[561]

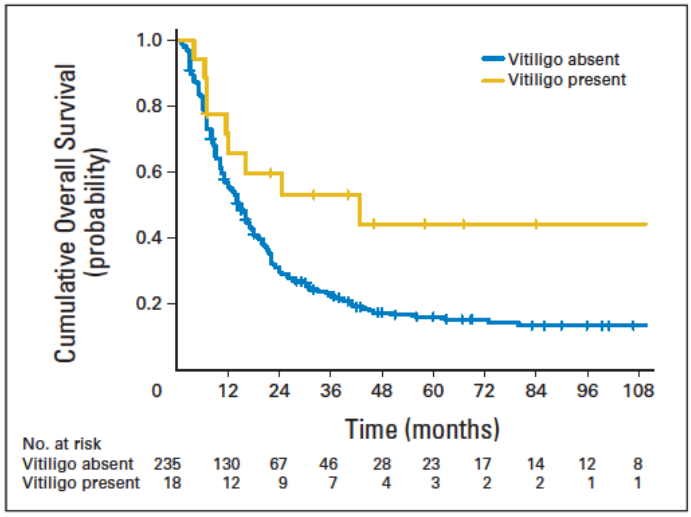


Figure 26 : Les courbes de survie de patients souffrant d'un mélanome, et ayant développé ou non un vitiligo, à la suite d'un traitement par immunothérapies.[561] Les courbes de survie ont indiqué une différence significative sur le pronostic (établies par la méthode de Kaplan-Meier), entre les patients atteints de vitiligo (jaune) et ceux n'ayant pas développé ce syndrome (bleu). (p-value = 0,024)

Pour certaines maladies auto-immunes, l'incidence de cancer est parfois supérieure à celle observée dans la population saine. Cela s'explique notamment par l'induction d'une inflammation chronique généralement associée à l'attaque du tissu. En outre, certains patients sont traités avec des agents antinéoplasiques. Or de nombreuses preuves ont montré que la prise de chimiothérapies est elle-même facteur de risque de développement d'un cancer.[563,564] De plus, un certain nombre de polymorphismes, associés avec l'émergence de maladie auto-immunes, sont également associés avec un risque de cancer augmenté.[548]

A l'opposé, une étude a permis de mettre en évidence chez les patients atteints de vitiligo que le risque de cancer de la peau (mélanome ou non-mélanome) était statistiquement plus faible que dans la population saine. Cela pourrait indiquer un effet protecteur de la pathologie sur l'émergence du cancer de la peau.[565] Le mécanisme suivant peut être imaginé : chez les patients avec un vitiligo, la réponse auto-immune qui cible les mélanocytes sains, empêche l'implantation des mélanocytes transformés, par reconnaissance d'une ou plusieurs mêmes cibles.

A ce jour, très peu d'études épidémiologiques semblent avoir exploré la possibilité d'un rôle protecteur des maladies auto-immunes sur le développement de tumeurs. La diminution du risque de cancer de la peau chez les personnes avec un vitiligo est le premier exemple confirmé. Cela peut notamment s'expliquer de plusieurs façons : le

faible nombre de patients souffrant de certaines maladies auto-immunes reste faible, ce qui peut rendre difficile la réalisation d'études épidémiologiques. Par ailleurs, le vitiligo est une maladie auto-immune très rarement traitée par immunosuppressif ou autres traitements classiques, mais ce n'est pas le cas d'un grand nombre de pathologies auto-immunes. En outre, ces traitements peuvent augmenter le risque de cancers, ce qui pourrait annihiler l'immunosurveillance en place. Finalement, cette protection immunitaire se base sur la reconnaissance d'une ou plusieurs mêmes cibles lors de la réponse auto-immune et l'immunosurveillance. C'est pourquoi ce mécanisme ne peut s'appliquer que dans les cas où le ou les épitopes reconnus par le système immunitaire dans un tissu sain sont également présents dans la masse tumorale. Cependant, rien ne peut garantir cela pour chaque maladie auto-immune et le cancer correspondant à l'organe touché.

L'exemple spécifique de la CBP et du CC

Dans le cas ce la CBP, l'incidence du CC n'est pas décrite dans la littérature et les patients ne semblent jamais développer ce type de cancer. Un seul rapport de cas, en 1998, a décrit l'association de ces deux pathologies.[566] Les auteurs de l'étude précisent d'ailleurs leur étonnement quant au cas de ce patient.

De part cette observation clinique, nous pensons que la CBP est associée à une immunosurveillance contre le CC qui prévient l'émergence de celui-ci. (***Figure 27***)

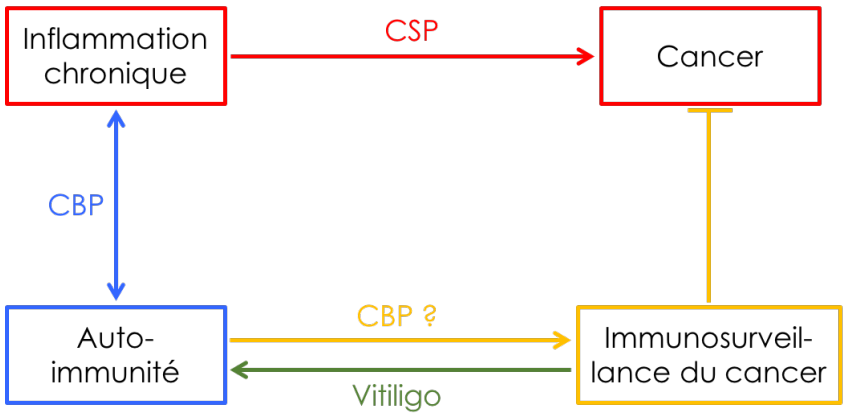


Figure 27 : Potentiel mécanisme d'action empêchant le développement d'un CC chez les patients souffrant de CBP. Chez les patients avec une CSP, l'inflammation chronique augmente le risque d'apparition d'un CC. A l'inverse chez les malades de la CBP, l'auto-immunité pourrait alimenter une forme d'immunosruveillance du CC empêchant l'implantation de tumeur originant de l'arbre biliaire.

Hypothèses et objectifs

Il est maintenant bien connu que dans le cas de très nombreux traitements contre le cancer, y compris certaines chimiothérapies, l'efficacité de ces traitements chez les patients dépend en réalité de l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique et durable.[567] De ce fait, les populations leucocytaires infiltrées dans les tumeurs et la réponse immunitaire anti-tumorale sont devenues des sujets d'étude primordiaux en cancérologie.[568] Dans le cadre précis du cholangiocarcinome, les patients ne bénéficient actuellement pas de prise en charge par immunothérapies (hors essaies cliniques). De plus, l'analyse du stroma tumoral de ces patients semble indiquer que le système immunitaire serait difficile à mobiliser sans d'importantes stimulations et interventions relatives à l'environnement micro-tumoral.[533,569]
Plus récemment, le lien entre efficacité des immunothérapies et développement de syndromes auto-immuns paranéoplasiques a été mis en évidence, notamment chez les patients souffrant d'un mélanome, cancer très largement traité par immunothérapies.[570,571] En outre, la corrélation inverse a été également observée. Les personnes souffrant de vitiligo, une maladie auto-immune de la peau, semblent avoir un risque de développer des cancers de la peau plus faible que la population globale.[572] Une observation similaire semble avoir été faite chez les patients atteints d'une cholangite biliaire primitive (CBP). En effet, chez ces patients présentant une CBP, il n'existe pas de cas de cholangiocarcinome (CC) documentés dans la littérature. Pourtant, l'inflammation chronique est connue pour être un facteur de risque associé avec l'apparition de néoplasies. C'est ce que l'on observe chez les patients atteints de la cholangite sclérosante primitive (CSP), qui est la première étiologie du cholangiocarcinome.[167]

De ces observations, nous avons émis l'hypothèse que l'auto-immunité associée à la CBP pourrait nourrir l'immunosurveillance du CC chez les patients et empêcher son développement.

Les objectifs de nos travaux de recherche ont été de :

- mettre en évidence, dans des modèles murins de cholangites, l'association entre la réponse auto-immune de la CBP et la protection contre le CC.
- comprendre les mécanismes immunitaires impliqués dans l'immunosurveillance du CC lors de la CBP.

Résultats

I. Résumé

Le CC résulte de la transformation maligne des cholangiocytes. La CSP, une maladie inflammatoire chronique des voies biliaires, constitue le facteur de risque épidémiologique le plus important pour le CC. A l'inverse, le CC semble inexistant dans le contexte de la CBP, une cholangite chronique à composante auto-immune affectant les petits canaux biliaires. Lors de cette étude, nous avons questionné l'hypothèse d'une immunosurveillance contre le CC alimentée par la CBP. En transplantant des cellules de CC dans des souris atteintes de CSP ou CBP, nous avons pu observer que la CBP réduisait la fréquence de développement de tumeurs et retardait la cinétique de croissance tumorale. A l'inverse, la CSP n'impactait pas la progression du CC. Ces effets liés à la CBP étaient accompagnés d'une augmentation des lymphocytes de type helper 1 (Th1), Th2, cytotoxique 1 (Tc1) et Tc2 dans le foie, la rate, le CC et le ganglion lymphatique drainant la tumeur. Cette protection est apparue spécifique du CC. En effet, la CBP apportait une protection contre le CC mais pas contre des modèles de carcinome hépatocellulaire, de cancer du poumon ou de fibrosarcome. Les déplétions de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ (seuls ou en combinaison) ou de lymphocytes B, ainsi que la neutralisation de l'IFNγ, cytokine signature de la réponse Th1/Tc1, ont toutes atténué l'effet anti-CC observé lors de la CBP. Dans l'ensemble, ces résultats appuient la possibilité que, des réactions auto-immunes contre un auto-antigène spécifique d'un tissu, contribuent à l'immunosurveillance des cellules malignes de ce même tissu.

II. Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) results from the malignant transformation of cholangiocytes. Primary sclerosing cholangitis (PSC) and primary biliary cholangitis (PBC) are both chronic cholangiopathies, *i.e.* diseases in which cholangiocytes are primarily damaged. Whereas PSC is a well-established inflammatory condition predisposing to CCA, CCA is close-to-never found in the autoimmune context of PBC. Here, we hypothesized that PBC might favor immunosurveillance against CCA. In preclinical murine models of PSC or PBC challenged with syngeneic CCA, PSC did not affect tumor progression whereas PBC reduced the frequency of CCA development and delayed tumor growth kinetics. These PBC-related effects were accompanied by an increase of type-1 T helper (Th1) and cytotoxic (Tc1) lymphocytes in the liver, spleen, CCA tissues and tumor-draining lymph nodes. The protective effect of PBC was specific of CCA in the sense that it was not observed against other cancers including hepatocellular carcinoma. Depletion of $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells (separately or combined), depletion of B cells as well as neutralization of the Th1/Tc1 cytokine interferon-γ attenuated the anti-CCA effect of PBC. Altogether, these results evidence a mechanistic overlapping between autoimmunity and cancer immunosurveillance, with autoimmune reactions against organ-specific self-antigens contributing to the elimination of malignant cells originating from the same tissue.

III. Results

Abbreviations: 2OA-BSA, 2-octynoic acid coupled to bovine serum albumin; CCA, cholangiocarcinoma; HCC, hepatocellular carcinoma; IFN, interferon; IL, interleukin; PBC, primary biliary cholangitis; PDC-E2, pyruvate dehydrogenase complex-E2 subunit; PSC, primary sclerosing cholangitis; Tc, T cytotoxic; Th, T helper.

A. Establishment and comparison of the two models of cholangitis, PBC and PSC

Non-genetic approaches were taken to induce two different types of cholangiopathies, PBC and PSC, in C57Bl/6 mice. PBC was induced by intraperitoneal (*i.p.*) challenge with 2-octynoic acid coupled to bovine serum albumin (2OA-BSA) and intravenous (*i.v.*) injections of α-galactosylceramide (α-GalCer, a potent adjuvant that stimulates natural killer T [NKT] cells) (**Fig. 1A**), following established protocols known to break immune tolerance against the autoantigen PDC-E2.[161,380] PSC was induced by intermittent dietary challenge with 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine (DDC) (**Fig. 1B**), as previously described.[201,573] DDC induces cholestasis by promoting the formation of intraductal porphyrin plugs. Both protocols yielded the expected histological stigmata of PBC and PSC (**Fig. 1C**), with distinctive serological features such as elevation in plasma transaminases in PSC but not PBC (**Fig. 1D**) and the elevation of total IgG levels and anti-PDC-E2 IgM levels in PBC but not PSC (**Fig. 1E, F**). As expected, PBC but not PSC was associated with the induction of PDC-E2-reactive $CD8^+$ and $CD4^+$ T cells, as illustrated by the detection of splenocytes producing IFNγ in response to peptides derived from this autoantigen (**Supplemental Fig. 1**). Transcriptomic analyses of the livers by RNA-seq revealed mostly convergent alterations in the gene expression patterns when PBC and PSC were compared to normal, age- and sex-matched controls (**Fig. 2A, Supplemental Fig. 2**). Gene Ontology (GO) term analyses of the modulated mRNAs revealed a significant enrichment of genes involved in inflammation, immune response and chemotaxis of different leukocyte subsets (**Fig. 2B**). The expression of genes listed under the GO terms “inflammation” and

"neutrophil" was not significantly different (p>0.5, Student t-test) between PBC and PSC (**Fig. 2C,D**). In sharp contrast, genes listed under the GO terms "T cell" and "B cell" were significantly (p<0.05, Student t-test) upregulated in PBC compared to PSC livers (**Fig. 2E,F**).

Altogether these results support the contention that adaptive T and B lymphocyte-mediated immune responses play a quantitatively more important role in PBC than in PSC, in agreement with the literature that considers PBC as an autoimmune disease[105,574] and PSC as a chronic inflammatory disease without a major autoimmune component.[167,168]

B. T cell-dependent control of cholangiocarcinoma in PBC but not PSC hosts

To investigate the possible impact of cholangitis on the immunosurveillance of CCA, we induced PBC and PSC in several cohorts of mice, as described above. One week after the disease induction protocol had been completed, the animals were challenged by subcutaneous (*s.c.*) injection of various transplantable, syngeneic cancer cell lines that were all inoculated at normally tumorigenic doses (**Fig. 3A**). Of note, a CCA cell line grew indistinguishably in control mice and in mice with PSC, yet developed in a delayed fashion in mice with PBC (**Fig. 3B**). This PBC-associated delay in CCA growth was highly significant (p<0.001, mixed-effect model) as compared to control and PSC mice, with some tumors that even failed to develop in several (5 out of 10) cases (**Fig. 3C-D**). In sharp contrast, *s.c.* models of hepatocellular carcinoma (HCC), non-small cell lung cancer (NSCLC) and fibrosarcoma indistinguishably progressed in control conditions and after PBC induction (**Fig. 3E-G**).

Next, we investigated whether adaptive immune responses mediated by T or B lymphocytes account for the CCA-specific tumor-suppressive effects of PBC. For this, we used monoclonal antibodies that deplete T cells (a cocktail of anti-CD4 and anti-CD8) or B cells (anti-CD20) (**Fig. 4A; Supplemental Fig. 3**). We found that T lymphocyte depletion abolished the control of CCA growth provided by PBC while B cell depletion had a partial effect (**Fig. 4B-D**). Both $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells contribute to improved

CCA-specific immunosurveillance, because depletion of either T cell subset alone partially attenuated the CCA-protective effect of PBC (**Fig. 4E-G**). In contrast, the depletion of T or B cells did not affect CCA progression in mice with PSC (**Supplemental Fig. 4**).

Altogether, we conclude that PBC (but not PSC) specifically protects against CCA but not from other antigenically different malignancies through a T cell-dependent (and in a lesser extent B cell-dependent) mechanism.

C. Characteristics of the T cell-mediated anti-CCA immunosurveillance upon PBC

Detailed analysis of the aforementioned RNA-seq dataset indicated that several genes specifically involved in Th1 and Tc1 responses were upregulated in PBC with respect to controls and, in some cases also with respect to PSC. This applies to genes encoding the surface markers CD8a, CD274 (best known as PD-L1), UL16 binding protein 1 (Ulbp1) or interferon-induced transmembrane protein 6 (Ifitm6), the transcription factor suppressor of cytokine signaling 1 (Socs1), and the cytotoxic protease granzyme B (GzmB) (**Fig. 5A**).

Moreover, splenocytes of tumor-free healthy, PBC and PSC mice were cultured for 24 hours in the presence of CCA cells, and T cell reactivity was measured by flow cytometric analyses of the cytokines produced. We found a (non-significant) trend for increased IFNγ production and significant ($p<0.05$, Kruskal-Wallis test with Dunn's pairwise comparisons) elevation of the production/expression of interleukin (IL) 4 and IL17a by $CD4^+$ T lymphocytes in PBC but not in PSC. Additionally, the frequency of cytotoxic (*i.e.* GzmB-expressing) $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells rose in the context of PBC, not in that of PSC, while $CD8^+$ T cells producing IL4 or IL17a were increased in both PBC and PSC (**Fig. 5B-I**).

In CCA tumor-bearing hosts, cytofluorometric analyses of the tumor immune infiltrate revealed a trend toward an increased $CD8^+$ T lymphocyte/regulatory $CD4^+$ T cell (Treg) ratio ($p=0.0617$; **Fig. 6A**) and an improved ratio of conventional $Foxp3^-CD4^+$ T cells over $Foxp3^+CD4^+$ Treg ($p=0.0484$; **Fig. 6B**), though without any changes in the $CD8^+/CD4^+$ T

cells ratio (**Fig. 6C**). No major variations in the total number of T, B or NK cells were detected in either one of cholangitis-related diseases, while a decrease in γδ T lymphocytes, and in a lesser extent in NKT cells, was found in CCA tumors of both PBC and PSC (**Supplemental Fig. 5**).

Considering the limited amount of malignant tissue available in PBC animals due to anti-CCA immunosurveillance, we investigated tumor-infiltrating T cell subtypes by reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Similarly, to the hepatic and lymphoid tissues, we observed a trend for an increased expression of the type-1 cytokine IFNγ and chemokine C-X-C motif ligand 9 (CXCL9), as well as of the type-2 interleukin IL4, inside the CCA tissue of PBC hosts (**Fig. 6D**). In contrast, the level of mRNAs encoding the transcription factors Tbet and Gata3 (involved in Th1/Tc1 and Th2/Tc2 T cell differentiation, respectively) remained unaffected. Regarding the markers of the T follicular helper (Tfh) lineage, the transcriptional repressor B-cell lymphoma 6 (BCL6) showed an upward trend in the CCA microenvironment of mice affected with cholangitis, whereas the CXCL13 / C-X-C motif chemokine receptor 5 (CXCR5) chemotactic axis was not altered (**Fig. 6D**, **Supplemental Fig. 6A,B**). Finally, as opposed to the liver and spleen, key determinants of Th17/Tc17 lymphocyte activity, such as RAR-related orphan receptor γt (RORγt) and IL17a, remained unaffected in CCA tumors of PBC mice as compared to malignant tissues from PSC and control animals (**Supplemental Fig. 6C-F**).

In CCA tumor-draining lymph nodes, the production of IL17a by both $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells was elevated in mice with PBC (but not PSC) (**Fig. 6E, F**), while no major changes in total T lymphocytes, conventional and regulatory $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, total NK, NKT and γδ T lymphocytes have been detected (**Supplemental Fig. 7**). In the blood, the sole significant fluctuation associated with PBC was a trend toward an increase in circulating B cells and double-positive $CD4^+$ $CD8^+$ T cells and a decrease in NKT cells (**Supplemental Fig. 8**).

These results pointed to an active immune response within tumors evolving in the context of PBC. Intrigued by these observations, we decided to investigate the role of IL17a in PBC-induced anti-CCA immunosurveillance, and compared IL17a to IFNγ, which is a well-established contributor to anticancer immune responses.[575–578] Mice in which PBC had been induced received three weekly injections of either an isotype

control antibody or antibodies that neutralize IL17a or IFNγ as they were monitored for CCA growth (**Fig. 7A**). Blockade of IFNγ largely compromised the PBC-associated reduction of tumor growth (**Fig. 7B-D**), while neutralization of IL17a had a minor effect on PBC-induced immunosurveillance (**Fig. 7E-G**).

Altogether these results suggest a major role for IFNγ (and less so for IL17a) in the PBC-associated autoimmunity that confers protection against CCA.

IV. Figures

A. Main figures

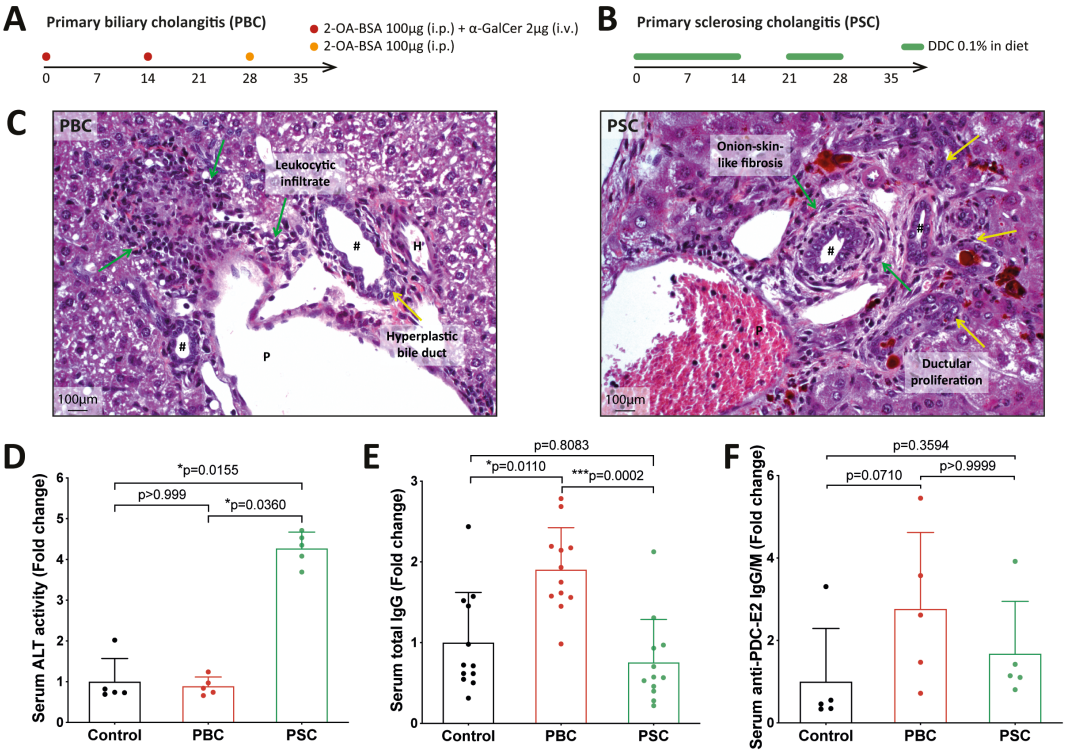


Figure 1. Mouse models of PBC and PSC cholangitis recapitulate the main features of the corresponding human pathologies. A. Experimental schedule of the induction of PBC in C57Bl/6 mice. Mice were injected at days 0 and 14 with 2OA-BSA (*i.p.*) plus α-GalCer (*i.v.*). At day 28, mice received one more dose of 2OA-BSA (*i.p.*). **B.** Experimental schedule of the induction of PSC in C57Bl/6 mice. Mice were fed with a diet containing 0.01% DCC for 2 weeks. Then, after 1 week of recovery on regular food, animals were fed again the DDC-supplemented diet during the 4th week **C.** Paraffin-embedded sections of PBC and PSC mouse livers at day 28 of cholangitis induction, stained with hematoxylin, eosin and safran. # = bile duct, H = hepatic arteria, P = portal vein. On the PBC liver section (left), green arrows indicate some leukocyte infiltrates and the yellow arrow indicates a hyperplastic bile duct. On the PSC liver section (right), green arrows indicate onion skin-like fibrosis and the yellow arrows illustrate ductular reaction. Porphyrin plugs (dark red) are observable. **D.** Relative ALT activity measured in the serum of control, PBC and PSC mice at day 35 of cholangitis induction. **E.** Relative

level of total circulating IgG measured in control, PBC and PSC mice at day 36. **F.** Relative level of IgG and IgM specific of PDC-E2 measured in the serum of control, PBC and PSC mice at day 35. **D-F.** Graphs show individual and mean (± SD) values. *P*-values were calculated by means of the Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons (**p*<0.05, ****p*<0.001). 2OA-BSA, 2-octynoic acid coupled to bovine serum albumin; α-GalCer, α-galactosylceramide; ALT, alanine transaminase; DCC, 3,5-dicarbethoxy-1,4-dihydrocollidine; *i.p.*, intraperitoneally; *i.v.*, intravenously; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis.

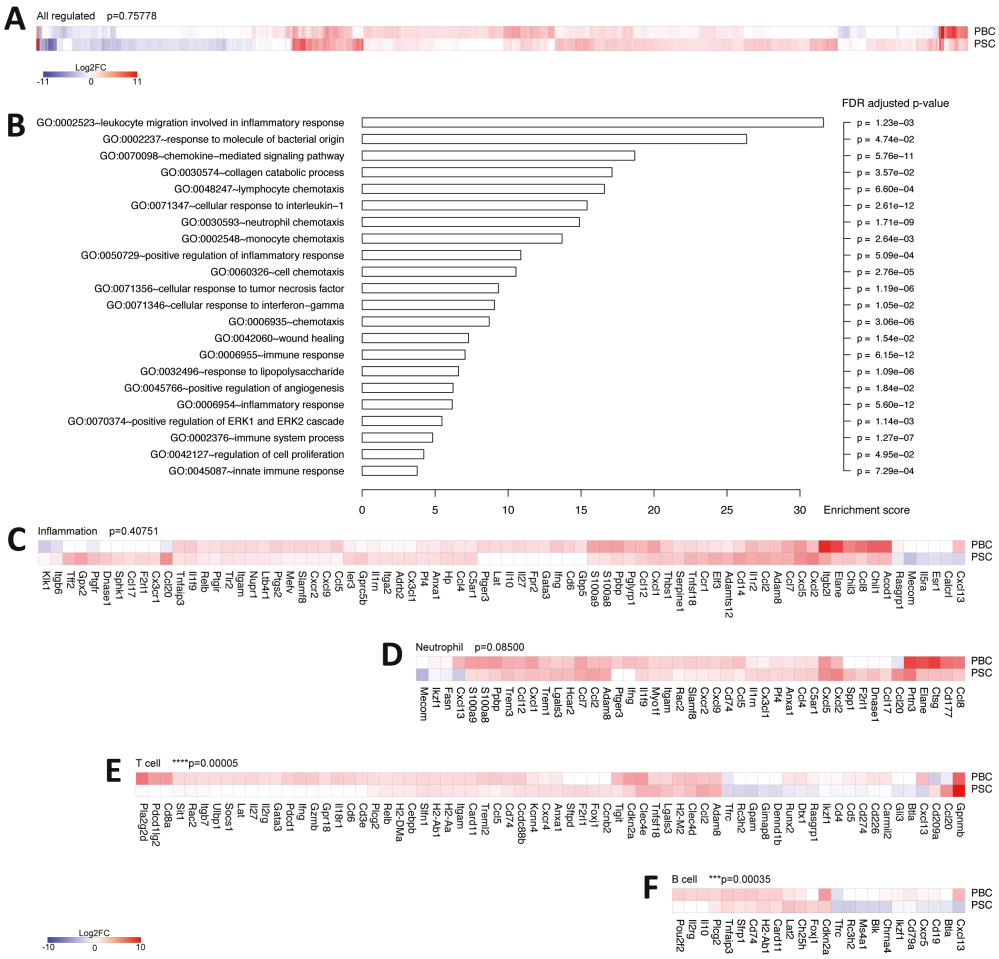


Figure 2. Livers from mice with PBC and PSC feature distinct adaptive immune cell signatures. Following the experimental schedules illustrated in the **Figures 1A-B**, hepatic gene expression was studied by transcriptomic analysis (RNA-Seq) in healthy control (n=4), PBC (n=3) and PSC (n=3) mice at day 35. **A.** Fold change ($\geq \log_2|2|$) of all significantly modulated genes in PBC and PSC livers relative to healthy controls. For detailed heatmap, refer to **supplementary Figure 2**. **B.** GO term enrichment analysis of the genes upregulated in both PBC and PSC livers (genes downregulated were not associated with a specific GO terms enrichment). The bar chart displays the enrichment score of significantly enriched GO terms with their FDR-adjusted *p*-value. **C-F.** Focus on genes whose expression is modulated in PBC and PSC livers as compared to healthy controls and listed under the GO terms "inflammation" **(C)**, "neutrophils" **(D)**, "T cells" **(E),** and "B cells" **(F)**. *P*-values of the comparison between PBC and PSC profiles are indicated (paired Student t-test; ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$). FC, fold change; FDR, false discovery rate; GO, gene ontology; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis.

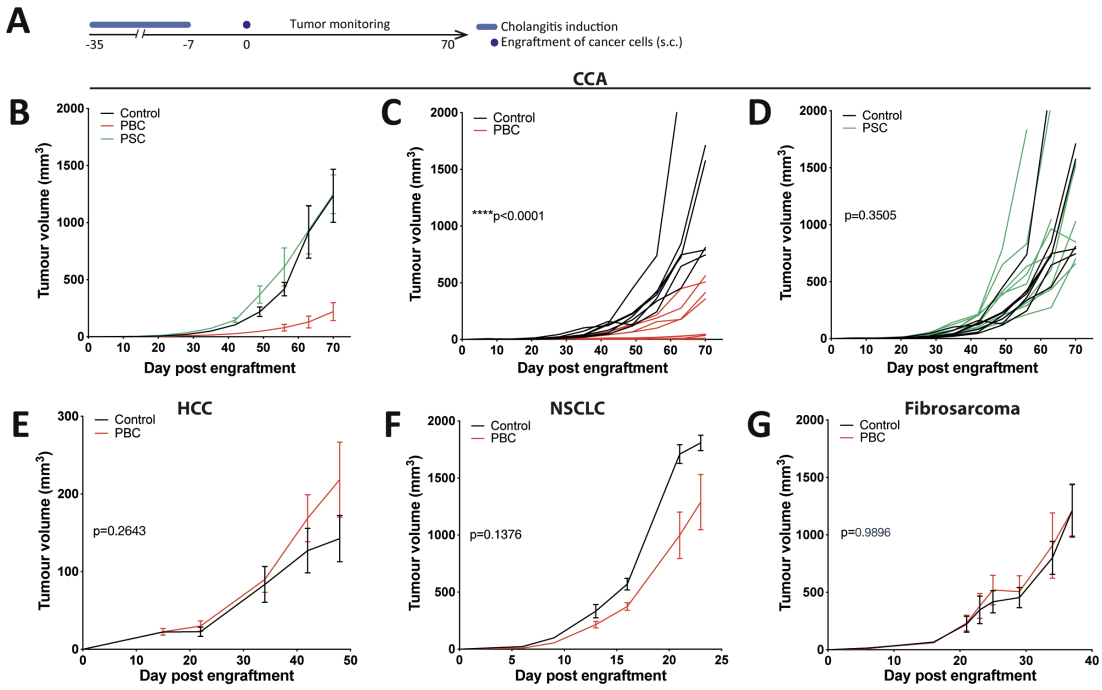


Figure 3. PBC but not PSC mediates specific control of cholangiocarcinoma outgrowth. A. Experimental schedule in C57Bl/6 mice. One week after the end of cholangitis induction (see **Fig. 1A-B**), syngeneic cancer cells were engrafted through *s.c.* injection and tumor growth followed-up. **B-D.** Tumor growth of CCA tumors in control, PBC and PSC mice. Growth of HCC **(E)**, NSCLC **(F)** and fibrosarcoma **(G)** tumors in control, PBC and PSC mice. Graphs show mean (± SEM) **(B, E-G)** or individual **(C-D)** tumor growth curves. *P*-values were calculated by means of a linear mixed-effects model in comparison to control group (****$p<0.0001$). HCC, hepatocellular carcinoma; NSCLC, non-small-cell lung carcinoma; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; *s.c.* subcutaneous.

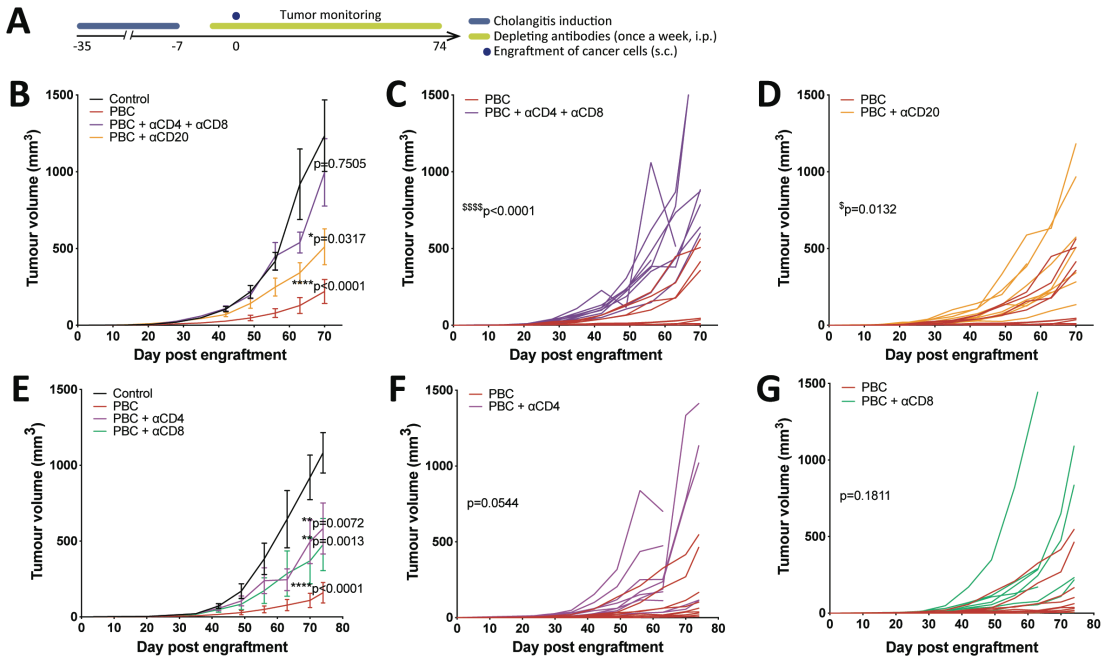


Figure 4. PBC-mediated protection against cholangiocarcinoma relies on T lymphocytes. A. Experimental schedule in C57Bl/6 mice. One week after the end of cholangitis induction (see **Fig. 1A-B**), mice were engrafted *s.c.* with syngeneic CCA cells (day 0). At days -2/-3 and +1, mice were injected *i.p.* with depleting antibodies targeting either CD20, CD4 and/or CD8. These injections were repeated once a week. **B-G.** Mean (± SEM) **(B, E)** or individual **(C-D, F-G)** growth curves of CCA tumors in control or PBC mice, or PBC mice selectively depleted of $CD4^+$ and/or $CD8^+$ T lymphocytes or $CD20^+$ B cells. *P*-values were calculated by means of linear mixed-effects model in comparison to control group **(B, E)** or PBC group **(C-D, F-G)**. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ****$p<0.0001$ compared to control group; $^{\$}p<0.05$, $^{\$\$\$\$}p<0.0001$ compared to PBC group. CCA, cholangiocarcinoma; *i.p.*, intraperitoneally; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; *s.c.*, subcutaneously.

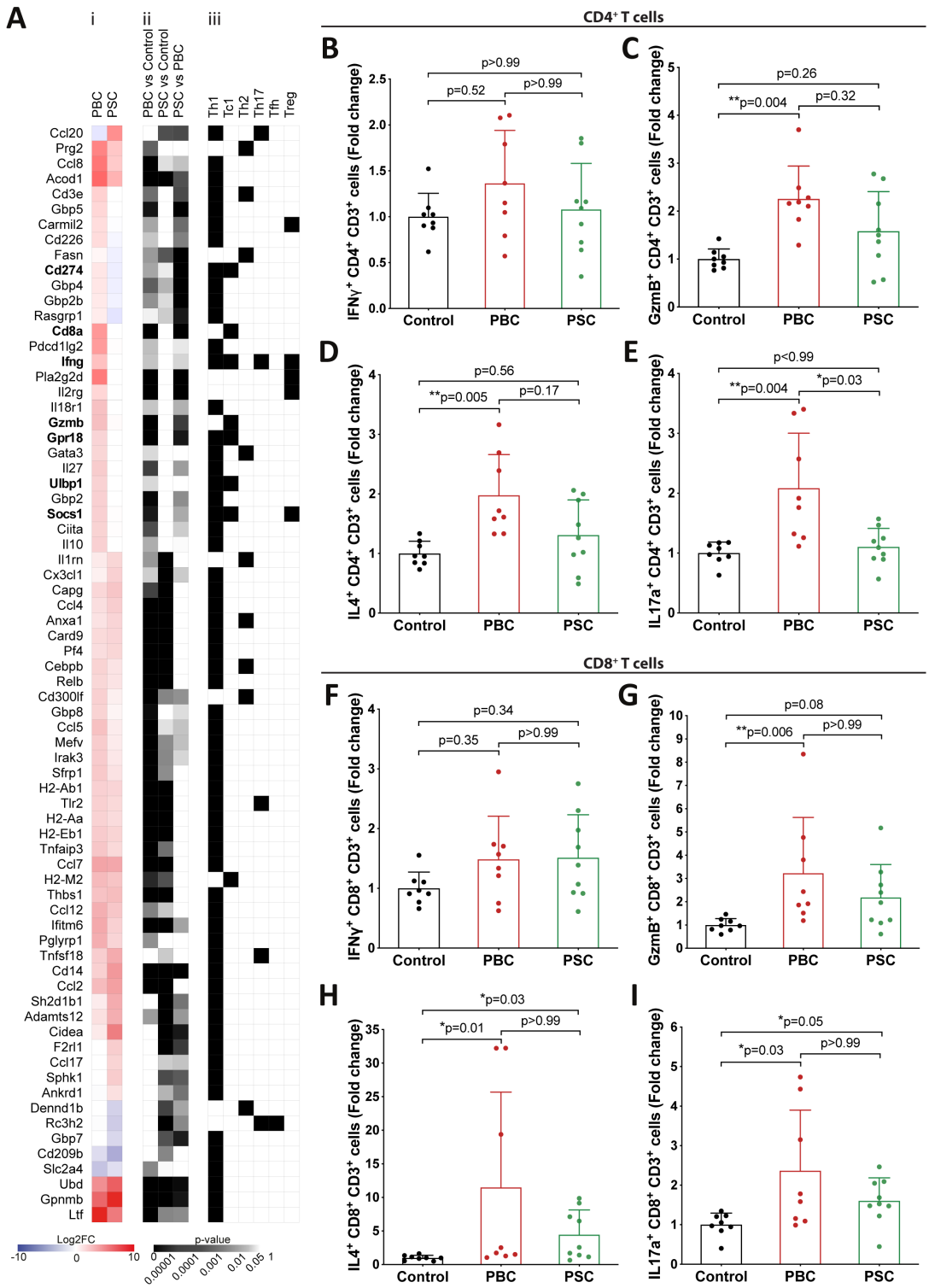


Figure 5. Hepatic T cell immune infiltrate and splenic reactivity against CCA in tumor-free PBC mice. Following the experimental schedules illustrated in the **Figures 1A-B**, gene expression was studied by transcriptomic analysis (RNA-Seq) in liver samples of healthy control, PBC and PSC mice at day 35 **(A),** and cytokine production by T lymphocytes was analyzed by flow cytometry at day 33 following a 24-hour co-culture

of splenocytes with CCA cells **(B-I)**. **A.** List of genes significantly modulated between the liver of PBC, PSC and control mice, and tagged with GO terms affiliated to T cell polarization. **(A.i)** The heatmap shows the fold change ($\geq \log_2|2|$) of gene expression in PBC and PSC livers relative to healthy controls. Genes involved in Tc1 response and upregulated in PBC mice versus healthy and PSC animals are written in bold. **(A.ii)** The p-value of each pairwise comparison is illustrated. **(A.iii)** Involvement of each gene in T cell polarization based on related GO terms referring to Th1, Tc1, Th2, Th17, Tfh and/or Treg responses. **B-I.** Relative counts of $CD4^+$ T cells **(B-E)** and $CD8^+$ T cells **(F-I)** producing the Th1/Tc1 factors IFNγ and GzmB, or the type-2 and type-17 cytokines IL4 and IL17a, respectively. Graphs show individual (dots) and mean (± SD) values. *P*-values were calculated following a Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons (**p*<0.05, ***p*<0.01). CCA, cholangiocarcinoma; FC, fold change; GzmB, granzyme B; GO, gene ontology; IFNγ, interferon-γ; IL4, interleukin-4; IL17a, interleukin-17a; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; Tfh, T follicular helper; Th1, T helper 1; Tc1, T cytotoxic 1; Th2, T helper 2; Th17, T helper 17; Treg, regulatory T lymphocyte.

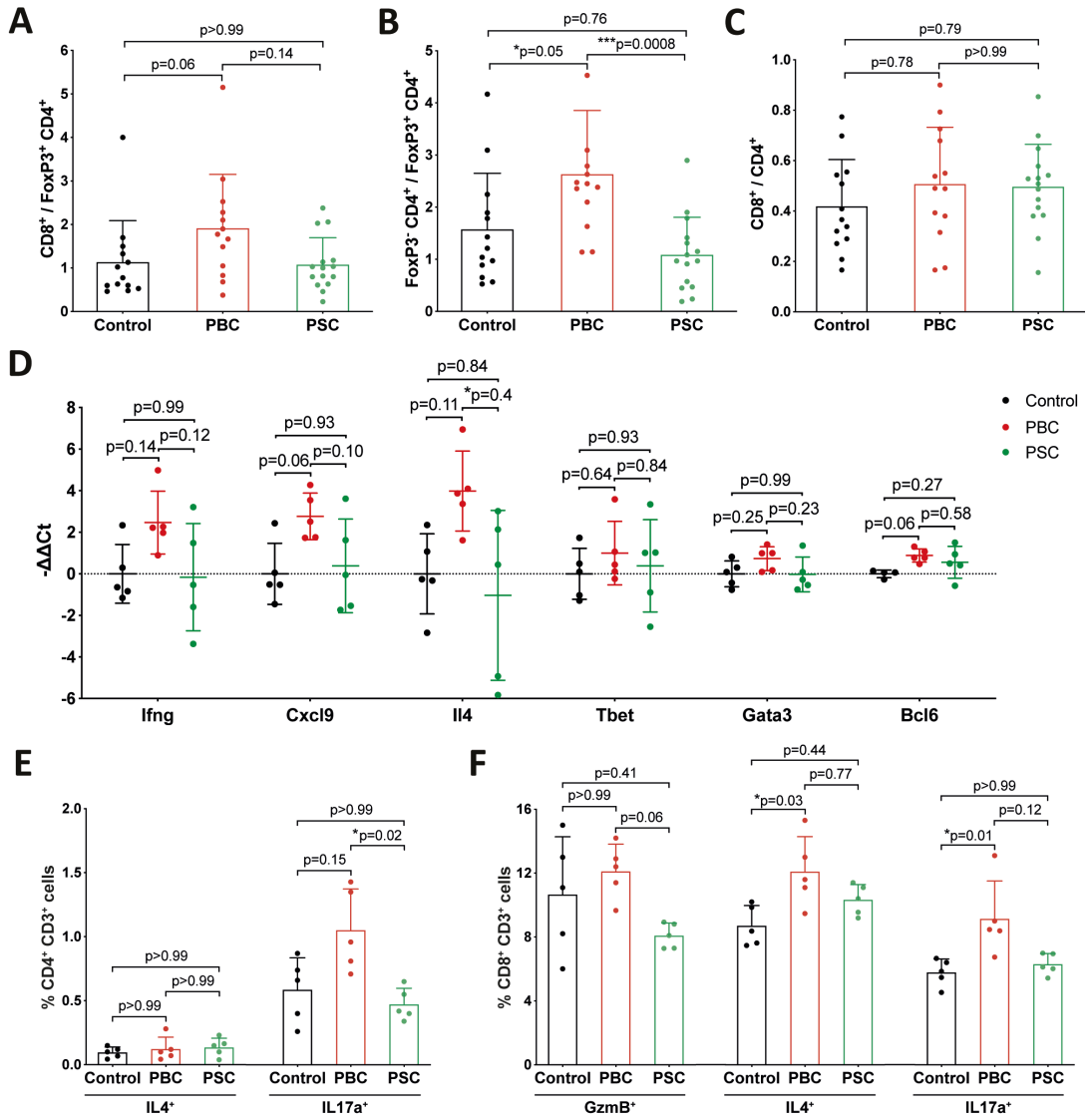


Figure 6. PBC affects T lymphocyte cell subsets infiltrating CCA tumors and their draining lymph nodes. Following the experimental schedule illustrated in the **Figure 3A**, CCA tumors **(A-D)** and their draining lymph nodes **(E, F)** were collected from control, PBC and PSC mice at day 56/60 post-CCA engraftment. T cell subsets were analyzed by flow cytometry **(A-C)** or gene expression measurements by RT-qPCR **(D).** Cytokine production by lymphocytes of tumor-draining lymph nodes was analyzed by flow cytometry after a 24-hour restimulation with anti-CD3 and anti-CD28-coated beads **(E, F)**. Ratios of $CD8^+$ T cells **(A)** or $FoxP3^-$ $CD4^+$ T cells **(B)** over $FoxP3^+$ $CD4^+$ Treg, and of $CD8^+$ T cells over total $CD4^+$ T cells **(C)** within CCA tumors. **(D)** Relative expression of several cytokines and transcription factors related to Th1/Tc1 (IFNγ, Tbet), Th2/Tc2 (IL4, Gata3) and Tfh (Bcl6) immune responses within CCA tumors. Frequencies of $CD4^+$ T cells **(E)** and $CD8^+$ T cells **(F)** producing the effector cytokines IL4

or IL17a, or the cytotoxic protease GzmB, in CCA tumor-draining lymph nodes. Graphs show individual and mean (± SD) values. *P*-values were calculated by means of the Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons **(A-C, E, F)** or one-way ANOVA with Tukey's pairwise multiple comparisons **(D)**. *$p<0.05$, ***$p<0.001$. BCL6, B-cell lymphoma 6 protein; CCA, cholangiocarcinoma; CXCL9, C-X-C motif chemokine ligand 9; GATA3, GATA Binding Protein 3; GzmB, granzyme B; IFNγ, interferon-γ; IL4, interleukin-4; IL17a, interleukin-17a; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; TBET, T-box transcription factor TBX21; Tc1, type-1 T cytotoxic; Tc2, type-2 T cytotoxic; Tfh, T follicular helper; Th1, type-1 T helper; Th2, type-2 T helper; Treg, regulatory T cell.

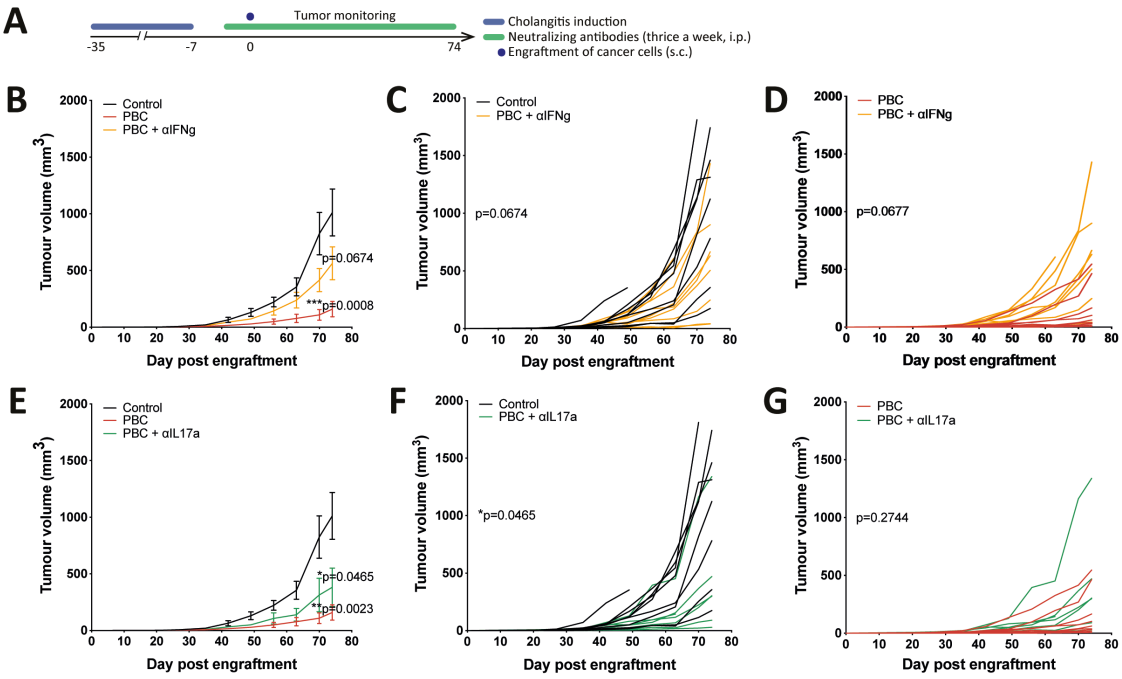
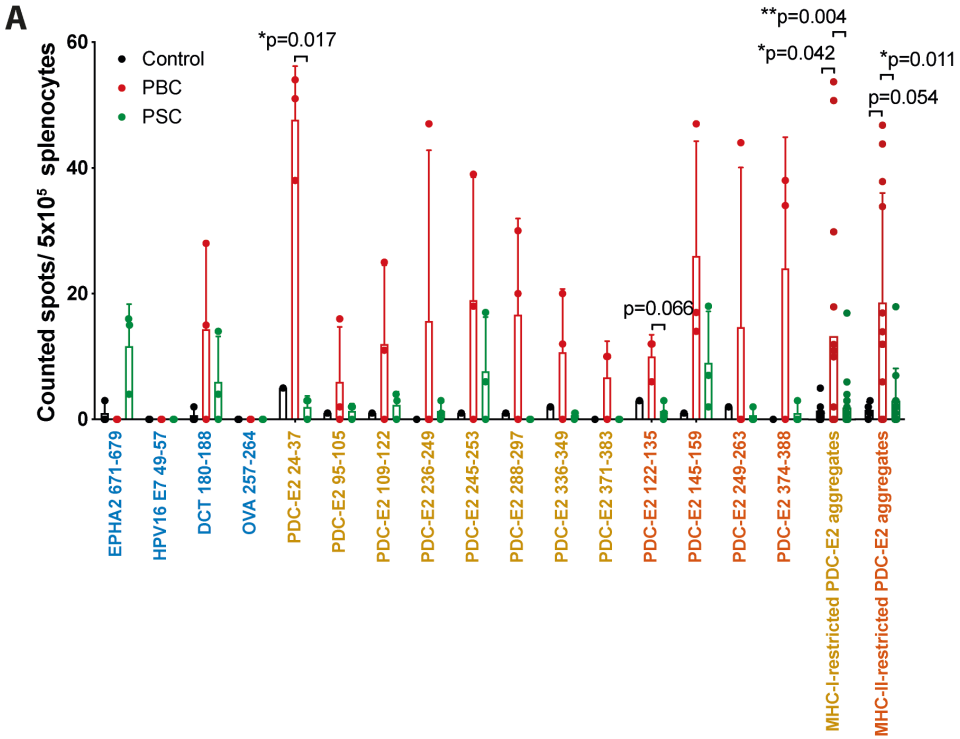


Figure 7. PBC-mediated protection against cholangiocarcinoma requires IFNγ but not IL17a. A. Experimental schedule in C57Bl/6 mice. One week after the end of cholangitis induction (see experimental schedule in the **Figure 1A**), syngeneic CCA cells were engrafted into PBC mice (day 0). At day -1, +1, +3 and then thrice a week until the end of the experiment, mice were injected with blocking antibodies targeting either IFNγ or IL17a. **B-G.** CCA tumor growth in control or PBC mice, or PBC mice injecting with neutralizing antibodies targeting either IFNγ or IL17a. Graphs show mean ± SEM **(B, E)** and individual **(C, D, F, G)** tumor growth curves. *P*-values were calculated by means of linear mixed-effects model. Significant comparisons to control group are indicated as follows: **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 **(B-C, E-F)**. CCA, cholangiocarcinoma; IFNγ, interferon γ; IL17a, interleukin-17a; *i.p.*, intraperitoneal; PBC, primary biliary cholangitis; *s.c.*, subcutaneous.

B. Supplemental figures



B

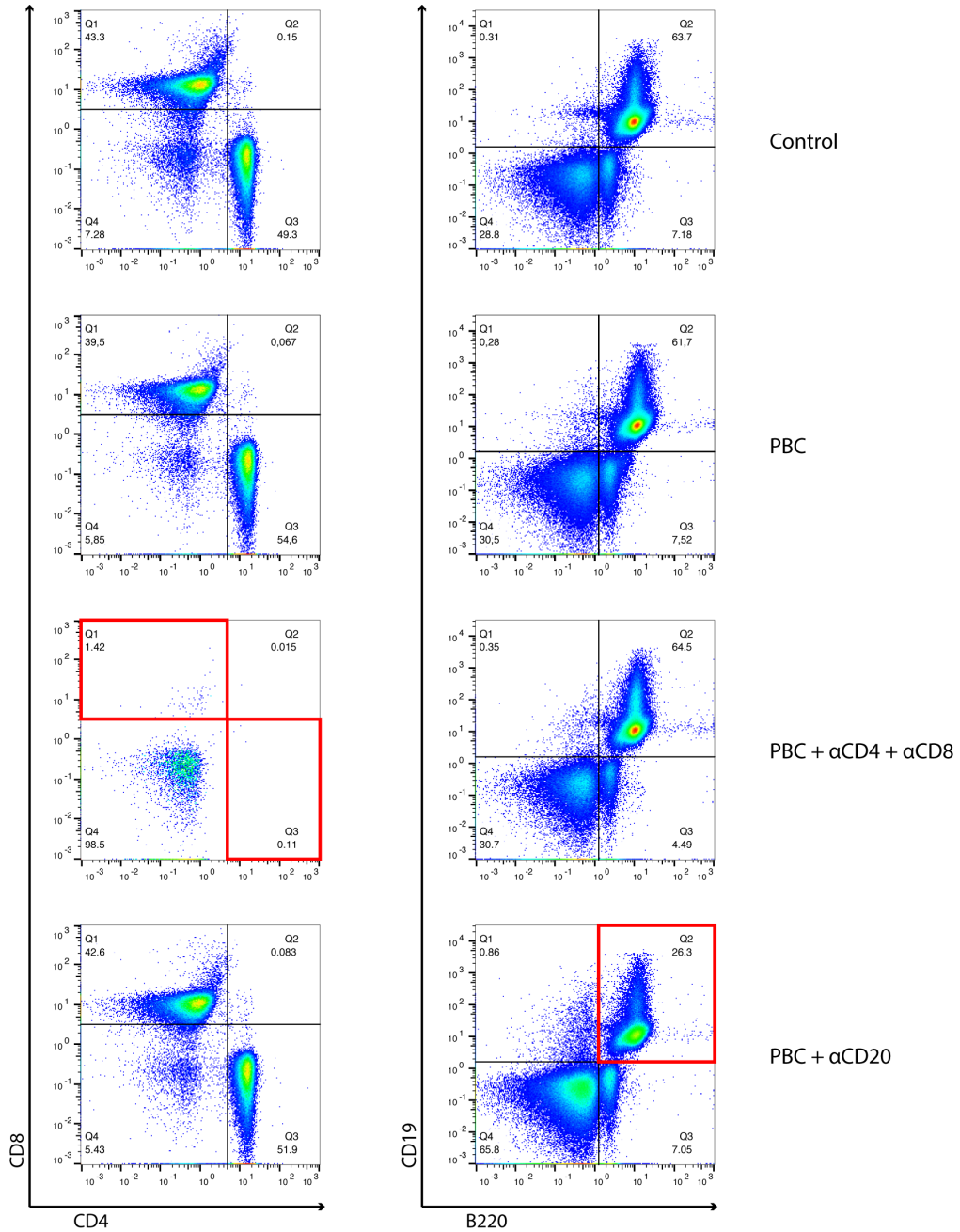
Name	Cancer cell origin/references	Peptide	MHC restriction
CCA-irrelevant antigens			
EphA2 671-679	MCA 205 cell (sarcoma)	FSHHNIIRL	MHC-I
HPV16 E7 49-57	TC-1 cells (NSCLC)	RAHYNIVTF	MHC-I
DCT 180-188	B16-F10 (Melanoma)	SVYDFFVWL	MHC-I
OVA 257-264	/	SIINFEKL	MHC-I
MHC-I restricted PDC-E2 peptides			
PDC-E2 24-37	IEDB Analysis Resource	ALKEGPGAPCGSPR	MHC-I
PDC-E2 95-105	IEDB Analysis Resource	LPSLSPTMQAG	MHC-I
PDC-E2 109-122	IEDB Analysis Resource	RWEKKEGEKISEGD	MHC-I
PDC-E2 236-249	IEDB Analysis Resource	RWEKKVGEKLSEGD	MHC-I
PDC-E2 245-253	PMID: 11786955	KLSEGDLLA	MHC-I
PDC-E2 288-297	IEDB Analysis Resource	PLCIIVEKQE	MHC-I
PDC-E2 336-349	IEDB Analysis Resource	APTPSAAPAGPKGR	MHC-I
PDC-E2 371-383	IEDB Analysis Resource	KGTGPEGRIIKKD	MHC-I
MHC-II restricted PDC-E2 peptides			
PDC-E2 122-135	IEDB Analysis Resource	GDLIAEVETDKATV	MHC-II
PDC-E2 145-159	IEDB Analysis Resource, PMID: 23543758	MAKILVPEGTRDVPV	MHC-II
PDC-E2 249-263	PMID: 23543758, PMID: 11786955, PMID: 9819369	GDLLAEIETDKATIG	MHC-II
PDC-E2 374-388	IEDB Analysis Resource	GPEGRIIKKDIDSFV	MHC-II

Supplemental Figure 1. PBC mice exhibit a weak reactivity to PDC-E2. A. Number of T cells from healthy control, PBC and PSC mice reactive to CCA-irrelevant antigens, PDC-E2 peptides or aggregates of either all MHC-I or all MHC-II-restricted PDC-E2 peptides. Following the experimental schedules illustrated in the **Figures 1A-B**, splenocytes were harvested at day 32/33, and incubated with the indicated peptides for 24h. Then, the number of IFNγ-producing cells was counted by ELISPOT. Graph shows individual and mean (± SD) values. Of note, the number of spots displayed is deduced of the mean number of spots counted

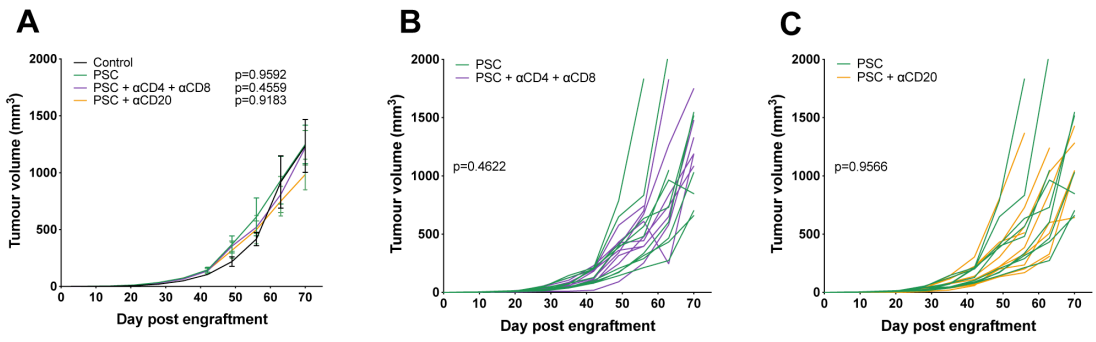
in the unstimulated wells (*data not shown*). *P*-values were calculated using the two-way repeated measure ANOVA with Greenhouse–Geisser correction and with Tukey's pairwise multiple comparison (**p*<0.05, ***p*<0.01). **B.** List of known non-CCA tumor antigens from several C57Bl/6 mouse cancer models, and selected mouse PDC-E2 peptides predicted from the literature (analogous to human epitopes that match the mouse protein) and the IEDB Analysis Resource tool for T cell epitope prediction regarding their ability of binding C57Bl/6 MHC class I and II. PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; Unstim, unstimulated condition; PDC-E2, pyruvate dehydrogenase complex subunit E2; EPHA2, EPH receptor A2; HPV16 E7, human papillomavirus type 16 protein E7; DCT, dopachrome tautomerase; OVA, ovalbumin; IFNγ, interferon γ; MHC, major histocompatibility complex.

Heatmap en format étendu en Annexe

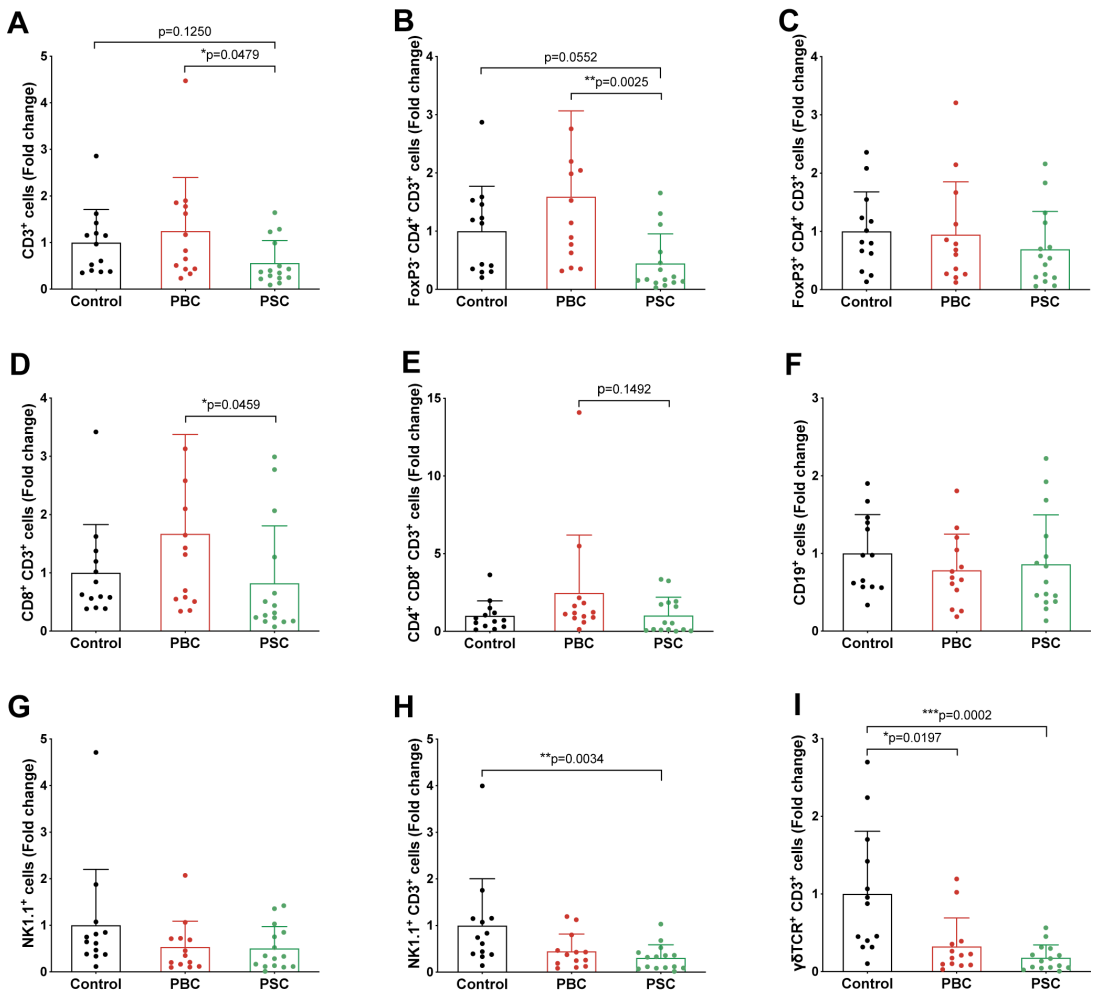
Supplemental Figure 2. Overall profile of differentially expressed genes in the liver of mice affected with PBC and PSC. Following the experimental schedules illustrated in the **Figures 1A-B**, hepatic gene expression was studied by transcriptomic analysis (RNA-Seq). The heatmap shows mean and individual expression levels of all genes significantly modulated between control, PBC and PSC livers. PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis.



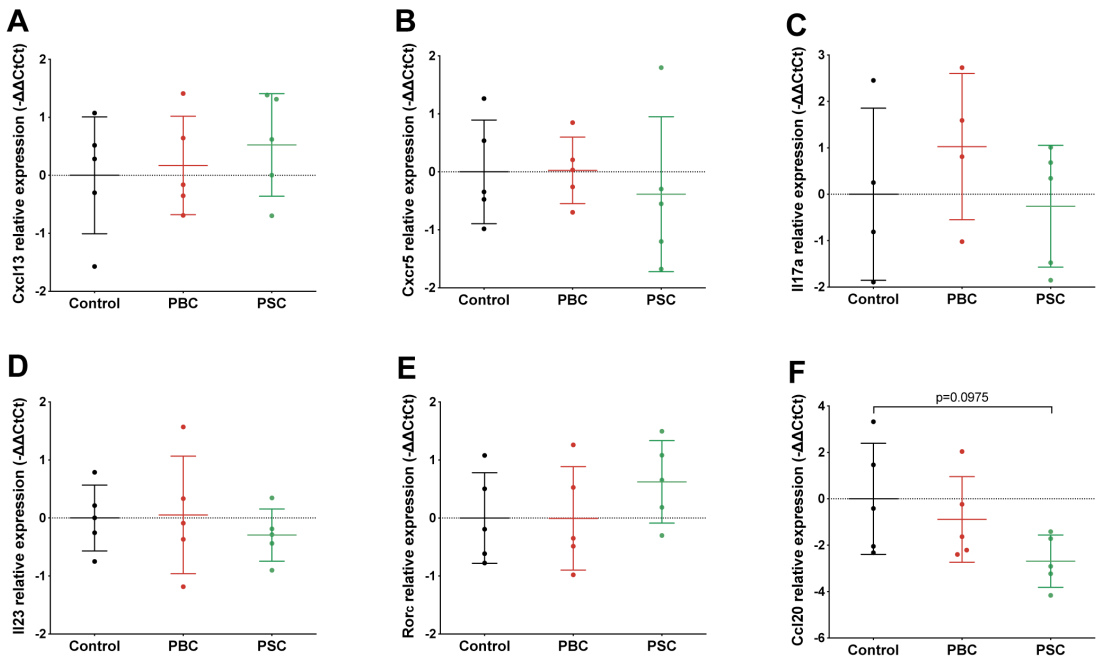
Supplemental Figure 3. Validation of T and B cells depletion *in vivo*. Flow cytometry plots of peripheral blood cells from control mice or PBC mice injected with anti-CD4/CD8 or anti-CD20 to deplete either $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells or B cells, respectively. Following the experimental schedule illustrated in the **Figure 4A**, PBC mice were repeatedly injected with the depleting antibodies. After the 4th injection of antibodies, blood was drawn for quantification of $CD4^+$ and $CD8^+$ T ($CD3^+$ $CD4^+$ or $CD3^+$ $CD8^+$) and B ($CD19^+$ $B220^+$) lymphocytes. Quadrants surrounded in red confirm a 98, 97 and 60% reduction of these cell subsets in comparison to healthy controls, respectively. PBC, primary biliary cholangitis.



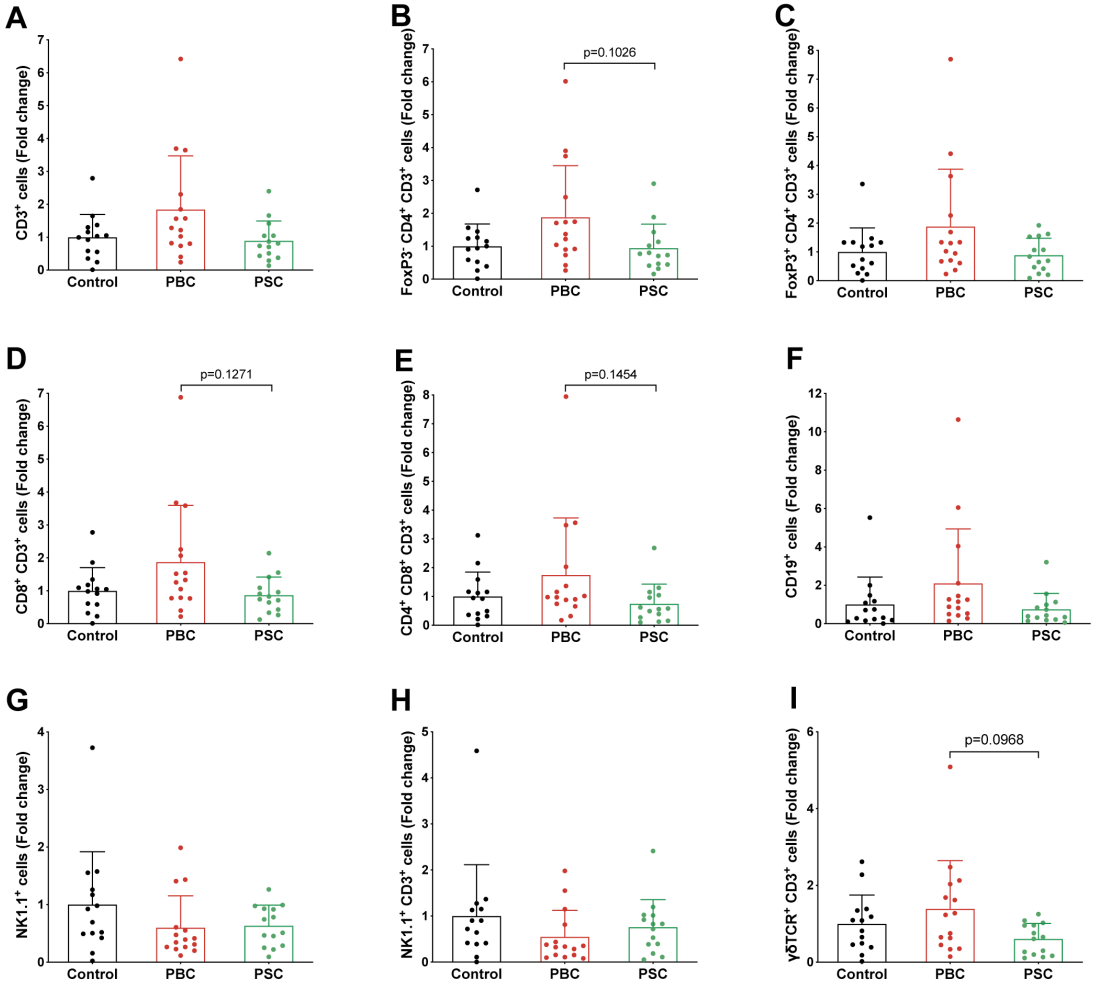
Supplemental Figure 4. Depletion of either T cells or B cells in PSC mice does not impact cholangiocarcinoma outgrowth. Mean (± SEM) **(A)** or individual **(B, C)** growth curves of CCA in control or PSC mice, or PSC mice depleted of T or B lymphocytes, following *i.p.* injections of depleting antibodies targeting either CD4 plus CD8 or CD20, respectively (see experimental schedule illustrated in **Fig. 4A**). CCA, cholangiocarcinoma; *i.p.*, intraperitoneal; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis.



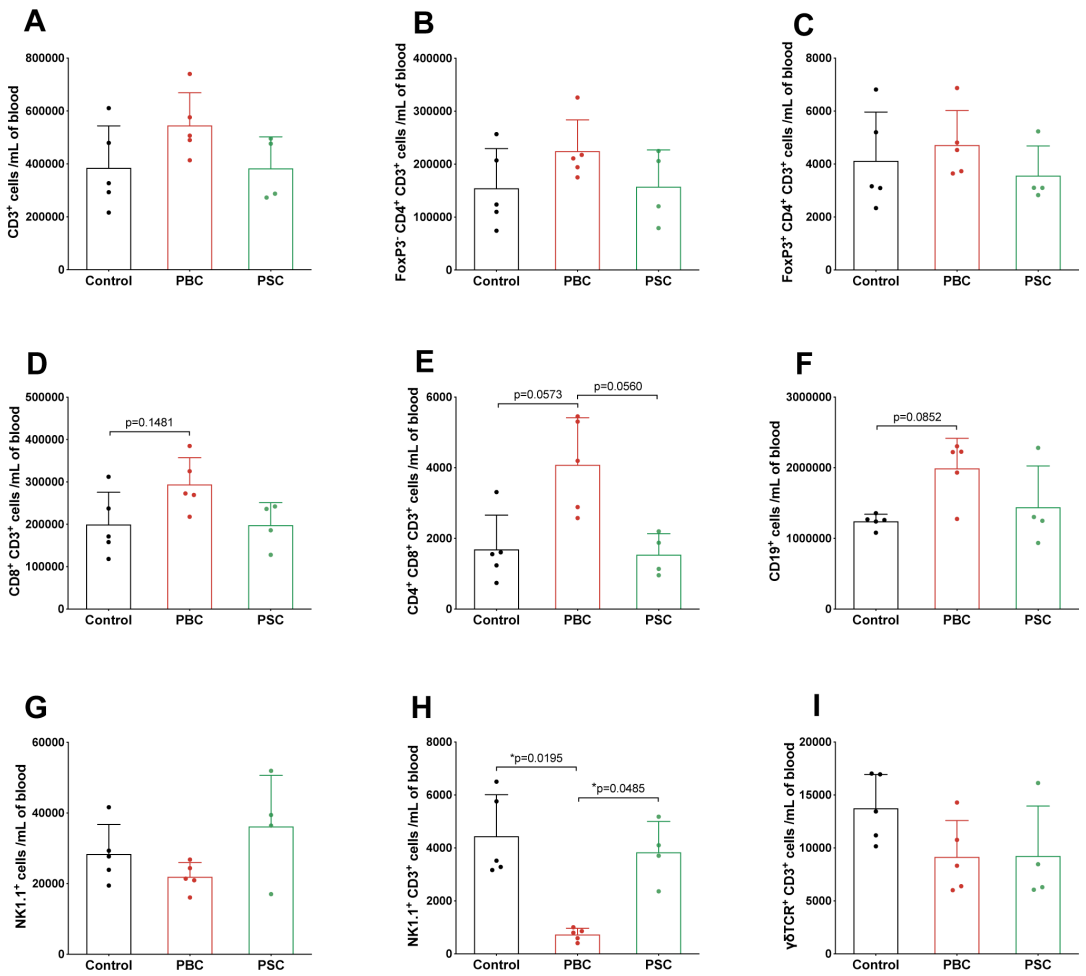
Supplemental Figure 5. Lymphocyte cell subsets infiltrated in CCA tumors of PBC, PSC and normal mice. Following the experimental schedule illustrated in the **Figure 3A**, CCA tumors from control, PBC and PSC mice were resected at day 56/60 post-engraftment and lymphocyte cell subsets measured by flow cytometric analysis. Graphs show individual and mean (± SD) relative counts of total T lymphocytes **(A)**, conventional **(B)** and regulatory **(C)** $CD4^+$ T cell, $CD8^+$ T cell **(D)** and $CD4^+$ $CD8^+$ double-positive T cell **(E)** subsets, total B cells **(F),** NK **(G)**, NKT **(H)** and γδ T **(I)** lymphocytes. *P*-values were calculated by means of Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001). PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; CCA, cholangiocarcinoma; TCR, T cell receptor.



Supplemental Figure 6. Immune-related gene expression within CCA tumors. Following the experimental schedule illustrated in **Figure 3A**, CCA tumors of control, PBC and PSC mice were resected at day 56 post-engraftment for gene expression measurement by RT-qPCR. Graphs show individual and mean (± SD) relative expression of several cytokines and transcription factors related to Tfh **(A-B)** and Th17/Tc17 **(C-F)** immune cell activity within CCA tumors. CCA, cholangiocarcinoma; Ccl20, C-C motif chemokine ligand 20; Cxcl13, C-X-C motif chemokine ligand 13; Cxcr5, C-X-C motif chemokine receptor 5; Il17a, interleukin 17a; Il23, interleukin 23; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; Rorc; RAR-related orphan receptor C; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; Tc17, T cytotoxic 17; Tfh, T follicular helper; Th17, T helper 17.



Supplemental Figure 7. Lymphoid cell subsets within CCA tumor-draining lymph nodes. Following the experimental schedule illustrated in the **Figure 3A**, tumor-draining lymph nodes from control, PBC and PSC mice were collected at day 56 post-CCA engraftment for flow cytometric analysis of the lymphoid cell subset content. Relative counts of total T lymphocytes **(A)**, conventional **(B)** and regulatory **(C)** $CD4^+$ T cell, $CD8^+$ T cell **(D)** and $CD4^+$ $CD8^+$ double-positive T cell **(E)** subsets, total B cells **(F),** NK **(G)**, NKT **(H)** and γδ T **(I)** lymphocytes. Graphs show individual and mean (± SD) values. *P*-values were determined by the Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons. CCA, cholangiocarcinoma; NK, natural killer; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; TCR, T cell receptor.



Supplemental Figure 8. Lymphocyte cell subsets in the blood of CCA-bearing mice. Following the experimental schedule illustrated in the **Figure 3A**, blood was drawn at day 56 post CCA engraftment from control, PBC and PSC mice for flow cytometry-assisted analysis of lymphocyte cell subsets. Absolute counts (per mL blood) of total T lymphocytes **(A)**, conventional **(B)** and regulatory **(C)** $CD4^+$ T cell, $CD8^+$ T cell **(D)** and $CD4^+$ $CD8^+$ double-positive T cell **(E)** subsets, total B cells **(F),** NK **(G)**, NKT **(H)** and γδ T **(I)** lymphocytes. Graphs show individual and mean (± SD) values. *P*-values were calculated using the Kruskal–Wallis H test with Dunn's pairwise multiple comparisons (*$p<0.05$). CCA, cholangiocarcinoma; NK, natural killer; PBC, primary biliary cholangitis; PSC, primary sclerosing cholangitis; TCR, T cell receptor.

V. Materials and methods

Mouse strains and accommodation

Six- to eight-week-old female C57Bl/6 mice were purchased from Envigo France. Animals were maintained in a temperature-controlled and specific pathogen-free environment, respecting cycles of 12 hours of light and 12 hours of darkness, and fed *ad libitum* with the SAFE A04 diet (SAFE™) together with free access to water. Experiments were performed in compliance with the EU Directive 63/2010 and the protocol #8125–2016120818255662v1 approved by the Charles Darwin ethics committee for animal experimentation.

Cell lines and culture

The murine cell lines M1-1a and M1-1a-JP4 (CCA), MCA205 (fibrosarcoma), TC-1 (non-small cell lung carcinoma) and Hep-55.1C (hepatoma; purchased from CLS - Cell Lines Service GmbH), all syngeneic in C57Bl/6 mice, were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) of fetal bovine serum (FBS) and 100 IU/ml of penicillin G and 100 mg/ml streptomycin (P/S) under standard culture conditions (37°C, 5% CO_2, >90% humidity).

Derivation of the M1-1a-JP4 cell line from a CCA tumor of M1-1a. The mouse CCA cell line M1-1a was a kind gift from Pr. Gores's laboratory.[221,227] In vivo derivation was performed as follows: 2 x10^6 of M1-1a cells were resuspended in 100 µL of PBS (phosphate-buffered saline) and injected subcutaneously (*s.c.*) in the right flank of mice anesthetized with 2.5% isoflurane. Eighty-one days after CCA cell engraftment, the largest tumor was harvested and dissociated under sterile condition for further *in vitro* cell culture. Cells were cultured *in vitro* for several days in DMEM supplemented with FBS and P/S. After 3 passages, to get rid of the fibroblasts, the bulk cells were stained with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD115 APC (clone AFS98, Thermo Fisher Scientific) and anti-CD45 APC-Cy7 (clone 30-F11, BD Biosciences). Double-negative cells were single-cell sorted by flow cytometry, then expanded. One clone, *i.e.* M1-1a-JP4, was selected for both its morphologic similarity with the parental cell line and its ability to grow faster than the latter *in vitro*. The M1-

1a-JP4 was used as the C57Bl/6 syngeneic CCA cell line for all *in vivo* experiments of the present study.

In vivo - Cholangitis mouse models

Primary biliary cholangitis model (PBC). PBC was induced in C57Bl/6 mice as described before.[161,165] Mice were immunized with 100µg of 2-octynoic acid BSA conjugate (2OA-BSA) intraperitoneally (*i.p.*) in a mix of PBS and complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich) at day 0 and were reboosted at days 14 and 28 with 2OA-BSA and incomplete Freund's Adjuvant (IFA, Sigma Aldrich). Concomitantly with the two first injections of 2OA-BSA, mice were also injected intravenously (*i.v.*) with 2µg of α-galactosylceramide (α-GalCer, Abcam) in PBS **(Fig. 1A)**.

Primary sclerosing cholangitis model (PSC). PSC was induced likewise as previously published in C57Bl/6 mice.[201,573] They were fed the SAFE A04 diet (SAFE™) containing 0.089%, in weight, of 3,5-diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine (DDC, Sigma Aldrich) for 2 weeks (from day 0 to 14). After one week of recovery with the regular diet, mice were fed again with the DDC-supplemented diet for one more week (from day 21 to 28; **Fig. 1B)**.

Ex vivo - Serum analysis

Approximately 100µL of blood were drawn from mice at day 35/36 after cholangitis induction started. After blood clotting and centrifugation, serum was collected for further analysis. *Alanine aminotransferase (ALT) activity.* ALT enzymatic activity was measured by an ALT activity assay (Sigma Aldrich) in 10µL of mouse serum according to the supplier's instructions. *Circulating immunoglobulin G (IgG) concentration.* IgG concentration in serum was measured by a mouse IgG ELISA development kit (Mabtech), according to the supplier's instructions, in MULTISORP Nunc plate (Dominique Dutscher), on 100µL of serum diluted at 1:200000. *Concentration of circulating immunoglobulins G/M (IgG/M) targeting the E2 subunit of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex (PDC-E2).* Anti-PDC-E2 concentration in serum was measured by a sandwich ELISA as follows: recombinant mouse PDC-E2 proteins (Abcam) were coated overnight at 4°C at a concentration of 1µg/mL in a

solution of NaCl 0.9% at pH 9.4 (Sigma Aldrich) on a MaxiSorp Nunc Plate (Dominique Dutscher). Hundred µL of mouse serum, diluted at 1:10 in incubation buffer (PBS with 0.05% Tween20 [Euromedex] and 0.1% BSA [Euromedex]), was then incubated for 2 hours at room temperature. Finally, an alkaline phosphatase (ALP)-conjugated goat anti-mouse IgG/M (Mabtech), diluted at 1:1000 in incubation buffer, was added for 1 hour at room temparature. The ELISA was revealed with 100µL of the p-nitrophenyl-phosphate (pNPP) substrate solution (Mabtech) and the plate absorbance was read at 410nm.

In vivo - Tumor growth experiment

$0.3x10^6$ MCA205 cells, or $0.3x10^6$ of TC-1, $1x10^6$ of Hep-55.1C or $3x10^6$ M1-1a-JP4 cells were resuspended in 100 µL of PBS and injected *s.c.* in the right flank of mice under anesthesia with 2.5% isoflurane at 35 days after the beginning of cholangitis induction. Tumor growth was monitored via repeated measurements of the tumor size using a digital caliper. Tumor volume was calculated using the following formula: tumor size (mm^3) = (length x width x height)/8 x 4/3 x pi. Mouse survival was monitored daily. Tumor size exceeding 2000 mm^3, tumor ulceration, weight loss superior to 20 % as compared to the beginning of the treatment and poor body condition were considered as endpoints.

In vivo - Lymphocytes depletion

$CD4^+$ and/or $CD8^+$ T cell depletion. T cell depletion was performed by *i.p.* injections of 100µg of rat IgG2 antibodies targeting CD4 (clone GK1.5, BioXCell) and/or CD8 (clone 2.43, BioXCell). Injections were achieved 2-3 days before and 1 day after CCA cell engraftment, then repeated throughout the whole course of the experiment to maintain T lymphocyte depletion. *B cell depletion*. B cell depletion was performed by injecting 20µg of rat IgG2 antibodies targeting CD20 (clone SA271G2, BioLegend). Injections were achieved 2-3 days before and 1 day after CCA cell engraftment, then repeated throughout the whole course of the experiment to maintain B lymphocyte depletion. Isotype control (clone LTF-2) was delivered *i.p.* at the corresponding dose.

Peripheral T and B cell depletions were confirmed by flow cytometry on mouse blood after the 4th injection (**Fig. S3**).

Ex vivo - Mouse liver sampling and staining

Mouse caudate liver lobes were resected on day 28 or 35 after cholangitis induction start, and were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) (Euromedex). Samples were then dehydrated (successive baths of alcohol 70%, alcohol 100%, isopropanol) and embedded in paraffin with LOGOS (dehydration/clearing processor, MM France). Four µm paraffin sections were performed with microtome and dryed at 37°C until the next day. HES (hematoxylin, eosin, safran) staining was performed on organ to study their morphology with a standard staining automate (Tech Inter). Each slide was examined using a Zeiss Axiophot microscope and photos were taken using Cameware, a software package.

Ex vivo – Tumor, blood, spleen and lymph node processing

Blood sample processing. Approximately 300µL of blood was drawn from mice and collected in a heparin-containing tube. Erythrocytes were removed using RBC lysis buffer (BioLegend) and the remaining cells were washed with PBS. Peripheral blood cells were resuspended at a concentration corresponding to 500µL of the initial blood volume per mL of PBS. *Tumor processing.* Tumors were resected, weighed and transferred on ice in gentleMACS C tubes (Miltenyi Biotec) containing 1ml of Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI). Tumors were dissociated mechanically with scissors, then enzymatically using mouse tumor dissociation kit (Miltenyi Biotec) and gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec) following the manufacturer's instructions. Tumor homogenates were filtered through 70 µM MACS® SmartStrainers (Miltenyi Biotec) and washed with PBS. Finally, bulk tumor cells were homogenized in PBS at a concentration corresponding to 250 mg of the initial tumor weight per mL. *Tumor-draining lymph node processing.* The inguinal lymph node draining the *s.c.* CCA tumor was harvested and transferred on ice in a micro-tube containing RPMI. Lymph nodes were dissociated mechanically, filtered through 70 µM MACS® SmartStrainers (Miltenyi Biotec) and washed with PBS. For each draining lymph node, bulk cells were

homogenized in 400µL of PBS. *Spleen processing.* Spleens were collected, mechanically dissociated and transferred on ice in a micro-tube containing RPMI. Spleens were dissociated mechanically, filtered through 70 µM MACS® SmartStrainers (Miltenyi Biotec) and washed with PBS. Finally, erythrocytes were removed using RBC lysis buffer (BioLegend) and the remaining cells were washed again with PBS before homogenization.

Ex vivo - Co-culture experiment

At day 33 after cholangitis induction started, mouse spleens were collected and processed. In a 24-well cell culture plate, $2.5x10^5$ mouse splenocytes and $2.5x10^4$ CCA cells were seeded in 1mL of serum-free CTL-Test™ PLUS Medium (ImmunoSpot) supplemented with 2mM L-glutamine, and co-cultured for 48 hours. After 44 hours, brefeldin A (BD GolgiPlug™, BD Biosciences) was added in the medium at a dilution of 1:100 for 4 supplemental hours. Total cells were harvested after a 2-day incubation and were stained for flow cytometry-assisted analysis of cytokine production. The staining was performed as follows: cell viability was assessed with LIVE/DEAD™ Fixable Yellow dye (Thermo Fisher Scientific). Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (clone 2.4G2, Mouse BD Fc Block™, BD Biosciences). Then, surface and intracellular stainings were conducted with one of the following panels: *Panel 1)* Surface staining was performed with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD3 BV421 (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-CD8 FITC (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-CD4 APC (clone RM4-5, Thermo Fisher Scientific) and anti-CD45 PE-Vio770 (clone 30F11, Miltenyi Biotec). Then, cells were fixed and permeabilized in BD Cytofix/Cytoperm™ buffer (BD Biosciences). Intracellular staining was performed with anti-IFNγ APC-eFluor780 (clone XMG1.2, Thermo Fisher Scientific), anti-IL4 PerCP-Cy5.5 (clone 11B11, BD Biosciences), anti-IL17a PE (clone eBio17B7, Thermo Fisher Scientific) and anti-GzmB PE-Dazzle594 (clone QA16A02, BioLegend). Finally, stained samples were run through a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences). *Panel 2)* Surface staining was made with the following fluorochrome-conjugated antibodies: Anti-CD45 BUV661 (clone 30F11, BD Biosciences), anti-CD3 BV421 (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-CD4 BUV496 (clone GK1.5, BD Biosciences), anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-NK1.1 BV605 (clone

PK136, BD Biosciences), anti-TCRγδ BV711 (clone GL3, BD Biosciences) and anti-CD25 BV786 (clone PC61, BD Biosciences). Then, cells were fixed and permeabilized in eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific). Intracellular staining was performed with anti-FoxP3 FITC (clone FJK-16s, Thermo Fisher Scientific), anti-IFNγ APC (clone XMG1.2, Thermo Fisher Scientific), anti-IL4 PerCP-Cy5.5 (clone 11B11, BD Biosciences), anti-IL17a APC-Cy7 (clone TCII-18H10, BD Biosciences), and anti-GzmB PE-Dazzle594 (clone QA16A02, BioLegend). Finally, stained samples were run through a BD LSRFortessa™ X20 flow cytometer (BD Biosciences). For both panels, data were acquired using BD FACSDiva™ software (BD biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar, Inc.). Absolute counts of leukocytes were determined after considering the proportion of the stained cell suspension run through the flow cytometer.

Ex vivo - Unspecific restimulation of leukocytes

At day 56 after CCA cells injection, mouse tumor-draining lymph nodes were harvested and processed. In a 96-well cell culture plate, $11.5x10^4$ leukocytes (equivalent to approximately $8x10^4$ T cells) were re-stimulated with $8x10^4$ CD3/CD28-coated beads (Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific) (T cells/beads ratio of 1:1) in 200µL of serum-free CTL-Test™ PLUS Medium (ImmunoSpot) supplemented with 2mM L-glutamine for 24 hours. After 20 hours, brefeldin A (BD GolgiPlug™, BD Biosciences) was added to the medium at a 1:100 dilution for 4 supplemental hours. The total amount of cells was harvested after a 24-hour incubation and was stained for cytokine production and analyzed by flow cytometry. The staining was performed as follows: cell viability was assessed with LIVE/DEAD™ Fixable Yellow dye (Thermo Fisher Scientific). Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (clone 2.4G2, Mouse BD Fc Block™, BD Biosciences). Surface staining was made with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD45 BUV661 (clone 30F11, BD Biosciences), anti-CD3 BV421 (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-CD4 BUV496 (clone GK1.5, BD Biosciences), anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-NK1.1 BV605 (clone PK136, BD Biosciences), anti-TCRγδ BV711 (clone GL3, BD Biosciences), anti-CD25 BV786 (clone PC61, BD Biosciences) and anti-CD69 PE-Vio770 (clone REA937, Miltenyi Biotec). Then, cells were fixed and

permeabilized in eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific). Intracellular staining was performed with anti-FoxP3 FITC (clone FJK-16s, Thermo Fisher Scientific), anti-IFNγ APC (clone XMG1.2, Thermo Fisher Scientific), anti-IL4 PerCP-Cy5.5 (clone 11B11, BD Biosciences), anti-IL17a APC-Cy7 (clone TCII-18H10, BD Biosciences), and anti-GzmB PE-Dazzle594 (clone QA16A02, BioLegend). Finally, stained samples were run through a BD LSRFortessa™ X20 flow cytometer (BD Biosciences). Data were acquired using BD FACSDiva™ software (BD biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar, Inc.).

Ex vivo - Phenotyping of the lymphocytic cell subsets in the tumor, tumor-draining lymph node and blood

At day 56 or 60 after CCA cell injection, blood samples, tumors and tumor-draining lymph nodes were collected from mice and processed. Two hundred µL containing the equivalent of 50mg of bulk tumor cells, or peripheral blood cells from 400µL of blood, or leukocytes from half of a whole lymph node, were stained for immunophenotyping and analyzed by flow cytometry. The staining was performed as follows: cell viability was assessed with LIVE/DEAD™ Fixable Yellow dye (Thermo Fisher Scientific). Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 (clone 2.4G2, Mouse BD Fc Block™, BD Biosciences). Then, surface and intracellular stainings were conducted with one of the three following panels : *panel "T lymphocytes":* Surface staining was made with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD3 APC (clone 17A2, Thermo Fisher Scientific), anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-CD4 PerCP-Cy5.5 (clone RM4-5, Thermo Fisher Scientific), anti-CD25 PE-Cy7 (clone PC61.5, Thermo Fisher Scientific), anti-PD-1 BV421 (clone RMP1-30, BD Biosciences) and anti-CD62L APC-eFluor780 (clone MEL-14, Thermo Fisher Scientific). Then, cells were fixed and permeabilized in eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific). Intranuclear staining was performed with anti-FoxP3 FITC (clone FJK-16s, Thermo Fisher Scientific). *Panel "NK and B lymphocytes":* surface staining was made with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-B220 V450 (clone RA3-6B2, BD Biosciences), anti-CD3 FITC (clone 17A2, Thermo Fisher Scientific), anti-NK1.1 PerCP-Cy5.5 (clone PK136, BD Biosciences), anti- TCRγδ APC

(clone GL3, BioLegend), anti-CD19 APC-H7 (clone ID3, BD Biosciences) and anti-CD69 PE (clone H1-2F3, BD Biosciences). Then, cells were fixed and permeabilized in BD Cytofix/Cytoperm™ buffer (BD Biosciences). *Panel "Lymphocytic subsets and memory":* surface staining was made with the following fluorochrome-conjugated antibodies: anti-CD45 BUV661 (clone 30F11, BD Biosciences), anti-CD3 BV421 (clone 145-2C11, BD Biosciences), anti-CD4 BUV496 (clone GK1.5, BD Biosciences), anti-CD8 PE (clone 53-6.7, BD Biosciences), anti-NK1.1 BV605 (clone PK136, BD Biosciences), anti- TCRγδ BV711 (clone GL3, BD Biosciences), anti-CD25 BV786 (clone PC61, BD Biosciences), anti-CD19 PerCP-Cy5.5 (clone 1D3, BD Biosciences), anti-CD27 PE-Dazzle594 (clone LG.3A10, BioLegend), anti-CD62L PE-Vio770 (clone REA828, Miltenyi Biotec), anti-CD44 APC (clone IM7, BD Biosciences) and anti-B220 APC-Vio770. Then, cells were fixed and permeabilized in eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer (Thermo Fisher Scientific). Intracellular staining was performed with anti-FoxP3 FITC (clone FJK-16s, Thermo Fisher Scientific). Finally, samples stained with the panels "*T lymphocytes"* and "*NK and B lymphocytes"* were run through a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences), and samples stained with the panel *"Lymphocytic subsets and memory"* were ran through a BD LSRFortessa™ X20 flow cytometer (BD Biosciences). Data were acquired using BD FACSDiva™ software (BD biosciences) and analyzed using FlowJo software (TreeStar, Inc.). Absolute counts of leukocytes were normalized considering the following parameters: the weight of the harvested tumor or amount of blood drawn, the total volume of the processed tissue cell suspension, the proportion of the whole cell suspension stained and the proportion of the stained cell suspension run through the flow cytometer.

Ex vivo - RNA extraction

Mouse caudate liver lobes were harvested at day 35 after cholangitis induction start, and CCA mouse tumors were resected at day 56 after CCA cells injection. Both tissues were stored directly in RNAprotect Tissue Reagent solution (Qiagen) and stored at 4°C. Total RNA extraction and purification were performed using the RNeasy plus mini kit (Qiagen) and the Qiashredder homogenizer columns (Qiagen), according to the supplier's instructions. Lysis and homogenization of the tissues was formerly achieved thanks to the Precellys 24 Tissue Homogenizer (Bertin Instruments) and hard tissue

homogenizing CK28-R 2 mL tubes (Bertin Instruments) in the lysis buffer supplied in the RNeasy plus mini kit, at 5 000 rpm for 20 seconds (twice). RNA concentration in samples was then measured using a NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

In vitro - Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Reverse transcription of RNA samples was performed using the SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. 1.8mg of purified total RNA was converted into cDNA in 20µL and diluted 6 times. Quantitative PCR was performed on a StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fischer Scientific) using TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer Scientific), according to the manufacturer's instructions, and the TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fischer Scientific) for the following murine genes: *Ifng* (Mm01168134_m1), *Il4* (Mm00445259_m1), *Il17a* (Mm00439619_m1), *Il23* (Mm00518984_m1), *Ccl20* (Mm01268754_m1), *Cxcl9* (Mm00434946_m1), *Cxcr5* (Mm00432086_m1), *Cxcl13* (Mm04214185_s1), *Tbet* (Mm00450960_m1), *Gata3* (Mm00484683_m1), *Rorc* (encoding RORγt) (Mm01261022_m1), *Bcl6* (Mm00477633_m1), *Ppia* (Mm02342430_g1). Expression results were normalized to *Ppia* signal (ΔCt) and to the expression mean of the control group (-ΔΔCt).

In vitro – RNA sequencing (RNA-Seq)

Mouse caudate liver lobes were harvested on day 35 after cholangitis induction start, and total RNA was extracted. The libraries were prepared following the Tru-seq mRNA protocol from Illumina, starting from 1 µg of high quality total RNA. Paired end (2 × 75) sequencing was performed on an Illumina Nextseq 500 platform. Fluorometric Qubit RNA HS assay (Life Technologies, Grand Island, New York, USA) was applied to measure RNA concentration. RNA quality (RNA integrity number) was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). To build libraries, 1 µg of high quality total RNA sample (RIN >8) was processed using Truseq stranded mRNA kit (Illumina) according to manufacturer's instructions. Briefly, after purification of poly-A containing mRNA molecules, nucleic acids were fragmented and reverse-

transcribed using random primers. Replacement of dTTP by dUTP during the second strand synthesis permitted to achieve strand specificity. Addition of a single A base to the cDNA was followed by ligation of adapters. Libraries were quantified by Qubit DNA HS Assay (Life Technologies, Grand Island, CA, USA) and library profiles were assessed using the DNA High Sensitivity LabChip kit on an Agilent Bioanalyzer. Libraries were sequenced on an Illumina Nextseq 500 instrument using 75 base-length read V2 chemistry in a paired-end mode. After sequencing, a primary analysis based on AOZAN software (ENS, Paris) was applied to demultiplexe and control the quality of the raw data (based of FastQC modules / version 0.11.5).[579] Obtained fastq files were then aligned using Star algorithm (version 2.5.2b) and quality control of the alignment realized with Picard tools (version 2.8.1). Reads were then counted using Feature count (version Rsubread 1.24.1) and the statistical analyses of the read counts were performed with the DESeq2 package version 1.14.1 to determine the proportion of differentially expressed genes between two samples.

In silico - RNA-Seq data analysis

RNA-seq analysis. RNA-Seq data analysis was performed by GenoSplice technology (www.genosplice.com). Sequencing, data quality, reads repartition (*e.g.*, for potential ribosomal contamination), and insert size estimation were performed using FastQC, Picard-Tools, Samtools and rseqc. Reads were mapped using STARv2.4.0[580] on the mm10 Mouse genome assembly. Gene expression regulation study was performed as already described.[581,582] Briefly, for each gene present in the Mouse FAST DB v2018_1 annotations, reads aligning on constitutive regions (that are not prone to alternative splicing) were counted. Based on these read counts, normalization and differential gene expression were performed using DESeq2 on R (v.3.2.5). Only genes expressed in at least one of the six compared experimental conditions were further analyzed. Genes were considered as expressed if their FPKM value was greater than 98% of the background FPKM value based on intergenic regions. Results were considered statistically significant for P-values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 1.5. Significant GO terms and KEGG pathways[583] were retrieved using DAVID.[584] *Heatmap for the results visualization.* Results were considered statistically significant for uncorrected p-values ≤ 0.05 and fold-changes ≥ 2. Hierarchical Euclidean clustering and heatmaps have

been performed using Morpheus (https://software.broadinstitute.org/morpheus). *Gene Ontology (GO) terms enrichment analysis.* GO terms enrichment was analyzed using the DAVID Functional Annotation tool (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp) on genes that were upregulated in both conditions (PBC and PSC), or upregulated in only one, or downregulated for both cholangitis or only one.[584,585]

Ex vivo - Enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay

At day 32 or 33 after cholangitis induction star, mouse spleens were collected and processed. ELISPOT assays were performed using the Murine pre-coated IFNγ ELISpot kit (Diaclone) according to the manufacturer's instructions. $5x10^5$ mouse splenocytes were seed in 200µL of serum-free CTL-Test™ PLUS Medium (ImmunoSpot) supplemented with 2mM L-glutamine, and 4ng of peptides were added (final concentration during incubation 20ng/mL). Cells were stimulated for 20 hours and the ELISPOT plates were revealed following the given protocol. Finally spots were counted in an automated manner with a person supervised-quality control check using a CTL S6 analyzer (ImmunoSpot) with the software ImmunoSpot 5.1.36 (ImmunoSpot). For each condition of splenocyte (re)stimulation, the number of spots reported is deduced of the number of spots in unstimulated wells.

In silico - PDC-E2 peptides prediction

The epitopes in the mouse PDC-E2 protein (MWRVCARRARSAVPRDGFRARWAALKEGPGAPCGSPRIGPAAVRCGSGIPRYGVRSLCGWS SGSGTVPRNRLLRQLLGSPSRRSYSLPPHQKVPLPSLSPTMQAGTIARWEKKEGEKISEGDLIAEV ETDKATVGFESLEECYMAKILVPEGTRDVPVGSIICITVEKPQDIEAFKNYTLDLAAAAAPQAAPA AAPAPAAAPAAPSASAPGSSYPTHMQIVLPALSPTMTMGTVQRWEKKVGEKLSEGDLLAEIET DKATIGFEVQEEGYLAKILVPEGTRDVPLGAPLCIIVEKQEDIAAFADYRPTEVTSLKPQAAPPAPP PVAAVPPTPQPVAPTPSAAPAGPKGRVFVSPLAKKLAAEKGIDLTQVKGTGPEGRIIKKDIDSFVP SKAAPAAAAAMAPPGPRVAPAPAGVFTDIPISNIRRVIAQRLMQSKQTIPHYYLSVDVNMGEVL LVRKELNKMLEGKGKISVNDFIIKASALACLKVPEANSSWMDTVIRQNHVVDVSVAVSTPAGLIT PIVFNAHIKGLETIASDVVSLASKAREGKLQPHEFQGGTFTISNLGMFGIKNFSAIINPPQACILAI GASEDKLIPADNEKGFDVASVMSVTLSCDHRVVDGAVGAQWLAEFKKYLEKPITMLL) were

predicted using the IEDB Analysis Resource T cell epitopes - MHC binding prediction tools (http://tools.iedb.org/main/tcell/), which calculates the IC50 values of each possible short peptide within the protein. For both MHC class I and II predicted epitopes, the corresponding peptides were synthesized by Eurogentec at a crude purity and with neither N_{ter} nor C_{ter} modifications.

In silico - Statistical analyses

Linear mixed-effects models were applied for longitudinal comparison of tumor growth curves using TumGrowth web tool (https://kroemerlab.shinyapps.io/TumGrowth/).[586] GraphPad Prism software was used for data graphing. Statistical analyses were performed using the softwares GraphPad Prism, Excel or R. In the main figures, both statistically significant ($p<0.05$) and unsignificant ($p>0.05$) results are displayed. In the supplemental figures, only *p*-values illustrating significance ($p<0.05$) or trend ($0.15>p>0.05$) are shown.

Discussion et perspectives

I. Discussion

Grâce à l'utilisation de nos modèles murins de CSP et CBP, nous avons pu mettre en évidence que l'auto-immunité associée à la CPB alimentait l'immunosurveillance du CC et prévenait son développement, alors que l'inflammation associée à la CSP n'avait aucun impact. Plus précisément, le développement d'une réponse Th1/Tc1 croisée, spécifique des cholangiocytes sains et malins, apparaît comme le médiateur de cette protection contre le CC. (***Figure 28***)

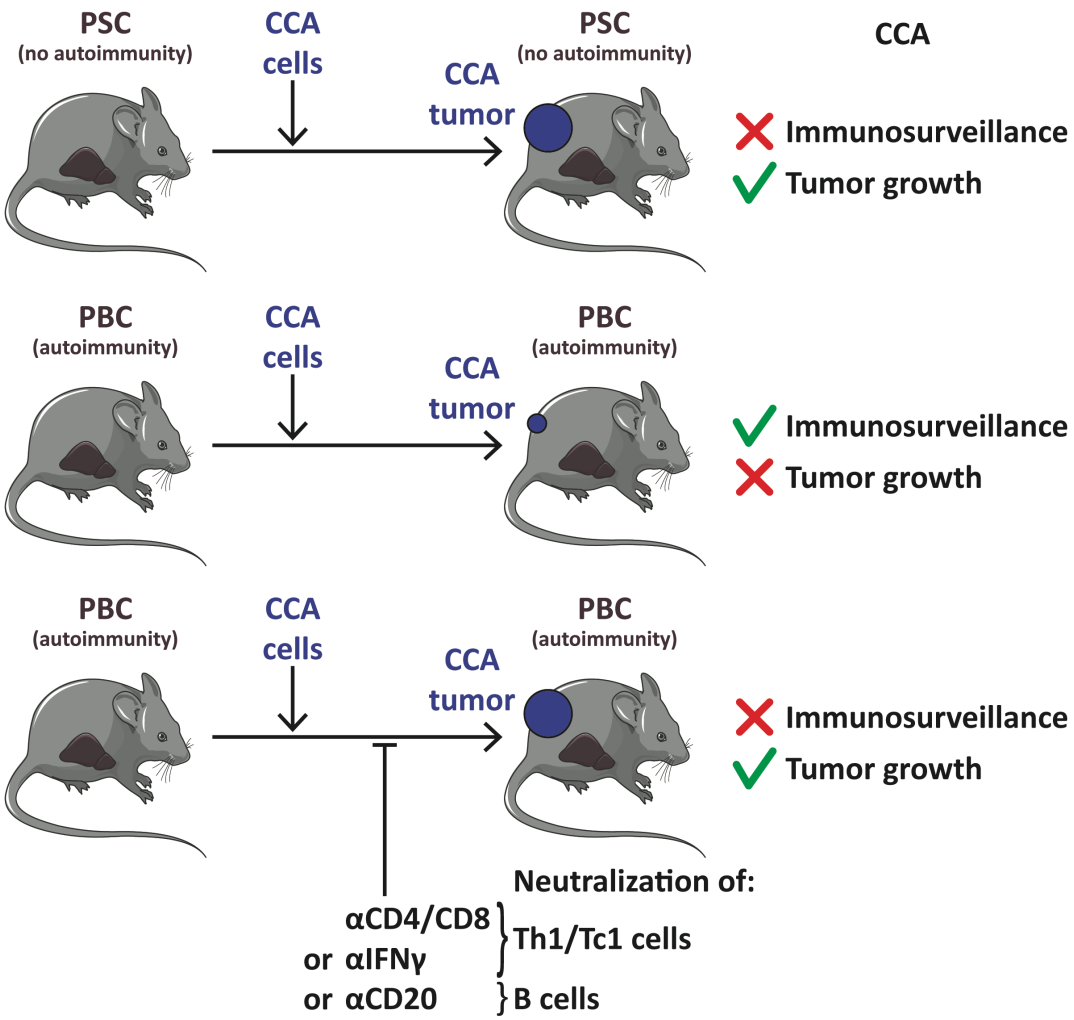


Figure 28 : L'auto-immunité associée à la CBP alimente l'immunosurveillance du cholangiocarcinome. La croissance tumorale des cellules de CC implantées en sous-cutané, chez les souris CBP, apparaît ralentie en comparaison avec les souris CSP et contrôle. Ce contrôle actif du développement tumoral du CC apparaît dépendant des lymphocytes B et T, et plus spécifiquement de la réponse T de type 1.

A. Comparaison des deux modèles murins de cholangites

Le choix des deux modèles murins reposait principalement sur la possibilité de l'induire chez des souris naïves, mais également d'observer le développement d'une composante auto-immune chez le modèle CBP, en comparaison au modèle CSP qui devait être purement inflammatoire. Les différents résultats, histologiques, sérologiques, immunologiques et même transcriptomiques, nous ont permis de montrer que ces modèles d'études récapitulaient, bien qu'imparfaitement, les principales caractéristiques des pathologies humaines, avec notamment, une réaction inflammatoire hépatique pour les deux modèles. De plus, le modèle CBP présentait l'activation d'une réponse globale T et B significativement plus importante que le modèle CSP, et des lymphocytes B et T auto-réactifs contre la protéine PDC-E2. Dans la même ligne, des marqueurs d'une réponse cytotoxique (Cd8, Ifng, Gzmb) n'ont été détectés que dans le modèle de CBP et non dans la CSP,[587] ce qui est cohérent avec les observations faites chez l'homme.[111,140,588] Cependant, de par le fait qu'ils soient induits, ces deux modèles ne permettent pas de prendre en compte les facteurs génétiques impliqués dans l'étiologies des deux cholangites, ni la prédominance d'un sexe sur l'autre. Pourtant, l'induction de la CSP par le DDC permet bien l'installation d'une fibrose en « oignon » autour des moyens et gros canaux biliaires accompagnée d'une cholestase et atteinte hépatique ; caractéristiques que l'on retrouve notamment lors de défauts de transporteurs dans les cholangiocytes.[187,589] Certaines limitations existent néanmoins avec ce modèle tels que son caractère transitoire, le manque d'information relative à l'induction éventuelle de MICI, et les interférences du DDC avec d'autres tissus.[589] En parallèle, l'induction de la CBP grâce à l'administration du 2-OA-BSA/α-GalCer permet d'assurer le développement d'une réponse immunitaire avec sécrétion d'AMAs (réponse humorale), activation de lymphocytes T auto-réactifs contre les cholangiocytes, et infiltration de lymphocytes T $CD8^+$ dans l'espace porte hépatique. De ce fait, cela permet de récapituler la composante auto-immune de la pathologie humaine, notamment la réactivité à PDC-E2, avec une atteinte des canaux biliaires. En revanche, les processus inflammatoires

et la formation des granulomes impliqués dans ce modèle de CBP ne sont pas entièrement compris. De plus, ces deux caractéristiques sont généralement particulièrement modérées dans notre modèle par rapport aux observations faites chez les patients. Finalement, des atteintes des plus gros canaux biliaires sont également observées chez les animaux, alors que la CBP ne touche chez l'homme que les petits canaux.[187,590]

B. Contrôle de la croissance du CC, dépendante des lymphocytes T, après induction de la CBP mais pas de la CSP

L'induction de la CBP semblait bien conférer aux souris une protection, même incomplète, contre le développement d'un modèle de CC sous-cutané. Cette protection est également apparue spécifique d'un histotype en n'empêchant pas la croissance d'autres modèles murins de tumeurs comme le CHC. De plus, l'implication du système immunitaire adaptatif est absolue et nécessaire à l'effet observé de la CBP sur le développement du CC. En effet, la déplétion des lymphocytes T ou des lymphocytes B abrogeait, respectivement totalement ou partiellement, le contrôle sur la croissance tumorale du CC chez les souris CBP. De ce fait, cela nous permet d'affirmer que c'est bien la spécificité antigénique et partagée entre cholangiocytes sains et transformés qui permet aux animaux souffrant de la CBP d'être protégés du CC. Aussi, ces observations conforteraient notre hypothèse que cette immunité adaptative croisée protègerait les patients CBP d'une atteinte maligne des voies biliaires. Ces résultats fournissent l'un des premiers indices jamais reportés en faveur de l'existence d'un lien entre maladie auto-immune et immunosurveillance du cancer. Ce lien implique évidemment une réactivité contre un ou plusieurs antigènes partagés entre cellules saines et transformées d'un même tissu. Pourtant jusqu'à présent, les syndromes auto-immuns avaient été plutôt considérés comme des facteurs de risques pour le cancer. Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, un risque plus élevé de développer un lymphome, un cancer du poumon ou un mélanome a pu être observé.[563,591] Il a aussi été rapporté chez les personnes souffrant d'un lupus

érythémateux disséminé, une augmentation de l'incidence des cancers hématologiques, du vagin, du col de l'utérus, de la tête ou du cou, de la thyroïde, du foie ou de la vésicule biliaire, du rein, de l'anus, de l'œsophage, du poumon et du pancréas. Mais ces derniers avaient un plus faible risque de développer un cancer des ovaires et du colon.[592] Le syndrome de Gougerot-Sjögren a finalement, lui aussi, été associé à une augmentation du risque de cancers, et en particulier de lymphomes non Hodgkinien et de cancers de la thyroïde.[593] À notre connaissance, le rôle prophylactique d'une réponse auto-immune contre le cancer, n'a été évoqué que dans le cas du vitiligo et du mélanome.[572] Cependant, aucune étude épidémiologique de grande ampleur n'a permis d'analyser la fréquence d'apparition de cancers chez les patients souffrant de syndromes auto-immuns, avec une considération particulière pour le tissu siège de la perte de tolérance. Pourtant, plus récemment, il a été démontré que la pancréatite auto-immune, malgré l'inflammation locale, n'était pas particulièrement associée au développement du cancer du pancréas chez les patients. En revanche, elle semblait augmenter les risques de cancers dans d'autres organes (estomac, poumon ou prostate).[594] Chez les patients atteints d'une HAI, le risque de développer un CHC est fortement associé avec la progression de la pathologie vers une cirrhose. En outre, les patients cirrhotiques, à la suite d'une HAI, avait un risque plus faible de développer un CHC que les patients dont la cirrhose était la conséquence d'une CBP ou d'une infection par un virus de l'hépatite B ou C.[595] De plus, dans les modèles précliniques, il est possible d'immuniser des souris avec des cellules épithéliales iléales normales (non transformées) et d'induire une réponse immunitaire protectrice contre le développement du cancer du côlon.[596] Tous ces exemples soupçonnent un aspect bénéfique jusque-là négligé, de réactivités auto-immunes contre le développement malin dans divers organes.

D'un point de vue mécanistique, la déplétion périphérique des sous-groupes de lymphocytes a démontré que l'élimination des cellules de CC lors de la CBP dépendait à la fois des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ mais aussi des lymphocytes B. Le rôle des lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$, a été démontré dans le développement et les atteintes de la CBP.[588,597,598] En outre, le nombre de lymphocytes T $CD8^+$ intra-tumoral a montré une valeur pronostique positive chez les patients avec un CC.[532] De manière générale,

une activation des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ témoigne d'une réponse anti-tumorale qui est donc associée à un meilleur pronostic chez les patients souffrant d'un cancer.[568,577] Dans un même temps, le rôle des lymphocytes B dans le processus de la CBP a également été largement étudié, de par leur importante production d'auto-anticorps.[140] En outre, ces auto-anticorps pourraient favoriser la présentation de PDC-E2 aux lymphocytes T par la formation de complexes immuns et l'activation d'APCs via leurs récepteurs au Fc.[112,599] Le rôle des lymphocytes B dans l'immunosurveillance du cancer a longtemps été déconsidéré. Ces cellules B ont généralement été classifiées comme pro-tumorales de par leur phénotype régulateur ou l'inhibition fréquemment rapportée de la réponse cellulaire anti-tumorale lorsqu'une réponse humorale est engagée.[600] Cependant, leur rôle dans le mécanisme d'ADCC, du fait de leur production d'IgG, leur potentiel de présentation antigénique et leur rôle dans la formation et le maintien des TLS leur conféreraient des propriétés anti-tumorales. De plus, une fonction de soutien à la réponse T par les cellules B a pu être mise en évidence,[600] notamment chez des patients atteints de cancers du pancréas[601] ou du colon.[602] Leur déplétion dans un modèle murin syngénique de mélanome est également apparu délétère, favorisant la croissance tumorale.[603] Dans le cadre du CC, l'implication des lymphocytes B avec une fonction anti- ou pro-tumorale n'a pas été particulièrement décrite.

L'inconvénient de notre étude est qu'elle repose sur un modèle de tumeurs murines injectées en sous-cutanés, et donc, dans un tissu éloigné anatomiquement et morphologiquement du foie. Un modèle murin syngénique et orthotopique de CC a cependant été récemment décrit. Celui-ci consiste en l'injection de cellules de cholangiocarcinome dans le lobe médian du foie.[227] Les investigations dans un tel modèle de CC seraient particulièrement intéressantes afin de confirmer l'activité anti-tumorale d'un syndrome auto-immun au sein même du tissu biliaire en tenant compte de l'environnement particulièrement immunosuppressif du foie. Au-delà de ça, un modèle orthotopique pourrait également permettre d'étudier la composante inflammatoire des deux pathologies, ce qui n'est pas possible avec un modèle ectopique.

C. Caractéristique de l'immunosurveillance contre le CC, médiée par les lymphocytes T, au cours de la CBP

Les analyses transcriptomiques ont révélé un enrichissement de l'expression des gènes associés aux réponses Th1 et Tc1 dans les foies CBP, par rapport au control mais également au CSP. De plus les résultats d'immunophénotypages réalisés par cytométrie en flux, ainsi que des tests d'expression génique, ont confirmé la présence de cette signature Th1/Tc1 dans le stroma du CC ainsi que le ganglion drainant la tumeur chez les souris CBP mais pas chez les souris CSP. La polarisation vers un phénotype Th1 et Tc1 des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ respectivement, a démontré un rôle essentiel dans le rejet des tumeurs de CC. En effet, la neutralisation systémique de l'IFNγ, leur principale cytokine effectrice, a amoindri significativement la protection médiée par la CBP sur la croissance du CC.

Compte tenu de leur implication reconnue dans l'auto-immunité et l'immunosurveillance du cancer, les lymmhpcytes T Th1 $CD4^+$ et Tc1 $CD8^+$ pourraient être suspectés d'établir le lien mécanique entre la CBP et l'immunosurveillance exacerbée contre le CC. D'une part, il a été démontré que la réponse immunitaire Th1 l'emporte sur la réponse Th2 lors la CBP,[105,139] et qu'une réponse Th1 est nécessaire à l'induction de notre modèle murin.[590] De plus, une augmentation des cytokines de la réponse immunitaire de type 1, IFNγ, IL12, CXCL9 et CXCL10 est observée dans le sang ou le foie des patients atteints de CBP. Ces cytokines se sont vu attribuer un rôle critique dans la promotion et le maintien de la pathologie auto-immune.[139,604–606] En outre, cette double réponse Th1/Tc1 est d'ores et déjà connues pour son implication dans les syndromes auto-immuns,[607,608] et des lymphocytes T $CD8^+$ auto-réactifs sont retrouvés chez les patients souffrant de la CBP.[111] D'autre part, l'infiltration intra-tumorale de lymphocytes Th1 et $CD8^+$ cytotoxiques corrèle avec un pronostic favorable dans plusieurs types de cancer.[609] Le cholangiocarcinome ne fait pas

exception à cette règle et une infiltration tumorale abondante par les lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$ coïncide avec une amélioration des résultats cliniques,[532,533,533,569] de même que l'action anti-tumorale de l'IFNγ semblent corréler avec un infiltrat de bon pronostic.[610,611] Nos résultats décrivent bien une implication de la réponse Th1/Tc1 dans le CBP et la réponse immunitaire anti-CC. Cependant, la situation est plutôt unique puisque ces lymphocytes auto-réactifs assurent simultanément la médiation d'une activité anticancéreuse bénéfique et d'une activité auto-immune délétère en ciblant les cholangiocytes malins et normaux.

En plus des lymphocytes Th1/Tc1, de futures expériences devraient conclure sur une implication d'autres compartiments immunitaires adaptatifs dans l'immunosurveillance du CC, notamment lorsqu'elle est alimentée par l'auto-immunité de la CBP. Nos analyses de transcriptomique et de cytométrie en flux ont mis en évidence une signature Th2/Tc2 enrichie (par exemple IL4, Gata3) dans le foie, dans l'environnement micro-tumoral du CC et les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglion lymphatique drainant la tumeur), chez les souris CBP par rapport aux animaux contrôles ou CSP. De plus, la déplétion des lymphocytes B a significativement, bien que partiellement, altéré la protection médiée par la CBP contre le CC. C'est pourquoi nous pouvons penser que les lymphocytes B et Th2/Tc2 pourraient participer à l'immunosurveillance du CC chez les souris CBP. En outre, il serait intéressant de réaliser le blocage systémique de l'IL4 afin de confirmer l'importance de cette polarisation Th2/Tc2 dans la réponse immunitaire anti-CC. D'ores et déjà, cette observation est originale en soi et présente un intérêt particulier pour le domaine de l'immuno-oncologie. En effet, si les cellules B jouent un rôle indéniable dans la pathogenèse de la CBP,[140,612] elles sont détectées de façon récurrente dans les microenvironnements néoplasiques mais leur fonction pro versus anti-tumorale reste à ce jour débattue.[613,614] Concernant le cholangiocarcinome, une étude a corrélé un niveau plus élevé de lymphocytes B infiltrés dans le stroma tumoral avec un meilleur pronostic.[533] Par conséquent, les sous-types de lymphocytes B et Th2/Tc2 pourraient jouer un rôle aux côtés des cellules Th1/Tc1 en endommageant les voies biliaires normales et en éliminant les cholangiocytes transformés. Au-delà de cette polarisation Th2/Tc2, les lymphocytes B pourraient également être impliqués dans

une réponse immunitaire via les lymphocytes Tfh et la formation de TLS. Il n'existe actuellement pas de réelle étude concernant leur existence dans le stroma du CC, cependant ils sont associés à un taux de rechute plus faible chez les patients souffrant d'un CHC.[615] De manière plus générale, l'observation de TLS dans l'environnement micro-tumoral est associé à un meilleur pronostic dans un certain nombre de cancers,[463,616] notamment le cancer colorectal,[484] des ovaires,[617] du sein[618] et du poumon.[619] Dans un même temps, l'expression de gènes associés à ces structures a effectivement été mesurée dans plusieurs tumeurs, y compris des échantillons de CC, de manière particulièrement hétérogène entre patients.[450] Des études plus approfondies seront nécessaires afin d'élucider le rôle des lymphocytes B et Tfh dans la réponse anti-tumorale anti-CC. Il serait parfaitement envisageable de réaliser sur notre modèle murin de CC des études histologiques afin de documenter la présence ou non de TLS et leur potentielle association avec la CBP et une plus faible croissance tumorale. Actuellement, aucun enrichissement de gènes relatifs aux TLS (CXCL13, CXCR5) n'a pu être observé dans l'environnement du CC chez les souris CBP par rapport aux animaux contrôle ou CSP. Pourtant, chez les patients CBP, l'expression de CXCL13 et le recrutement de lymphocytes T $CD4^+$ exprimant CXCR5 ont montré un rôle majeur dans la réponse humorale médiée lors de la CBP.[620] Finalement, pour confirmer la double fonction des lymphocytes B dans la réponse auto-immune lors de la CBP et la réponse anti-tumorale contre le CC, il pourrait être judicieux de mesurer une éventuelle expansion clonale de lymphocytes B au sein de la tumeur de CC, et comparer cette expansion clonale avec celle observée dans le foie des souris CBP.

Finalement, nous avons également observé un enrichissement des lymphocytes Th17/Tc17 dans les tissus lymphoïdes (mais pas dans le microenvironnement du CC) des souris CBP par rapport à la CSP et aux animaux témoins. L'importance de cet axe, médié par l'IL17a, avait déjà été observé dans notre modèle induit de CBP.[590] Cette observation a également confirmé la pertinence du modèle murin de la CBP, car l'activité des cellules Th17 a été positivement associée à la progression vers les stades avancés de la cholangite.[138,139,608] Cependant, la neutralisation de la cytokine effectrice IL17a n'a pas altéré de manière vraiment significative l'immunité protectrice contre le CC chez les souris atteintes de CBP. Ainsi, les lymphocytes Th17/Tc17 liés à

la CBP ne semblent pas nécessairement impliqués dans l'immunosurveillance du CC. Cela correspond également à l'observation clinique selon laquelle des taux élevés d'IL17a intra-tumorale prédit un mauvais pronostic chez les patients atteints de iCC.[513] Dans le stroma tumoral, cette cytokine est principalement sécrétée par les lymphocytes Tγδ et présente des propriétés pro-angiogéniques et donc pro-tumorales.[621] Cependant, la détection chez les souris CBP d'une telle proportion de lymphocytes Th17/Tc17 dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur, mais également après co-culture avec des cellules de CC, nous interroge. Le phénotype peu stable des lymphocytes Th17 ainsi que leur capacité à effectuer une transition vers une autre polarisation, et plus particulièrement un phénotype Th1, pourraient être investigués.[469,622] Cela pourrait expliquer l'absence de cytokines signatures de la réponse Th17 au sein des tumeurs de CC. En outre, comme nous l'avions vu précédemment, les lymphocytes Th17 possèdent aussi une fonction de soutien de l'immunité médiée par les cellules Th1/Tc1 lors d'une réponse anti-tumorale. Par ailleurs, plusieurs études ont pu mettre en évidence une forte fonction anti-tumorale des lymphocytes T $CD8^+$ présentant un phénotype Tc17 *ex vivo*.[289,623,624] En effet, ces derniers après stimulation *ex vivo* ne possèdent pas d'activité cytotoxique et sécrètent de l'IL17. Cependant, après réinjection *in vivo*, ils changent de phénotype et expriment de l'IFNγ, mimant un phénotype Tc1. De plus, ils acquièrent une fonction cytotoxique avec une importante activité anti-tumorale,[623] et, de par leur phénotype d'origine, permettent le recrutement de neutrophiles au niveau de la tumeur, ce que ne peuvent pas les lymphocytes Tc1.[289] Finalement, ces lymphocytes ont également l'avantage de pouvoir persister plus longtemps et de s'accumuler de façon plus importante dans le tissu tumoral, grâce à l'expression de IL7R (*interleukin-7 receptor*).[624,625] Ces hypothèses seront bien sûr à confirmer de manière expérimentale par des tests de tracking cellulaire, de co-marquages d'IL17/IFNγ avec différents facteurs de transcription, entre le ganglion drainant la tumeur et l'environnement micro-tumoral du CC.

De manière plus générale, l'intérêt est maintenant de déterminer si une réponse anti-tumorale suffisamment efficace nécessite fatalement une réponse auto-immune,

comme cela semble actuellement le cas pour le mélanome avec le vitiligo, qui reste fort heureusement une manifestation bénigne.[570]

II. Perspectives

A. Auto-immunité de la CBP et immunosurveillance du CC partagent un même antigène

L'observation de ce lien entre l'auto-immunité lors de la CBP et l'immunosurveillance contre le CC nous indique que des clones lymphocytaires réalisent ces deux réponses immunitaires adaptatives. La mise en exergue de l'enrichissement de ces clones semble importante afin de déterminer exactement les médiateurs communs de ces deux immunités. Le séquençage d'ARN de cellule unique permet d'accéder au phénotype précis de chaque lymphocyte, mais également de déterminer l'exact TCR qu'il exprime grâce à des méthodes d'analyses de l'appariement des chaînes α et β du récepteur et des CDRs (*complimentarity determining regions*).[626–628] De ce fait, il est donc possible de relier un clone TCR enrichi à une signature immunitaire. En outre, l'expansion de clones de TCR est généralement signe d'une immunogénicité,[629] dans notre cas, des cellules de CC et des cholangiocytes sains du foie. L'objectif est donc de déterminer les clones de TCR enrichis et communs entre le foie des souris CBP et la tumeur de CC. En outre, l'identification d'un ou plusieurs enrichissements de TCR peut également favoriser la découverte d'un ou plusieurs épitopes suffisamment immunogènes à l'origine de cette expansion clonale. Grâce à des modèles informatiques, les interactions entre TCRs, et plus spécifiquement leurs CDRs, et des librairies de complexes peptide-CMH peuvent déterminer la spécificité des TCRs identifiés pour des antigènes du soi exprimés par les cholangiocytes.[630–632] Cependant, ces algorithmes semblent actuellement surtout conçus pour des analyses chez l'homme (restreintes aux HLAs humains).

Nos différents résultats indiquent également qu'il existe au moins un antigène commun entre les cholangiocytes sains et transformés. Cet antigène permet à la réponse immunitaire un double jeu, bénéfique contre le CC et délétère contre les

voies biliaires. Les techniques expérimentales actuelles permettent d'analyser la totalité des peptides présentés sur le CHM de classe I (et parfois de classe II également), par élution, purification et spectrométrie de masse.[633,634] La situation actuelle doit faciliter l'identification de cette cible antigénique commune aux canaux biliaires sains et transformés. En effet, les cellules tumorales peuvent présenter des peptides qui ne le sont habituellement pas.[438] En revanche, dans notre cas, nous sommes intéressés par un peptide normal du soi qui est déjà présenté et reconnu lors de la CBP. C'est pourquoi il s'agit de réaliser une analyse de l'immunopeptidome restreint aux CMHs de classe I du foie (qui contient les canaux biliaires intrahépatiques) et de la tumeur de CC. Dans notre modèle, le rôle primordial des lymphocytes T $CD8^+$ et de leur fonction cytotoxique, dans la pathogénicité de la CBP et la surveillance du CC nous laisse penser qu'au moins un des antigènes que nous recherchons est bien présenté via les CMHs de classe I sur les cholangiocytes sains et transformés.[635]

B. De l'identification d'une cible thérapeutique aux applications cliniques

Après identification d'une possible cible thérapeutique, tel qu'un antigène, il sera essentiel de valider son expression dans les CCs de patients pour justifier son potentiel en clinique. De plus, dans l'optique de développer une immunothérapie, détecter des clones de lymphocytes T réactifs contre le ou les peptides candidats permettrait de s'assurer d'une réactivité du système immunitaire et d'un potentiel thérapeutique.

Aucune directive officielle concernant le traitement du CC ne comprend aujourd'hui des immunothérapies. Cependant, des essais cliniques testent plusieurs stratégies tels que des anticorps bloquant des *checkpoints* inhibiteurs de l'immunité (PD-1, PD-L1, CTLA-4),[209,211,636] déjà largement utilisés dans le mélanome et certains cancers du poumon. Des immunomodulations par des cytokines ou même des thérapies cellulaires utilisant des lymphocytes T autologues sont aussi à l'essai.[637] En outre, des tests cliniques ont également été démarrés en utilisant différentes stratégies immunothérapeutiques à propriétés vaccinales. Un vaccin peptidique

(NCT00012246) ; un vaccin avec des DCs pulsées (NCT00004604) ou un vaccin viral (NCT00028496), tous contre l'antigène CEA (*carcinoembryonic antigen*), sont en cours. Un vaccin comprenant l'antigène CA9-19 (*cancer antigen 9-19*) (NCT03042182), un vaccin contre l'HBV et l'HCV (NCT02232490), ou même l'application d'un virus oncolytique (NCT02714374) sont également à l'étude.

En tenant compte de l'environnement fortement immunosuppressif du CC,[569] l'utilisation seule, d'inhibiteurs de *checkpoints* de l'immunité ne semble pas être une stratégie efficace. En effet, il est préférable que l'environnement tumoral soit immunologiquement déjà actif ("chaud") pour observer de réels bénéfices avec ces immunothérapies.[638–640] De ce fait, il serait souhaitable de combiner ces inhibiteurs de *checkpoints* immunitaires à des thérapies capables de "réchauffer" la tumeur. L'utilisation de virus oncolytiques s'est montrée particulièrement efficace pour pré-sensibiliser les tumeurs avant l'inoculation d'autres immunothérapies.[547,641,642] De plus, il est possible de manipuler génétiquement les virus oncolytiques afin qu'ils expriment un antigène tumoral, ce qui permet de *primer* et même de *booster* l'immunité anti-tumorale adaptative.[643] A noter que cette stratégie pourrait être particulièrement intéressante pour un cancer comme le CC qui ne répond que très peu aux chimiothérapies standards et aux inhibiteurs des *checkpoints* de l'immunité.[644] Par ailleurs, des combinaisons avec des thérapies ciblant IDH1 (*isocitrate dehydrogenase 1*) ou certains FGFR (fibroblast growth factor receptor), lorsque cela est possible (mutation ou surexpression dans la tumeur), sont également à considérer au vu des résultats encourageants qu'ils ont pu générer.[211]

En revanche, avec de telles stratégies thérapeutiques, la possibilité de déclencher un syndrome CBP-*like* chez les patients apparaît dangereuse. Les immunothérapies, particulièrement les vaccins utilisant des antigènes communs à la tumeur et au tissu sain, ont déjà conduit au développement de réactions auto-immunes chez des patients et dans des modèles murins.[552,645,646] Cependant, la réussite de vaccins viraux précédemment employés chez des malades, et ce sans développement d'auto-immunité, nous permet d'être optimistes.[647] Notamment, les lymphocytes T auto-réactifs, ayant échappé à la tolérance, possèdent généralement un TCR avec une faible avidité pour leur épitope, de plus les antigènes du soi (s'ils contiennent effectivement des épitopes du CMH de classe II) sont normalement capables d'activer des

lymphocytes Treg qui peuvent contenir l'intensité de la réponse immunitaire.[648–650] En outre, on peut aussi faire l'hypothèse que la cible thérapeutique choisie soit présentée de manière aberrante chez les cellules tumorales de CC, par rapport aux cholangiocytes sains, ce qui devrait minimiser les réponses délétères contre le tissu normal.[647,649] Ces différents éléments, ainsi que l'environnement immunosuppressif de la tumeur, devraient permettre de restreindre la réponse immunitaire à la tumeur.[651] Finalement, si la menace d'un syndrome auto-immune, contre l'arbre biliaire sain, apparaît trop forte ; l'injection, après traitement, de tétramères suicides déplétant spécifiquement certains clones de lymphocytes T auto-réactifs, pourrait être envisagé. [652,653]

Il pourrait aussi être intéressant de vacciner en prophylaxie, les personnes atteintes de CSP du fait de leur haut risque de développer un CC. Les vaccins préventifs contre le développement de cancer sont déjà des réussites dans le cas des tumeurs causées par une infection virale, comme c'est le cas pour l'HBV et le papillomavirus humain.[654,655] En outre, les vaccins prophylactiques, utilisant des antigènes associés à la tumeur, ont déjà montré leur efficacité dans plusieurs modèles murins.[648,656,657]

Nous avons pu montrer dans cette étude un lien entre une réponse auto-immune contre les cholangiocytes normaux, et l'immunosurveillance contre les cholangiocytes transformés. Ce phénomène pourrait aussi exister dans le cadre d'autres pathologies auto-immunes, comme le vitiligo par exemple. C'est pourquoi des études en ce sens seraient extrêmement informatives et pourraient permettre la compréhension des mécanismes immunologiques (cellules, cibles…) impliqués dans l'immunosurveillance et la réponse anti-tumorale spécifique de certains cancers. En outre, cela devrait faciliter la conception d'immunothérapies à visées thérapeutiques ou prophylactiques dans le cadre du cancer, mais également pour le traitement de maladies auto-immunes.

Publications

Collaborations

Lévesque, S., Le Naour, J., Pietrocola, F., **Paillet, J.**, Kremer, M., Castoldi, F., Baracco, E.E., Wang, Y., Vacchelli, E., Stoll, G., Jolly, A., De La Grange, P., Zitvogel, L., Kroemer, G., Pol, J.G., 2019. A synergistic triad of chemotherapy, immune checkpoint inhibitors, and caloric restriction mimetics eradicates tumors in mice. Oncoimmunology 8, e1657375.

Roberti, P. M., Yonekura, S., Duong, C.P.M., Picard, M., Ferrere, G., Tidjani Alou, M., Rauber, C., Iebba, V., Lehmann, C.H.K., Amon, L., Dudziak, D., Derosa, L., Routy, B., Flament, C., Richard, C., Daillère, R., Fluckiger, A., Van Seuningen, I., Chamaillard, M., Vincent, A., Kourula, S., Opolon, P., Ly, P., Pizzato, E., Becharef, S., **Paillet, J.**, Klein, C., Marliot, F., Pietrantonio, F., Benoist, S., Scoazec, J., Dartigues, P., Hollebecque, A., Malka, D., Pagès, F., Galon, J., Boneca, I.G., Lepage, P., Ryffel, B., Raoult, D., Eggermont, A., Vanden Berghe, T., Ghiringhelli, F., Vandenabeele, P., Kroemer, G., Zitvogel, L., 2020. Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer. Nature Med.

Humeau, J., Sauvat, A., Cerrato, G., Loos, F., Iannantuoni, F., Bezu, L., Levesques, S., **Paillet, J.**, Pol, J.G, Stoll, G., Leduc, M., de Thé, H., Kepp, O., Kroemer, G., 2020. Inhibition of transcription by dactinomycin reveals a new characteristic of immunogenic cell stress. EMBO Mol. Med. 12, e11622.

Le Naour, J., Liu, P., Zhao, L., Adjemian, S., Sauvat, A., Cerrato, G., Taieb, J., Mulot, C., Sztupinszki, Z., Stoll, G., **Paillet, J.**, Castoldi, F., Martins, I., Kepp, O., Maiuri, M.C., Pietrocola, F., Vandenabeele, P., André, F., Delaloge, S., Szallasi, Z., Puig, P., Zucman-Rossi, J., Zitvogel, L., Pol, J.G., Vacchelli, E., Kroemer, G., 2020. A TLR3 ligand reestablishes chemotherapeutic responses in the context of FPR1 deficiency. (*En révision chez Cancer Discovery*)

Participation à des revues

Paillet, J., Kroemer, G., 2019. Autophagy represses hepatic carcinogenesis. Mol. Cell. Oncol. 6, 1573080.

Pol, J.G., Caudana, P., **Paillet, J.**, Piaggio, E., Kroemer, G., 2020. Effects of interleukin-2 in immunostimulation and immunosuppression. J. Exp. Med. 217, e20191247.

Paillet, J., Kroemer, G., Pol, J.G., 2020. Immune contexture of cholangiocarcinoma. Curr. Opin. Gastroenterol. 36, 70–76.

Bibliographie

1. Pizeta, J. Clinically Oriented ANATOMY Seventh Edition.
2. López-Terrada, D. *et al.* Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod. Pathol.* **27**, 472–491 (2014).
3. Abdel-Misih, S. R. Z. & Bloomston, M. Liver Anatomy. *Surg. Clin. North Am.* **90**, 643–653 (2010).
4. Trefts, E., Gannon, M. & Wasserman, D. H. The liver. *Curr. Biol.* **27**, R1147–R1151 (2017).
5. Strunk, H., Stuckmann, G., Textor, J. & Willinek, W. Limitations and pitfalls of Couinaud's segmentation of the liver in transaxial Imaging. *Eur. Radiol.* **13**, 2472–2482 (2003).
6. Ben-Moshe, S. & Itzkovitz, S. Spatial heterogeneity in the mammalian liver. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 395–410 (2019).
7. Rogers, A. B. & Dintzis, R. Z. 13 - Liver and Gallbladder. in *Comparative Anatomy and Histology* (eds. Treuting, P. M. & Dintzis, S. M.) 193–201 (Academic Press, 2012). doi:10.1016/B978-0-12-381361-9.00013-5.
8. Gebhardt, R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol. Ther.* **53**, 275–354 (1992).
9. Roskams, T. A. *et al.* Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: Canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* **39**, 1739–1745 (2004).
10. de Jong, I. E. M., van Leeuwen, O. B., Lisman, T., Gouw, A. S. H. & Porte, R. J. Repopulating the biliary tree from the peribiliary glands. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1864**, 1524–1531 (2018).
11. Racanelli, V. & Rehermann, B. The liver as an immunological organ. *Hepatol. Baltim. Md* **43**, S54-62 (2006).
12. Gissen, P. & Arias, I. M. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J. Hepatol.* **63**, 1023–1037 (2015).
13. Adams, D. H. & Eksteen, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 244–251 (2006).
14. Tabibian, J. H., Masyuk, A. I., Masyuk, T. V., O'Hara, S. P. & LaRusso, N. F. Physiology of cholangiocytes. *Compr. Physiol.* **3**, 541–565 (2013).
15. Kanno, N., LeSage, G., Glaser, S., Alvaro, D. & Alpini, G. Functional heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium. *Hepatology* **31**, 555–561 (2000).
16. Benedetti, A., Bassotti, C., Rapino, K., Marucci, L. & Jezequel, A. M. A morphometric study of the epithelium lining the rat intrahepatic biliary tree. *J. Hepatol.* **24**, 335–342 (1996).
17. Alpini, G. *et al.* Large but not small intrahepatic bile ducts are involved in secretin-regulated ductal bile secretion. *Am. J. Physiol.* **272**, G1064-1074 (1997).
18. Alpini, G. *et al.* Functional expression of the apical Na+-dependent bile acid transporter in large but not small rat cholangiocytes. *Gastroenterology* **113**, 1734–1740 (1997).
19. Alpini, G. *et al.* Bile acids stimulate proliferative and secretory events in large but not small cholangiocytes. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **273**, G518–G529 (1997).
20. Charlotte, F. *et al.* Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am. J. Pathol.* **144**, 460–465 (1994).
21. Katayanagi, K. *et al.* Generation of monoclonal antibodies to murine bile duct epithelial cells: Identification of annexin V as a new marker of small intrahepatic bile ducts. *Hepatology* **29**, 1019–1025 (1999).
22. Vekemans, K. & Braet, F. Structural and functional aspects of the liver and liver sinusoidal cells in relation to colon carcinoma metastasis. *World J. Gastroenterol. WJG* **11**, 5095–5102 (2005).
23. Dixon, L. J., Barnes, M., Tang, H., Pritchard, M. T. & Nagy, L. E. Kupffer Cells in the Liver. *Compr. Physiol.* **3**, 785–797 (2013).
24. Nguyen-Lefebvre, A. T. & Horuzsko, A. Kupffer Cell Metabolism and Function. *J. Enzymol. Metab.* **1**, (2015).
25. Hinglais, N., Kazatchkine, M. D., Mandet, C., Appay, M. D. & Bariety, J. Human liver Kupffer cells express CR1, CR3, and CR4 complement receptor antigens. An immunohistochemical study. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **61**, 509–514 (1989).
26. Schlaf, G. *et al.* Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. *Histol. Histopathol.* **18**, 299–308 (2003).
27. Helmy, K. Y. *et al.* CRIg: A Macrophage Complement Receptor Required for Phagocytosis of Circulating Pathogens. *Cell* **124**, 915–927 (2006).

28. Bruggeman, C. W. *et al.* Tissue-specific expression of IgG receptors by human macrophages ex vivo. *PLoS ONE* **14**, (2019).
29. van Egmond, M. *et al.* FcαRI-positive liver Kupffer cells: Reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat. Med.* **6**, 680–685 (2000).
30. Yan, J. *et al.* Critical role of Kupffer cell CR3 (CD11b/CD18) in the clearance of IgM-opsonized erythrocytes or soluble beta-glucan. *Immunopharmacology* **46**, 39–54 (2000).
31. Knolle, P. *et al.* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J. Hepatol.* **22**, 226–229 (1995).
32. Roth, S., Gong, W. & Gressner, A. M. Expression of different isoforms of TGF-beta and the latent TGF-beta binding protein (LTBP) by rat Kupffer cells. *J. Hepatol.* **29**, 915–922 (1998).
33. Movita, D. *et al.* Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 723–733 (2012).
34. Mosser, D. M. & Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol. Rev.* **226**, 205–218 (2008).
35. Liu, Z.-J. *et al.* Up-regulation of IRAK-M is essential for endotoxin tolerance induced by a low dose of lipopolysaccharide in Kupffer cells. *J. Surg. Res.* **150**, 34–39 (2008).
36. Kinoshita, M. *et al.* Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J. Hepatol.* **53**, 903–910 (2010).
37. Luo, P. *et al.* Divergent Roles of Kupffer Cell TLR2/3 Signaling in Alcoholic Liver Disease and the Protective Role of EGCG. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 145–160 (2020).
38. Hogaboam, C. M. *et al.* Macrophage inflammatory protein-2 gene therapy attenuates adenovirus- and acetaminophen-mediated hepatic injury. *Gene Ther.* **6**, 573–584 (1999).
39. Kolios, G., Valatas, V. & Kouroumalis, E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **12**, 7413–7420 (2006).
40. Sato, A. *et al.* Involvement of the TNF and FasL Produced by CD11b Kupffer Cells/Macrophages in CCl4-Induced Acute Hepatic Injury. *PLoS ONE* **9**, (2014).
41. Nakashima, H. *et al.* Superoxide produced by Kupffer cells is an essential effector in concanavalin A–induced hepatitis in mice. *Hepatology* **48**, 1979–1988 (2008).
42. Gao, B. Basic liver immunology. *Cell. Mol. Immunol.* **13**, 265–266 (2016).
43. Freitas-Lopes, M. A., Mafra, K., David, B. A., Carvalho-Gontijo, R. & Menezes, G. B. Differential Location and Distribution of Hepatic Immune Cells. *Cells* **6**, 48 (2017).
44. Bendelac, A. *et al.* CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**, 863–865 (1995).
45. Eberl, G. *et al.* Tissue-Specific Segregation of CD1d-Dependent and CD1d-Independent NK T Cells. *J. Immunol.* **162**, 6410–6419 (1999).
46. Exley, M. A. & Koziel, M. J. To be or not to be NKT: Natural killer T cells in the liver. *Hepatology* **40**, 1033–1040 (2004).
47. Hammerich, L. & Tacke, F. Role of gamma-delta T cells in liver inflammation and fibrosis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 107–113 (2014).
48. Morita, C. T., Mariuzza, R. A. & Brenner, M. B. Antigen recognition by human γδ T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin. Immunopathol.* **22**, 191–217 (2000).
49. Das, H., Sugita, M. & Brenner, M. B. Mechanisms of Vδ1 γδ T Cell Activation by Microbial Components. *J. Immunol.* **172**, 6578–6586 (2004).
50. Roark, C. E. *et al.* Liver gamma delta T cells. TCR junctions reveal differences in heat shock protein-60-reactive cells in liver and spleen. *J. Immunol.* **150**, 4867–4875 (1993).
51. Kalra, A. & Tuma, F. *Physiology, Liver*. (StatPearls Publishing, 2018).
52. Boyer, J. L. Bile Formation and Secretion. *Compr. Physiol.* **3**, 1035–1078 (2013).
53. Poupon, R., Chignard, N., Rosmorduc, O., Barbu, V. & Housset, C. La fonction biliaire et sa régulation. *médecine/sciences* **20**, 1096–1099 (2004).
54. Alpini, G. *et al.* Regulation of cholanglocyte apical bile acid transporter (ABAT) activity by biliary bile acids: Different potential compensatory changes for intrahepatic and extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* **120**, A2 (2001).
55. Grant, D. M. Detoxification Pathways in the Liver. in *Journal of Inherited Metabolic Disease* (eds. Harkness, R. A., Pollitt, R. J. & Addison, G. M.) 421–430 (Springer Netherlands, 1991). doi:10.1007/978-94-011-9749-6_2.
56. Liska, D. J. The Detoxification Enzyme Systems. *Altern. Med. Rev.* **3**, 13 (1998).
57. D'Ambrosio, D. N., Clugston, R. D. & Blaner, W. S. Vitamin A Metabolism: An Update. *Nutrients* **3**, 63–103 (2011).
58. Keane, J. T., Elangovan, H., Stokes, R. A. & Gunton, J. E. Vitamin D and the Liver—Correlation or Cause? *Nutrients* **10**, (2018).
59. Tissandié, E., Guéguen, Y., A. Lobaccaro, J.-M., Aigueperse, J. & Souidi, M. Vitamine D :

Métabolisme, régulation et maladies associées. *MS Médecine Sci. ISSN Pap. 0767-0974 ISSN Numér. 1958-5381 2006 Vol 22 N° 12 P 1095-1100* (2006) doi:10.1051/medsci/200622121095.
60. Schmölz, L., Birringer, M., Lorkowski, S. & Wallert, M. Complexity of vitamin E metabolism. *World J. Biol. Chem.* **7**, 14–43 (2016).
61. Brigelius-Flohé, R. & Traber, M. G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **13**, 1145–1155 (1999).
62. Shearer, M. J. & Newman, P. Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemost.* **100**, 530–547 (2008).
63. Shearer, M. J., Fu, X. & Booth, S. L. Vitamin K Nutrition, Metabolism, and Requirements: Current Concepts and Future Research12. *Adv. Nutr.* **3**, 182–195 (2012).
64. Mitra, V. & Metcalf, J. Metabolic functions of the liver. *Anaesth. Intensive Care Med.* **10**, 334–335 (2009).
65. Adeva-Andany, M. M., Pérez-Felpete, N., Fernández-Fernández, C., Donapetry-García, C. & Pazos-García, C. Liver glucose metabolism in humans. *Biosci. Rep.* **36**, (2016).
66. Rui, L. Energy Metabolism in the Liver. *Compr. Physiol.* **4**, 177–197 (2014).
67. Dhillon, K. K. & Gupta, S. Biochemistry, Ketogenesis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
68. Feingold, K. R. & Grunfeld, C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. in *Endotext* (eds. Feingold, K. R. et al.) (MDText.com, Inc., 2000).
69. Charlton-Menys, V. & Durrington, P. N. Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Exp. Physiol.* **93**, 27–42 (2008).
70. Chiang, J. Liver Physiology: Metabolism and Detoxification. in (2014). doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.04202-7.
71. Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L. & Bale, W. F. THE DOMINANT ROLE OF THE LIVER IN PLASMA PROTEIN SYNTHESIS. *J. Exp. Med.* **94**, 431–453 (1951).
72. Barmore, W. & Stone, W. L. Physiology, Urea Cycle. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
73. Berg, J. M., Tymoczko, J. L. & Stryer, L. The First Step in Amino Acid Degradation Is the Removal of Nitrogen. *Biochem. 5th Ed.* (2002).
74. Cordero-Espinoza, L. & Huch, M. The balancing act of the liver: tissue regeneration versus fibrosis. *J. Clin. Invest.* **128**, 85–96.
75. Taub, R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 836–847 (2004).
76. Dabeva, M. D. & Shafritz, D. A. Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration. *Am. J. Pathol.* **143**, 1606–1620 (1993).
77. Selzner, N. *et al.* ICAM-1 triggers liver regeneration through leukocyte recruitment and Kupffer cell–dependent release of TNF-α/IL-6 in mice. *Gastroenterology* **124**, 692–700 (2003).
78. Cornell, R. P., Liljequist, B. L. & Bartizal, K. F. Depressed liver regeneration after partial hepatectomy of germ-free, athymic and lipopolysaccharide-resistant mice. *Hepatology* **11**, 916–922 (1990).
79. Huh, C.-G. *et al.* Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4477–4482 (2004).
80. Raven, A. *et al.* Cholangiocytes act as Facultative Liver Stem Cells during Impaired Hepatocyte Regeneration. *Nature* **547**, 350–354 (2017).
81. Thomas, D. & Zoulim, F. New challenges in viral hepatitis. *Gut* **61 Suppl 1**, i1-5 (2012).
82. Botelho-Souza, L. F., Vasconcelos, M. P. A., dos Santos, A. de O., Salcedo, J. M. V. & Vieira, D. S. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol. J.* **14**, (2017).
83. Minemura, M., Tajiri, K. & Shimizu, Y. Liver involvement in systemic infection. *World J. Hepatol.* **6**, 632–642 (2014).
84. Pietrangelo, A. Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. *Gastroenterology* **139**, 393-408.e2 (2010).
85. Bouzidi, H., Majdoub, A., Daudon, M. & Najjar, M. F. Hyperoxalurie primitive : une revue de la littérature. *Néphrologie Thérapeutique* **12**, 431–436 (2016).
86. Wilson disease. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 1–1 (2018).
87. Hazari, Y. M. *et al.* Alpha-1-antitrypsin deficiency: Genetic variations, clinical manifestations and therapeutic interventions. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **773**, 14–25 (2017).
88. Mieli-Vergani, G. *et al.* Autoimmune hepatitis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 1–21 (2018).
89. Floreani, A. *et al.* Etiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J. Autoimmun.* **95**, 133–143 (2018).
90. Yang, J. D. & Roberts, L. R. Hepatocellular carcinoma: a global view. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 448–458 (2010).
91. El–Serag, H. B. & Rudolph, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. *Gastroenterology* **132**, 2557–2576 (2007).
92. Thomeer, M. G. *et al.* Hepatocellular adenoma: when and how to treat? Update of current evidence. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **9**, 898–912 (2016).

93. Idilman, I. S., Ozdeniz, I. & Karcaaltincaba, M. Hepatic Steatosis: Etiology, Patterns, and Quantification. *Semin. Ultrasound CT MRI* **37**, 501–510 (2016).
94. Michelotti, G. A., Machado, M. V. & Diehl, A. M. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 656–665 (2013).
95. Wree, A., Broderick, L., Canbay, A., Hoffman, H. M. & Feldstein, A. E. From NAFLD to NASH to cirrhosis—new insights into disease mechanisms. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **10**, 627–636 (2013).
96. Drew, L. Fighting the fatty liver. *Nature* **550**, S102–S103 (2017).
97. Liu, Y. *et al.* Inhibition of PDGF, TGF-β, and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J. Hepatol.* **55**, 612–625 (2011).
98. Liu, Y. *et al.* Therapeutic targeting of the PDGF and TGF- β -signaling pathways in hepatic stellate cells by PTK787/ZK22258. *Lab. Invest.* **89**, 1152–1160 (2009).
99. Sziksz, E. *et al.* Fibrosis Related Inflammatory Mediators: Role of the IL-10 Cytokine Family. *Mediators of Inflammation* https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/764641/ (2015) doi:https://doi.org/10.1155/2015/764641.
100. Hernandez-Gea, V. & Friedman, S. L. Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **6**, 425–456 (2011).
101. Kubes, P. & Jenne, C. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* **36**, 247–277 (2018).
102. Roche, S. P. & Kobos, R. Jaundice in the Adult Patient. *Am. Fam. Physician* **69**, 299–304 (2004).
103. Insuffisance hépatique. *AFEF - Société Française d'Hépatologie* https://afef.asso.fr/la-maladie/maladies/insuffisance-hepatique/.
104. Lleo, A., Marzorati, S., Anaya, J.-M. & Gershwin, M. E. Primary biliary cholangitis: a comprehensive overview. *Hepatol. Int.* **11**, 485–499 (2017).
105. Tsuneyama, K., Baba, H., Morimoto, Y., Tsunematsu, T. & Ogawa, H. Primary Biliary Cholangitis: Its Pathological Characteristics and Immunopathological Mechanisms. *J. Med. Invest.* **64**, 7–13 (2017).
106. Carey, E. J., Ali, A. H. & Lindor, K. D. Primary biliary cirrhosis. *The Lancet* **386**, 1565–1575 (2015).
107. Fussey, S. P. M., Bassendine, M. F., James, O. F. W. & Yeaman, S. J. Characterisation of the reactivity of autoantibodies in primary biliary cirrhosis. *FEBS Lett.* **246**, 49–53 (1989).
108. Fussey, S. P. M., Bassendine, M. F., James, O. F. W. & Yeaman, S. J. The Lipoate-Containing Domain of PDC E2 Contains the Main Immunogenic Region of the 70-kDa M2 Autoantigen in Primary Biliary Cirrhosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **573**, 444–446 (1989).
109. It, C. *et al.* Differential binding of pyruvate dehydrogenase complex-E2 epitopes by DRB1*08:01 and DRB1*11:01 Is predicted by their structural motifs and correlates with disease risk. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **190**, 4516–4524 (2013).
110. Shimoda, S. *et al.* Identification and precursor frequency analysis of a common T cell epitope motif in mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1831–1840 (1998).
111. Kita, H. *et al.* Quantitative and functional analysis of PDC-E2-specific autoreactive cytotoxic T lymphocytes in primary biliary cirrhosis. *J. Clin. Invest.* **109**, 1231–1240 (2002).
112. Kita, H. *et al.* Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 113–123 (2002).
113. Shimoda, S. *et al.* CD4 T-cell autoreactivity to the mitochondrial autoantigen PDC-E2 in AMA-negative primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **31**, 110–115 (2008).
114. Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y. & Nakanuma, Y. Increased expression of mitochondrial proteins associated with autophagy in biliary epithelial lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int. Off. J. Int. Assoc. Study Liver* **33**, 312–320 (2013).
115. Odin, J. A., Huebert, R. C., Casciola-Rosen, L., LaRusso, N. F. & Rosen, A. Bcl-2–dependent oxidation of pyruvate dehydrogenase-E2, a primary biliary cirrhosis autoantigen, during apoptosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 223–232 (2001).
116. Mao, T. K., Davis, P. A., Odin, J. A., Coppel, R. L. & Gershwin, M. E. Sidechain Biology and the Immunogenicity of PDC-E2, the Major Autoantigen of Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **40**, 1241–1248 (2004).
117. Matsumura, S. *et al.* Contribution to antimitochondrial antibody production: Cleavage of pyruvate dehydrogenase complex-E2 by apoptosis-related proteases. *Hepatology* **35**, 14–22 (2002).
118. Allina, J. *et al.* T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **27**, 232–241 (2006).
119. Ballardini, G. *et al.* ABERRANT EXPRESSION OF HLA-DR ANTIGENS ON BILEDUCT EPITHELIUM IN PRIMARY BILIARY CIRRHOSIS: RELEVANCE TO PATHOGENESIS. *The Lancet* **324**, 1009–1013 (1984).
120. Tsuneyama, K. *et al.* Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression. *Hepatology* **21**, 1031–1037 (1995).

121. Matsumura, S. *et al.* Caspase induction by IgA antimitochondrial antibody: IgA-mediated biliary injury in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **39**, 1415–1422 (2004).
122. Sasaki, M., Sato, Y. & Nakanuma, Y. An impaired biliary bicarbonate umbrella may be involved in dysregulated autophagy in primary biliary cholangitis. *Lab. Invest.* **98**, 745–754 (2018).
123. Rodrigues, P. M. *et al.* Primary biliary cholangitis: A tale of epigenetically-induced secretory failure? *J. Hepatol.* **69**, 1371–1383 (2018).
124. Banales, J. M. *et al.* Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl-/HCO3- anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **56**, 687–697 (2012).
125. Onji, M. & Furukawa, S. Significance of study on prevalence of AMA in healthy subjects. *J. Gastroenterol.* **39**, 306–308 (2004).
126. Shimoda, S. *et al.* Mimicry peptides of human PDC-E2 163-176 peptide, the immunodominant T-cell epitope of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **31**, 1212–1216 (2000).
127. Padgett, K. A. *et al.* Phylogenetic and immunological definition of four lipoylated proteins from Novosphingobium aromaticivorans, implications for primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **24**, 209–219 (2005).
128. Amano, K. *et al.* Chemical Xenobiotics and Mitochondrial Autoantigens in Primary Biliary Cirrhosis: Identification of Antibodies against a Common Environmental, Cosmetic, and Food Additive, 2-Octynoic Acid. *J. Immunol.* **174**, 5874–5883 (2005).
129. Gulamhusein, A. F., Juran, B. D. & Lazaridis, K. N. GWAS in Primary Biliary Cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* **35**, 392–401 (2015).
130. Akbar, S. M. *et al.* Peripheral blood T-cell responses to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: role of antigen-presenting dendritic cells. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 639–646 (2001).
131. You, Z. *et al.* The immunopathology of liver granulomas in primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **39**, 216–221 (2012).
132. Takahashi, T. *et al.* Plasma cells and the chronic nonsuppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **55**, 846–855 (2012).
133. Li, Y. *et al.* CXCL13 Promotes Intrahepatic CXCR5+ Lymphocyte Homing and Aberrant B Cell Immune Responses in Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1998–2007 (2015).
134. Wang, L. *et al.* CXCR5+ CD4+ T Follicular Helper Cells Participate in the Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 627–638 (2015).
135. Li, Y. *et al.* Cytotoxic KLRG1 expressing lymphocytes invade portal tracts in primary biliary cholangitis. *J. Autoimmun.* **103**, 102293 (2019).
136. Zhang, W. *et al.* T cell clonal expansions detected in patients with primary biliary cirrhosis express CX3CR1. *J. Autoimmun.* **37**, 71–78 (2011).
137. Isse, K. *et al.* Fractalkine and CX3CR1 are involved in the recruitment of intraepithelial lymphocytes of intrahepatic bile ducts. *Hepatology* **41**, 506–516 (2005).
138. Qian, C. *et al.* Increased IL-23 and IL-17 expression by peripheral blood cells of patients with primary biliary cirrhosis. *Cytokine* **64**, 172–180 (2013).
139. Yang, C.-Y. *et al.* IL-12/Th1 and IL-23/Th17 biliary microenvironment in primary biliary cirrhosis: implications for therapy. *Hepatol. Baltim. Md* **59**, 1944–1953 (2014).
140. Ma, W.-T. & Chen, D.-K. Immunological abnormalities in patients with primary biliary cholangitis. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **133**, 741–760 (2019).
141. Chuang, Y.-H. *et al.* Increased killing activity and decreased cytokine production in NK cells in patients with primary biliary cirrhosis. *J. Autoimmun.* **26**, 232–240 (2006).
142. Aso-Ishimoto, Y. *et al.* Increased activated natural killer T cells in the liver of patients with advancedstage primary biliary cirrhosis. *Biomed. Res.* **35**, 161–169 (2014).
143. Kita, H. *et al.* Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* **123**, 1031–1043 (2002).
144. Honda, Y. *et al.* Altered expression of TLR homolog RP105 on monocytes hypersensitive to LPS in patients with primary biliary cirrhosis. *J. Hepatol.* **47**, 404–411 (2007).
145. Shimoda, S. *et al.* Natural killer cells regulate T cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **62**, 1817–1827 (2015).
146. Peng, A. *et al.* Elevated circulating CD14lowCD16+ monocyte subset in primary biliary cirrhosis correlates with liver injury and promotes Th1 polarization. *Clin. Exp. Med.* **16**, 511–521 (2016).
147. Gulamhusein, A. F. & Hirschfield, G. M. Primary biliary cholangitis: pathogenesis and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 93–110 (2020).
148. Tsuneyama, K., Moritoki, Y., Kikuchi, K. & Nakanuma, Y. Pathological Features of New Animal Models for Primary Biliary Cirrhosis. *International Journal of Hepatology* https://www.hindawi.com/journals/ijh/2012/403954/ (2011) doi:https://doi.org/10.1155/2012/403954.

149. Wang, J. *et al.* Animal models of primary biliary cirrhosis. *Semin. Liver Dis.* **34**, 285–296 (2014).
150. Leung, P. S. C. *et al.* Animal models of primary biliary cirrhosis: materials and methods. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **900**, 291–316 (2012).
151. Concepcion, A. R. & Medina, J. F. Mouse models of primary biliary cirrhosis. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 2401–2413 (2015).
152. Concepcion, A. R. & Medina, J. F. Approaches to the pathogenesis of primary biliary cirrhosis through animal models. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **36**, 21–28 (2012).
153. Irie, J. *et al.* NOD.c3c4 congenic mice develop autoimmune biliary disease that serologically and pathogenetically models human primary biliary cirrhosis. *J. Exp. Med.* **203**, 1209–1219 (2006).
154. Koarada, S. *et al.* Genetic Control of Autoimmunity: Protection from Diabetes, but Spontaneous Autoimmune Biliary Disease in a Nonobese Diabetic Congenic Strain. *J. Immunol.* **173**, 2315–2323 (2004).
155. Oertelt, S. *et al.* Anti-mitochondrial antibodies and primary biliary cirrhosis in TGF-beta receptor II dominant-negative mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 1655–1660 (2006).
156. Yang, G.-X. *et al.* Adoptive transfer of CD8+ T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice. *Hepatology* **47**, 1974–1982 (2008).
157. Wakabayashi, K. *et al.* IL-2 receptor α−/− mice and the development of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* **44**, 1240–1249 (2006).
158. Salas, J. T. *et al.* Ae2a,b-Deficient Mice Develop Antimitochondrial Antibodies and Other Features Resembling Primary Biliary Cirrhosis. *Gastroenterology* **134**, 1482–1493 (2008).
159. Zhang, W. *et al.* Deficiency in regulatory T cells results in development of antimitochondrial antibodies and autoimmune cholangitis. *Hepatology* **49**, 545–552 (2009).
160. Hr, B. *et al.* Chronic expression of interferon-gamma leads to murine autoimmune cholangitis with a female predominance. *Hepatol. Baltim. Md* **64**, 1189–1201 (2016).
161. Wakabayashi, K. *et al.* Loss of tolerance in C57BL/6 mice to the autoantigen E2 subunit of pyruvate dehydrogenase by a xenobiotic with ensuing biliary ductular disease. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 531–540 (2008).
162. Wu, S.-J. *et al.* Innate immunity and primary biliary cirrhosis: Activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology* **53**, 915–925 (2011).
163. Mattner, J. *et al.* Liver Autoimmunity Triggered by Microbial Activation of Natural Killer T Cells. *Cell Host Microbe* **3**, 304–315 (2008).
164. Wang, J. J. *et al.* Escherichia coli infection induces autoimmune cholangitis and anti-mitochondrial antibodies in non-obese diabetic (NOD).B6 (Idd10/Idd18) mice. *Clin. Exp. Immunol.* **175**, 192–201 (2014).
165. Chang, C.-H. *et al.* Innate immunity drives xenobiotic-induced murine autoimmune cholangitis. *Clin. Exp. Immunol.* **177**, 373–380 (2014).
166. Hirschfield, G. M., Karlsen, T. H., Lindor, K. D. & Adams, D. H. Primary sclerosing cholangitis. *The Lancet* **382**, 1587–1599 (2013).
167. Dyson, J. K., Beuers, U., Jones, D. E. J., Lohse, A. W. & Hudson, M. Primary sclerosing cholangitis. *The Lancet* **391**, 2547–2559 (2018).
168. Karlsen, T. H., Folseraas, T., Thorburn, D. & Vesterhus, M. Primary sclerosing cholangitis – a comprehensive review. *J. Hepatol.* **67**, 1298–1323 (2017).
169. Hov, J. R., Boberg, K. M. & Karlsen, T. H. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J. Gastroenterol. WJG* **14**, 3781–3791 (2008).
170. Sebode, M. *et al.* Reduced FOXP3+ regulatory T cells in patients with primary sclerosing cholangitis are associated with IL2RA gene polymorphisms. *J. Hepatol.* **60**, 1010–1016 (2014).
171. Saich, R. & Chapman, R. Primary sclerosing cholangitis, autoimmune hepatitis and overlap syndromes in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol. WJG* **14**, 331–337 (2008).
172. Saarinen, S., Olerup, O. & Broomé, U. Increased frequency of autoimmune diseases in patients with primary sclerosing cholangitis. *Am. J. Gastroenterol.* **95**, 3195–3199 (2000).
173. Li, B., Selmi, C., Tang, R., Gershwin, M. E. & Ma, X. The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut–liver axis. *Cell. Mol. Immunol.* **15**, 595–609 (2018).
174. Kummen, M. *et al.* The gut microbial profile in patients with primary sclerosing cholangitis is distinct from patients with ulcerative colitis without biliary disease and healthy controls. *Gut* **66**, 611–619 (2017).
175. Sabino, J. *et al.* Primary sclerosing cholangitis is characterised by intestinal dysbiosis independent from IBD. *Gut* **65**, 1681–1689 (2016).
176. Chassaing, B., Etienne-Mesmin, L. & Gewirtz, A. T. Microbiota-liver axis in hepatic disease. *Hepatology* **59**, 328–339 (2014).
177. Terjung, B. *et al.* p-ANCAs in autoimmune liver disorders recognise human β-tubulin isotype 5 and cross-react with microbial protein FtsZ. *Gut* **59**, 808–816 (2010).
178. Seidel, D. *et al.* CD8 T cells primed in the gut-associated lymphoid tissue induce immune-mediated cholangitis in mice. *Hepatology* **59**, 601–611 (2014).

179. Henriksen, E. K. K. *et al.* Gut and liver T-cells of common clonal origin in primary sclerosing cholangitis-inflammatory bowel disease. *J. Hepatol.* **66**, 116–122 (2017).
180. Eksteen, B. *et al.* Hepatic Endothelial CCL25 Mediates the Recruitment of CCR9+ Gut-homing Lymphocytes to the Liver in Primary Sclerosing Cholangitis. *J. Exp. Med.* **200**, 1511–1517 (2004).
181. Sayin, S. I. *et al.* Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.* **17**, 225–235 (2013).
182. Davies, Y. K. *et al.* Long-term Treatment of Primary Sclerosing Cholangitis in Children With Oral Vancomycin: An Immunomodulating Antibiotic. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **47**, 61–67 (2008).
183. Melum, E. *et al.* Genome-wide association analysis in primary sclerosing cholangitis identifies two non-HLA susceptibility loci. *Nat. Genet.* **43**, 17–19 (2011).
184. Janse, M. *et al.* Three ulcerative colitis susceptibility loci are associated with primary sclerosing cholangitis and indicate a role for IL2, REL, and CARD9. *Hepatol. Baltim. Md* **53**, 1977–1985 (2011).
185. Li, X., Shen, J. & Ran, Z. Crosstalk between the gut and the liver via susceptibility loci: Novel advances in inflammatory bowel disease and autoimmune liver disease. *Clin. Immunol.* **175**, 115–123 (2017).
186. Fickert, P. *et al.* Characterization of animal models for primary sclerosing cholangitis (PSC). *J. Hepatol.* **60**, 1290–1303 (2014).
187. Pollheimer, M. J. & Fickert, P. Animal Models in Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **48**, 207–217 (2015).
188. Pollheimer, M. J., Trauner, M. & Fickert, P. Will we ever model PSC? - 'it's hard to be a PSC model!' *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **35**, 792–804 (2011).
189. Fickert, P. *et al.* Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology* **127**, 261–274 (2004).
190. Durie, P. R., Kent, G., Phillips, M. J. & Ackerley, C. A. Characteristic Multiorgan Pathology of Cystic Fibrosis in a Long-Living Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Knockout Murine Model. *Am. J. Pathol.* **164**, 1481–1493 (2004).
191. Libbrecht, L. *et al.* Liver pathology and hepatocarcinogenesis in a long-term mouse model of erythropoietic protoporphyria. *J. Pathol.* **199**, 191–200 (2003).
192. Kireva, T. *et al.* Transcription factor Fra-1 induces cholangitis and liver fibrosis. *Hepatology* **53**, 1287–1297 (2011).
193. Nakagawa, H. *et al.* Loss of liver E-cadherin induces sclerosing cholangitis and promotes carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 1090–1095 (2014).
194. Mead, J. R., Arrowood, M. J., Sidwell, R. W. & Healey, M. C. Chronic Cryptosporidium parvum Infections in Congenitally Immunodeficient SCID and Nude Mice. *J. Infect. Dis.* **163**, 1297–1304 (1991).
195. Stephens, J., Cosyns, M., Jones, M. & Hayward, A. Liver and bile duct pathology following Cryptosporidium parvum infection of immunodeficient mice. *Hepatology* **30**, 27–35 (1999).
196. Ungar, B. L., Burris, J. A., Quinn, C. A. & Finkelman, F. D. New mouse models for chronic Cryptosporidium infection in immunodeficient hosts. *Infect. Immun.* **58**, 961–969 (1990).
197. Ward, J. M., Anver, M. R., Haines, D. C. & Benveniste, R. E. Chronic active hepatitis in mice caused by Helicobacter hepaticus. *Am. J. Pathol.* **145**, 959–968 (1994).
198. Avenaud, P. *et al.* Natural History of Helicobacter hepaticus Infection in Conventional A/J Mice, with Special Reference to Liver Involvement. *Infect. Immun.* **71**, 3667–3672 (2003).
199. Georgiev, P. *et al.* Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation. *BJS Br. J. Surg.* **95**, 646–656 (2008).
200. Tag, C. G. *et al.* Bile Duct Ligation in Mice: Induction of Inflammatory Liver Injury and Fibrosis by Obstructive Cholestasis. *J. Vis. Exp. JoVE* (2015) doi:10.3791/52438.
201. Fickert, P. *et al.* A new xenobiotic-induced mouse model of sclerosing cholangitis and biliary fibrosis. *Am. J. Pathol.* **171**, 525–536 (2007).
202. Fickert, P. *et al.* Lithocholic Acid Feeding Induces Segmental Bile Duct Obstruction and Destructive Cholangitis in Mice. *Am. J. Pathol.* **168**, 410–422 (2006).
203. Numata, Y., Tazuma, S., Nishioka, T., Ueno, Y. & Chayama, K. Immune response in mouse experimental cholangitis associated with colitis induced by dextran sulfate sodium. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**, 910–915 (2004).
204. Nonomura, A., Koizumi, H., Yoshida, K. & Ohta, G. Histological Changes of Bile Duct in Experimental Graft-Versus-Host Disease Across Minor Histocompatibility Barriers. *Pathol. Int.* **37**, 763–773 (1987).
205. Nonomura, A., Kono, N., Minato, H. & Nakanuma, Y. Diffuse biliary tract involvement mimicking primary sclerosing cholangitis in an experimental model of chronic graft-versus-host disease in mice. *Pathol. Int.* **48**, 421–427 (1998).
206. Banales, J. M. *et al.* Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **13**, 261–280 (2016).

207. Aishima, S. & Oda, Y. Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type. *J. Hepato-Biliary-Pancreat. Sci.* **22**, 94–100 (2015).
208. Razumilava, N. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma. *The Lancet* **383**, 2168–2179 (2014).
209. Rizvi, S., Khan, S. A., Hallemeier, C. L., Kelley, R. K. & Gores, G. J. Cholangiocarcinoma — evolving concepts and therapeutic strategies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 95–111 (2018).
210. Sugihara, T., Isomoto, H., Gores, G. & Smoot, R. YAP and the Hippo pathway in cholangiocarcinoma. *J. Gastroenterol.* **54**, 485–491 (2019).
211. Rizvi, S. & Gores, G. J. Emerging Molecular Therapeutic Targets for Cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* **67**, 632–644 (2017).
212. Mohr, R. *et al.* In Vivo Models for Cholangiocarcinoma—What Can We Learn for Human Disease? *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
213. Loeuillard, E., Fischbach, S. R., Gores, G. J. & Rizvi, S. Animal Models of Cholangiocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1865**, 982–992 (2019).
214. Xu, X. *et al.* Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 1843–1852 (2006).
215. Ikenoue, T. *et al.* A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
216. Saha, S. K. *et al.* Mutant IDH inhibits HNF4α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer. *Nature* **513**, 110–114 (2014).
217. O'Dell, M. R. *et al.* KrasG12D and p53 mutation cause primary intra-hepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res.* **72**, 1557–1567 (2012).
218. Farazi, P. A. *et al.* Chronic bile duct injury associated with fibrotic matrix microenvironment provokes cholangiocarcinoma in p53-deficient mice. *Cancer Res.* **66**, 6622–6627 (2006).
219. Kiguchi, K. *et al.* Constitutive expression of ErbB-2 in gallbladder epithelium results in development of adenocarcinoma. *Cancer Res.* **61**, 6971–6976 (2001).
220. Zender, S. *et al.* A critical role for notch signaling in the formation of cholangiocellular carcinomas. *Cancer Cell* **23**, 784–795 (2013).
221. Yamada, D. *et al.* IL-33 facilitates oncogene-induced cholangiocarcinoma in mice by an interleukin-6-sensitive mechanism. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1627–1642 (2015).
222. Fan, B. *et al.* Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 2911–2915 (2012).
223. Gürlevik, E. *et al.* Adjuvant gemcitabine therapy improves survival in a locally induced, R0-resectable model of metastatic intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatology* **58**, 1031–1041 (2013).
224. Yang, H. *et al.* A Mouse Model of Cholestasis-Associated Cholangiocarcinoma and Transcription Factors Involved in Progression. *Gastroenterology* **141**, 378-388.e4 (2011).
225. Umemura, T. *et al.* Pentachlorophenol (but not phenobarbital) promotes intrahepatic biliary cysts induced by diethylnitrosamine to cholangio cystic neoplasms in B6C3F1 mice possibly due to oxidative stress. *Toxicol. Pathol.* **31**, 10–13 (2003).
226. Garcia, P. L. *et al.* JQ1 Induces DNA Damage and Apoptosis, and Inhibits Tumor Growth in a Patient-Derived Xenograft Model of Cholangiocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 107–118 (2018).
227. Rizvi, S. *et al.* YAP-associated chromosomal instability and cholangiocarcinoma in mice. *Oncotarget* **9**, 5892–5905 (2018).
228. Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. & Abbas, A. K. Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2228–2233 (2015).
229. Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. & Jameson, S. C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 772–782 (2005).
230. Marrack, P., Ignatowicz, L., Kappler, J. W., Boymel, J. & Freed, J. H. Comparison of peptides bound to spleen and thymus class II. *J. Exp. Med.* **178**, 2173–2183 (1993).
231. Alam, S. M. *et al.* T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* **381**, 616–620 (1996).
232. Hogquist, K. A. *et al.* T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76**, 17–27 (1994).
233. Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G. & Kyewski, B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 833–844 (2009).
234. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**, 1032–1039 (2001).
235. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central Tolerance to Tissue-specific Antigens Mediated by Direct and Indirect Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* **200**, 1039–1049 (2004).
236. Lamhamedi-Cherradi, S.-E., Zheng, S.-J., Maguschak, K. A., Peschon, J. & Chen, Y. H. Defective

thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL −/− mice. *Nat. Immunol.* **4**, 255–260 (2003).
237. An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J. Exp. Med.* **182**, 1377–1388 (1995).
238. Buhlmann, J. E., Elkin, S. K. & Sharpe, A. H. A Role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 Pathway During Negative Selection. *J. Immunol.* **170**, 5421–5428 (2003).
239. Gao, J.-X. *et al.* Perinatal Blockade of B7-1 and B7-2 Inhibits Clonal Deletion of Highly Pathogenic Autoreactive T Cells. *J. Exp. Med.* **195**, 959–971 (2002).
240. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 Costimulation Is Essential for the Homeostasis of the CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells that Control Autoimmune Diabetes. *Immunity* **12**, 431–440 (2000).
241. Jordan, M. S. *et al.* Thymic selection of CD4 + CD25 + regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**, 301–306 (2001).
242. Banerjee, S. & Chapman, S. J. Influence of correlated antigen presentation on T-cell negative selection in the thymus. *J. R. Soc. Interface* **15**, (2018).
243. Handel, A. E., Irani, S. R. & Holländer, G. A. The role of thymic tolerance in CNS autoimmune disease. *Nat. Rev. Neurol.* **14**, 723–734 (2018).
244. Halverson, R., Torres, R. M. & Pelanda, R. Receptor editing is the main mechanism of B cell tolerance toward membrane antigens. *Nat. Immunol.* **5**, 645–650 (2004).
245. Nemazee, D. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 728–740 (2006).
246. Nemazee, D. A. & Bürki, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562–566 (1989).
247. Basten, A. & Silveira, P. A. B-cell tolerance: mechanisms and implications. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 566–574 (2010).
248. Liu, Y. *et al.* Regulatory CD4+ T Cells Promote B Cell Anergy in Murine Lupus. *J. Immunol.* **192**, 4069–4073 (2014).
249. Goodnow, C. C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676–682 (1988).
250. Rathmell, J. C., Townsend, S. E., Xu, J. C., Flavell, R. A. & Goodnow, C. C. Expansion or Elimination of B Cells In Vivo: Dual Roles for CD40- and Fas (CD95)-Ligands Modulated by the B Cell Antigen Receptor. *Cell* **87**, 319–329 (1996).
251. Oliver, P. M., Vass, T., Kappler, J. & Marrack, P. Loss of the proapoptotic protein, Bim, breaks B cell anergy. *J. Exp. Med.* **203**, 731–741 (2006).
252. Kamradt, T. & Mitchison, N. A. Tolerance and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* **344**, 655–664 (2001).
253. Naquet, P. *et al.* T cell autoreactivity to insulin in diabetic and related non-diabetic individuals. *J. Immunol.* **140**, 2569–2578 (1988).
254. Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y. & Jenkins, M. K. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* **1**, 327–339 (1994).
255. Akkaraju, S. *et al.* A Range of CD4 T Cell Tolerance: Partial Inactivation to Organ-Specific Antigen Allows Nondestructive Thyroiditis or Insulitis. *Immunity* **7**, 255–271 (1997).
256. Malhotra, D. *et al.* Tolerance is established in polyclonal CD4 + T cells by distinct mechanisms, according to self-peptide expression patterns. *Nat. Immunol.* **17**, 187–195 (2016).
257. Ohashi, P. S. *et al.* Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* **65**, 305–317 (1991).
258. Mogil, R. J. *et al.* Fas (CD95) participates in peripheral T cell deletion and associated apoptosis in vivo. *Int. Immunol.* **7**, 1451–1458 (1995).
259. Garrone, P. *et al.* Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **182**, 1265–1273 (1995).
260. Dhein, J., Walczak, H., Bäumler, C., Debatin, K.-M. & Krammer, P. H. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438–441 (1995).
261. Appleman, L. J. & Boussiotis, V. A. T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.* **192**, 161–180 (2003).
262. You, Q., Cheng, L., Kedl, R. M. & Ju, C. Mechanism of T Cell Tolerance Induction by Murine Hepatic Kupffer Cells. *Hepatol. Baltim. Md* **48**, 978–990 (2008).
263. Gao, B., Jeong, W.-I. & Tian, Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* **47**, 729–736 (2008).
264. Sun, Y., Liu, J., Qian, F. & Xu, Q. Nitric oxide inhibits T cell adhesion and migration by down-regulation of β1-integrin expression in immunologically liver-injured mice. *Int. Immunopharmacol.* **6**, 616–626 (2006).
265. Yan, M.-L., Wang, Y.-D., Tian, Y.-F., Lai, Z.-D. & Yan, L.-N. Inhibition of allogeneic T-cell response by

Kupffer cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *World J. Gastroenterol.* **16**, 636–640 (2010).
266. Zhang, M., Xu, S., Han, Y. & Cao, X. Apoptotic cells attenuate fulminant hepatitis by priming Kupffer cells to produce interleukin-10 through membrane-bound TGF-β. *Hepatology* **53**, 306–316 (2011).
267. Wang, Y. *et al.* The Liver Mediates Apoptotic Cell-Induced Immune Regulation. *Scand. J. Immunol.* **68**, 297–305 (2008).
268. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 23–35 (2003).
269. Mantovani, Alberto, Sica, Antonio & Locati, M. Macrophage Polarization Comes of Age. *Immunity* **23**, 344–346 (2005).
270. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 4560–4565 (2004).
271. Dalton, D. K. *et al.* Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon-γ Genes. *Science* **259**, 1739–1742 (1993).
272. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686 (2004).
273. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
274. Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A. & Mosser, D. M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298–1307 (2006).
275. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969 (2008).
276. Hart, P. H. *et al.* Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and prostaglandin E2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3803–3807 (1989).
277. Zhang, M.-Z. *et al.* IL-4/IL-13–mediated polarization of renal macrophages/dendritic cells to an M2a phenotype is essential for recovery from acute kidney injury. *Kidney Int.* **91**, 375–386 (2017).
278. Hesse, M. *et al.* Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of l-Arginine Metabolism. *J. Immunol.* **167**, 6533–6544 (2001).
279. Gao, J. L. *et al.* Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J. Exp. Med.* **185**, 1959–1968 (1997).
280. Gratchev, A. *et al.* Alternatively Activated Macrophages Differentially Express Fibronectin and Its Splice Variants and the Extracellular Matrix Protein βIG-H3. *Scand. J. Immunol.* **53**, 386–392 (2001).
281. Chizzolini, C., Rezzonico, R., Luca, C. D., Burger, D. & Dayer, J.-M. Th2 Cell Membrane Factors in Association with IL-4 Enhance Matrix Metalloproteinase-1 (MMP-1) While Decreasing MMP-9 Production by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Differentiated Human Monocytes. *J. Immunol.* **164**, 5952–5960 (2000).
282. Nathan, C. & Shiloh, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8841–8848 (2000).
283. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 453–461 (2008).
284. Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P. & Mosser, D. M. Reversal of Proinflammatory Responses by Ligating the Macrophage Fcγ Receptor Type I. *J. Exp. Med.* **188**, 217–222 (1998).
285. Anderson, C. F. & Mosser, D. M. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 101–106 (2002).
286. Anderson, C. F. & Mosser, D. M. Cutting Edge: Biasing Immune Responses by Directing Antigen to Macrophage Fcγ Receptors. *J. Immunol.* **168**, 3697–3701 (2002).
287. Bogdan, C., Paik, J., Vodovotz, Y. & Nathan, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J. Biol. Chem.* **267**, 23301–23308 (1992).
288. Tu, G. *et al.* Glucocorticoid attenuates acute lung injury through induction of type 2 macrophage. *J. Transl. Med.* **15**, 181 (2017).
289. Garcia-Hernandez, M. de la L. *et al.* Adoptive Transfer of Tumor-Specific Tc17 Effector T Cells Controls the Growth of B16 Melanoma in Mice. *J. Immunol.* **184**, 4215–4227 (2010).
290. Tang, L. *et al.* M2A and M2C Macrophage Subsets Ameliorate Inflammation and Fibroproliferation in Acute Lung Injury Through Interleukin 10 Pathway. *Shock* **48**, 119–129 (2017).
291. Lurier, E. B. *et al.* Transcriptome analysis of IL-10-stimulated (M2c) macrophages by next-generation sequencing. *Immunobiology* **222**, 847–856 (2017).
292. Jetten, N. *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118 (2014).

293. Herbert, D. R. *et al.* Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. *Immunity* **20**, 623–635 (2004).
294. Sohn, W. *et al.* Lactobacillus paracasei Induces M2-Dominant Kupffer Cell Polarization in a Mouse Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3340–3350 (2015).
295. Wan, J. *et al.* M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: A protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **59**, 130–142 (2014).
296. Zhao, Z. *et al.* IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization. *Transplantation* **102**, e265 (2018).
297. Sun, Z. *et al.* Hepatic allograft-derived Kupffer cells regulate T cell response in rats. *Liver Transpl.* **9**, 489–497 (2003).
298. López-Navarrete, G. *et al.* Th2-Associated Alternative Kupffer Cell Activation Promotes Liver Fibrosis without Inducing Local Inflammation. *Int. J. Biol. Sci.* **7**, 1273–1286 (2011).
299. Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S. & Meindl-Beinker, N. TGF-β in Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrogenesis—Updated 2019. *Cells* **8**, (2019).
300. Knoll, P. *et al.* Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J. Hepatol.* **22**, 226–229 (1995).
301. Li, H. *et al.* Hepatitis B virus particles preferably induce Kupffer cells to produce TGF-β1 over pro-inflammatory cytokines. *Dig. Liver Dis.* **44**, 328–333 (2012).
302. Xu, L., Yin, W., Sun, R., Wei, H. & Tian, Z. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatology* **59**, 443–452 (2014).
303. Wenfeng, Z. *et al.* Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease. *Ann. Hepatol.* **13**, 489–495 (2014).
304. Lee, J., French, B., Morgan, T. & French, S. W. The liver is populated by a broad spectrum of markers for macrophages. In alcoholic hepatitis the macrophages are M1 and M2. *Exp. Mol. Pathol.* **96**, 118–125 (2014).
305. Pillarisetty, V. G., Shah, A. B., Miller, G., Bleier, J. I. & DeMatteo, R. P. Liver Dendritic Cells Are Less Immunogenic Than Spleen Dendritic Cells because of Differences in Subtype Composition. *J. Immunol.* **172**, 1009–1017 (2004).
306. Jomantaitė, I. *et al.* Hepatic dendritic cell subsets in the mouse. *Eur. J. Immunol.* **34**, 355–365 (2004).
307. Plitas, G. *et al.* Dendritic cells are required for effective cross-presentation in the murine liver. *Hepatology* **47**, 1343–1351 (2008).
308. Swiecki, M. & Colonna, M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol. Rev.* **234**, 142–162 (2010).
309. Rutella, S. *et al.* Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood* **108**, 218–227 (2006).
310. Cabillic, F. *et al.* Hepatic environment elicits monocyte differentiation into a dendritic cell subset directing Th2 response. *J. Hepatol.* **44**, 552–559 (2006).
311. Bamboat, Z. M. *et al.* Human Liver Dendritic Cells Promote T Cell Hyporesponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **182**, 1901–1911 (2009).
312. Creus, A. D. *et al.* Low TLR4 Expression by Liver Dendritic Cells Correlates with Reduced Capacity to Activate Allogeneic T Cells in Response to Endotoxin. *J. Immunol.* **174**, 2037–2045 (2005).
313. Kingham, T. P. *et al.* Murine liver plasmacytoid dendritic cells become potent immunostimulatory cells after Flt-3 ligand expansion. *Hepatology* **45**, 445–454 (2007).
314. Castellaneta, A., Sumpter, T. L., Chen, L., Tokita, D. & Thomson, A. W. NOD2 Ligation Subverts IFNα Production by Liver Plasmacytoid Dendritic Cells and Inhibits Their T Cell Allostimulatory Activity Via B7-H1 Upregulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6922–6932 (2009).
315. Tokita, D. *et al.* High PD-L1/CD86 Ratio on Plasmacytoid Dendritic Cells Correlates With Elevated T-Regulatory Cells in Liver Transplant Tolerance. *Transplantation* **85**, 369–377 (2008).
316. Simpson, J., Miles, K., Trüb, M., MacMahon, R. & Gray, M. Plasmacytoid Dendritic Cells Respond Directly to Apoptotic Cells by Secreting Immune Regulatory IL-10 or IFN-α. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
317. Sharma, M. D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* **117**, 2570–2582 (2007).
318. Thomson, A. W. & Knolle, P. A. Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 753–766 (2010).
319. Lassen, M. G., Lukens, J. R., Dolina, J. S., Brown, M. G. & Hahn, Y. S. Intrahepatic IL-10 Maintains NKG2A+Ly49− Liver NK Cells in a Functionally Hyporesponsive State. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 2693–2701 (2010).
320. Morita, M. *et al.* Structure-Activity Relationship of .alpha.-Galactosylceramides against B16-Bearing Mice. *J. Med. Chem.* **38**, 2176–2187 (1995).

321. Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. & Baccala, R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat. Immunol.* **18**, 716–724 (2017).
322. Cohen, Y. & Nagler, A. Treatment of refractory autoimmune diseases with ablative immunotherapy. *Autoimmun. Rev.* **3**, 21–29 (2004).
323. Herold, K. C. *et al.* Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1692–1698 (2002).
324. Cooper, G. S. & Stroehla, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **2**, 119–125 (2003).
325. Zenewicz, L. A., Abraham, C., Flavell, R. A. & Cho, J. H. Unraveling the Genetics of Autoimmunity. *Cell* **140**, 791–797 (2010).
326. Heino, M. *et al.* APECED mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene. *Hum. Mutat.* **18**, 205–211 (2001).
327. Wu, G.-C. *et al.* Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **14**, 798–805 (2015).
328. Garo, L. P. & Murugaiyan, G. Contribution of MicroRNAs to autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2041–2051 (2016).
329. Cusick, M. F., Libbey, J. E. & Fujinami, R. S. Molecular Mimicry as a Mechanism of Autoimmune Disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 102–111 (2012).
330. Rojas, M. *et al.* Molecular mimicry and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **95**, 100–123 (2018).
331. Zabriskie, J. B. & Freimer, E. H. AN IMMUNOLOGICAL RELATIONSHIP BETWEEN THE GROUP A STREPTOCOCCUS AND MAMMALIAN MUSCLE. *J. Exp. Med.* **124**, 661–678 (1966).
332. Chapter 19 - Autoimmune Diseases. in *Primer to the Immune Response (Second Edition)* (eds. Mak, T. W., Saunders, M. E. & Jett, B. D.) 517–552 (Academic Cell, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-385245-8.00019-4.
333. Sercarz, E. E. *et al.* Dominance and Crypticity of T Cell Antigenic Determinants. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 729–766 (1993).
334. Vanderlugt, C. J. & Miller, S. D. Epitope spreading. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 831–836 (1996).
335. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J. Exp. Med.* **181**, 1945–1948 (1995).
336. Pacheco, Y. *et al.* Bystander activation and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **103**, 102301 (2019).
337. Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. & Baccala, R. The multiple pathways to autoimmunity. *Nat. Immunol.* **18**, 716–724 (2017).
338. Schneider, K. M. *et al.* CX3CR1 is a gatekeeper for intestinal barrier integrity in mice: Limiting steatohepatitis by maintaining intestinal homeostasis. *Hepatology* **62**, 1405–1416 (2015).
339. Haruta, I. *et al.* Long-term bacterial exposure can trigger nonsuppurative destructive cholangitis associated with multifocal epithelial inflammation. *Lab. Invest.* **90**, 577–588 (2010).
340. Pollard, K. M., Christy, J. M., Cauvi, D. M. & Kono, D. H. Environmental xenobiotic exposure and autoimmunity. *Curr. Opin. Toxicol.* **10**, 15–22 (2018).
341. Jovanovic, D. V. *et al.* IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL-β and TNF-α, by Human Macrophages. *J. Immunol.* **160**, 3513–3521 (1998).
342. Jones, C. E. & Chan, K. Interleukin-17 Stimulates the Expression of Interleukin-8, Growth-Related Oncogene- α , and Granulocyte–Colony-Stimulating Factor by Human Airway Epithelial Cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 748–753 (2002).
343. Ye, P. *et al.* Requirement of Interleukin 17 Receptor Signaling for Lung Cxc Chemokine and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Expression, Neutrophil Recruitment, and Host Defense. *J. Exp. Med.* **194**, 519–528 (2001).
344. Hsu, H.-C. *et al.* Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat. Immunol.* **9**, 166–175 (2008).
345. Nakae, S., Nambu, A., Sudo, K. & Iwakura, Y. Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice. *J. Immunol.* **171**, 6173–6177 (2003).
346. Prause, O., Bozinovski, S., Anderson, G. & Linden, A. Increased matrix metalloproteinase-9 concentration and activity after stimulation with interleukin-17 in mouse airways. *Thorax* **59**, 313–317 (2004).
347. Damsker, J. M., Hansen, A. M. & Caspi, R. R. Th1 and Th17 cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**, 211–221 (2010).
348. Kalish, R. S. & Askenase, P. W. Molecular mechanisms of CD8+ T cell–mediated delayed hypersensitivity: Implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 192–199 (1999).
349. Ji, N., Sosa, R. A. & Forsthuber, T. G. More than just a T-box: the role of T-bet as a possible biomarker and therapeutic target in autoimmune diseases. *Immunotherapy* **3**, 435–441 (2011).
350. Peng, S. L., Szabo, S. J. & Glimcher, L. H. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic

autoantibody production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 5545–5550 (2002).
351. Rangachari, M. *et al.* T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17. *J. Exp. Med.* **203**, 2009–2019 (2006).
352. Ferber, I. A. *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* **156**, 5–7 (1996).
353. Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S. I. & Abbas, A. K. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **196**, 999–1005 (2002).
354. Chu, C.-Q., Wittmer, S. & Dalton, D. K. Failure to Suppress the Expansion of the Activated Cd4 T Cell Population in Interferon γ–Deficient Mice Leads to Exacerbation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **192**, 123–128 (2000).
355. Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T. N. & Forsthuber, T. G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* **74**, 5–17 (2015).
356. Ferri, S. *et al.* A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* **52**, 999–1007 (2010).
357. Kaneko, Y. *et al.* Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* **191**, 105–114 (2000).
358. Halder, R. C., Aguilera, C., Maricic, I. & Kumar, V. Type II NKT cell–mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J. Clin. Invest.* **117**, 2302–2312 (2007).
359. Poggi, A. & Zocchi, M. R. NK Cell Autoreactivity and Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
360. Dong, Z. *et al.* Involvement of natural killer cells in PolyI:C-induced liver injury. *J. Hepatol.* **41**, 966–973 (2004).
361. Pahwa, R., Goyal, A., Bansal, P. & Jialal, I. Chronic Inflammation. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
362. Furman, D. *et al.* Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat. Med.* **25**, 1822–1832 (2019).
363. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* **454**, 428–435 (2008).
364. Markiewski, M. M. & Lambris, J. D. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *Am. J. Pathol.* **171**, 715–727 (2007).
365. Dennis, E. A. & Norris, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 511–523 (2015).
366. Kopf, M., Bachmann, M. F. & Marsland, B. J. Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 703–718 (2010).
367. Charo, I. F. & Ransohoff, R. M. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354**, 610–621 (2006).
368. Manicone, A. M. & McGuire, J. K. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19**, 34–41 (2008).
369. Kolaczkowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 159–175 (2013).
370. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
371. Julier, Z., Park, A. J., Briquez, P. S. & Martino, M. M. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. *Acta Biomater.* **53**, 13–28 (2017).
372. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. J. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 446–458 (2005).
373. Levy, B. D., Clish, C. B., Schmidt, B., Gronert, K. & Serhan, C. N. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat. Immunol.* **2**, 612–619 (2001).
374. Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Braughton, K. R. & DeLeo, F. R. Down-Regulation of Proinflammatory Capacity During Apoptosis in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J. Immunol.* **170**, 3357–3368 (2003).
375. Dalli, J. & Serhan, C. N. Specific lipid mediator signatures of human phagocytes: microparticles stimulate macrophage efferocytosis and pro-resolving mediators. *Blood* **120**, e60–e72 (2012).
376. Jin, F., Nathan, C., Radzioch, D. & Ding, A. Secretory Leukocyte Protease Inhibitor: A Macrophage Product Induced by and Antagonistic to Bacterial Lipopolysaccharide. *Cell* **88**, 417–426 (1997).
377. Treffkorn, L., Scheibe, R., Maruyama, T. & Dieter, P. PGE2 exerts its effect on the LPS-induced release of TNF-α, ET-1, IL-lα, IL-6 and IL-10 via the EP2 and EP4 receptor in rat liver macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **74**, 113–123 (2004).
378. Huynh, M.-L. N., Fadok, V. A. & Henson, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-β1 secretion and the resolution of inflammation. *J. Clin. Invest.* **109**, 41–50 (2002).
379. Nathan, C. & Ding, A. Nonresolving Inflammation. *Cell* **140**, 871–882 (2010).

380. Rock, K. L., Lai, J.-J. & Kono, H. Innate and adaptive immune responses to cell death. *Immunol. Rev.* **243**, 191–205 (2011).
381. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
382. Kepp, O. *et al.* Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment. *Apoptosis* **14**, 364–375 (2009).
383. Koyama, Y. & Brenner, D. A. Liver inflammation and fibrosis. *J. Clin. Invest.* **127**, 55–64 (2017).
384. Heymann, F. *et al.* Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* **62**, 279–291 (2015).
385. Seki, E. *et al.* Lipopolysaccharide-Induced IL-18 Secretion from Murine Kupffer Cells Independently of Myeloid Differentiation Factor 88 That Is Critically Involved in Induction of Production of IL-12 and IL-1β. *J. Immunol.* **166**, 2651–2657 (2001).
386. He, G. & Karin, M. NF-κB and STAT3 – key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res.* **21**, 159–168 (2011).
387. Park, E. J. *et al.* Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. *Cell* **140**, 197–208 (2010).
388. Seki, E. *et al.* CCR2 promotes hepatic fibrosis in mice. *Hepatol. Baltim. Md* **50**, 185–197 (2009).
389. Baeck, C. *et al.* Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* **61**, 416–426 (2012).
390. Zimmermann, H. W. *et al.* Functional Contribution of Elevated Circulating and Hepatic Non-Classical CD14+CD16+ Monocytes to Inflammation and Human Liver Fibrosis. *PLoS ONE* **5**, (2010).
391. Blériot, C. *et al.* Liver-Resident Macrophage Necroptosis Orchestrates Type 1 Microbicidal Inflammation and Type-2-Mediated Tissue Repair during Bacterial Infection. *Immunity* **42**, 145–158 (2015).
392. Liew, P. X., Lee, W.-Y. & Kubes, P. iNKT Cells Orchestrate a Switch from Inflammation to Resolution of Sterile Liver Injury. *Immunity* **47**, 752-765.e5 (2017).
393. Dusseaux, M. *et al.* Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17–secreting T cells. *Blood* **117**, 1250–1259 (2011).
394. Jeffery, H. C. *et al.* Biliary epithelium and liver B cells exposed to bacteria activate intrahepatic MAIT cells through MR1. *J. Hepatol.* **64**, 1118–1127 (2016).
395. Giannelli, V. *et al.* Microbiota and the gut-liver axis: Bacterial translocation, inflammation and infection in cirrhosis. *World J. Gastroenterol. WJG* **20**, 16795–16810 (2014).
396. Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E. & Wajda, A. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease. *Cancer* **91**, 854–862 (2001).
397. García Rodríguez, L. A. & Huerta-Alvarez, C. Reduced Risk of Colorectal Cancer among Long-Term Users of Aspirin and Nonaspirin Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Epidemiology* **12**, 88–93 (2001).
398. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860–867 (2002).
399. Elinav, E. *et al.* Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 759–771 (2013).
400. Hussain, S. P., Hofseth, L. J. & Harris, C. C. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 276–285 (2003).
401. Grivennikov, S. I., Greten, F. R. & Karin, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899 (2010).
402. Endo, Y. *et al.* Expression of activation-induced cytidine deaminase in human hepatocytes via NF- κ B signaling. *Oncogene* **26**, 5587–5595 (2007).
403. Endo, Y. *et al.* Activation-Induced Cytidine Deaminase Links Between Inflammation and the Development of Colitis-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* **135**, 889-898.e3 (2008).
404. Marusawa, H. Aberrant AID expression and human cancer development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1399–1402 (2008).
405. Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C. & Mantovani, A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* **30**, 1073–1081 (2009).
406. Koshiji, M. *et al.* HIF-1α Induces Genetic Instability by Transcriptionally Downregulating MutSα Expression. *Mol. Cell* **17**, 793–803 (2005).
407. Chang, C. L. *et al.* Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **283**, C148–C154 (2002).
408. Hahn, M. A. *et al.* Methylation of Polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Res.* **68**, 10280–10289 (2008).
409. Ji, Z., He, L., Regev, A. & Struhl, K. Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF-kB, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 9453–9462 (2019).
410. Lesina, M. *et al.* Stat3/Socs3 Activation by IL-6 Transsignaling Promotes Progression of Pancreatic

Intraepithelial Neoplasia and Development of Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **19**, 456–469 (2011).
411. Grivennikov, S. *et al.* IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* **15**, 103–113 (2009).
412. Li, J. *et al.* Sensitizing leukemia stem cells to NF-κB inhibitor treatment in vivo by inactivation of both TNF and IL-1 signaling. *Oncotarget* **8**, 8420–8435 (2016).
413. De Simone, V. *et al.* Th17-type cytokines, IL-6 and TNF-α synergistically activate STAT3 and NF-kB to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene* **34**, 3493–3503 (2015).
414. Myant, K. B. *et al.* ROS Production and NF-κB Activation Triggered by RAC1 Facilitate WNT-Driven Intestinal Stem Cell Proliferation and Colorectal Cancer Initiation. *Cell Stem Cell* **12**, 761–773 (2013).
415. Ho, P. L., Lay, E. J., Jian, W., Parra, D. & Chan, K. S. Stat3 Activation in Urothelial Stem Cells Leads to Direct Progression to Invasive Bladder Cancer. *Cancer Res.* **72**, 3135–3142 (2012).
416. Huang, P. *et al.* The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* **18**, 218–230 (2014).
417. Parr, C., Watkins, G., Mansel, R. E. & Jiang, W. G. The Hepatocyte Growth Factor Regulatory Factors in Human Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**, 202–211 (2004).
418. Lu, S.-L. *et al.* Overexpression of Transforming Growth Factor β1 in Head and Neck Epithelia Results in Inflammation, Angiogenesis, and Epithelial Hyperproliferation. *Cancer Res.* **64**, 4405–4410 (2004).
419. Schwitalla, S. *et al.* Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell* **152**, 25–38 (2013).
420. Zhou, C., Liu, J., Tang, Y. & Liang, X. Inflammation linking EMT and cancer stem cells. *Oral Oncol.* **48**, 1068–1075 (2012).
421. Kujawski, M. *et al.* Stat3 mediates myeloid cell–dependent tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3367–3377 (2008).
422. Rius, J. *et al.* NF-κB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1α. *Nature* **453**, 807–811 (2008).
423. Schioppa, T. *et al.* Regulation of the Chemokine Receptor CXCR4 by Hypoxia. *J. Exp. Med.* **198**, 1391–1402 (2003).
424. Meslé, F. La mortalité en France : le recul se poursuit. *Population* **50**, 745–778 (1995).
425. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34 (2019).
426. Cooper, G. M. The Development and Causes of Cancer. *Cell Mol. Approach 2nd Ed.* (2000).
427. Chaffer, C. L. & Weinberg, R. A. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov.* **5**, 22–24 (2015).
428. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
429. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
430. Grulich, A. E., van Leeuwen, M. T., Falster, M. O. & Vajdic, C. M. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *The Lancet* **370**, 59–67 (2007).
431. Burnet, M. Cancer—A Biological Approach. *Br. Med. J.* **1**, 841–847 (1957).
432. Shankaran, V. *et al.* IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
433. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
434. Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* **21**, 137–148 (2004).
435. Shankaran, V. *et al.* IFNγ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
436. Smyth, M. J., Crowe, N. Y. & Godfrey, D. I. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int. Immunol.* **13**, 459–463 (2001).
437. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **183**, 725–729 (1996).
438. Vigneron, N. Human Tumor Antigens and Cancer Immunotherapy. *BioMed Res. Int.* **2015**, (2015).
439. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
440. Guerra, N. *et al.* NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* **28**, 571–580 (2008).
441. Gresser, I. & Belardelli, F. Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 111–118 (2002).
442. Gao, Y. *et al.* γδ T Cells Provide an Early Source of Interferon γ in Tumor Immunity. *J. Exp. Med.* **198**, 433–442 (2003).
443. Takeda, K. *et al.* Critical Role for Tumor Necrosis Factor–related Apoptosis-inducing Ligand in Immune Surveillance Against Tumor Development. *J. Exp. Med.* **195**, 161–169 (2002).

444. van den Broek, M. E. *et al.* Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J. Exp. Med.* **184**, 1781–1790 (1996).
445. Engel, A. M., Svane, I. M., Rygaard, J. & Werdelin, O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand. J. Immunol.* **45**, 463–470 (1997).
446. O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **16**, 151–167 (2019).
447. Samstein, R. M. *et al.* Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* **51**, 202–206 (2019).
448. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 197–218 (2019).
449. Maleki Vareki, S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J. Immunother. Cancer* **6**, 157 (2018).
450. Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J. & Fridman, W. H. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **19**, 307–325 (2019).
451. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
452. Palucka, A. K. & Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell* **164**, 1233–1247 (2016).
453. Liu, Y. & Cao, X. Intratumoral dendritic cells in the anti-tumor immune response. *Cell. Mol. Immunol.* **12**, 387–390 (2015).
454. Franciszkiewicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C. & Mami-Chouaib, F. Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Shaping the Effector Phase of the Antitumor Immune Response. *Cancer Res.* **72**, 6325–6332 (2012).
455. Franciszkiewicz, K. *et al.* CD103 or LFA-1 Engagement at the Immune Synapse between Cytotoxic T Cells and Tumor Cells Promotes Maturation and Regulates T-cell Effector Functions. *Cancer Res.* **73**, 617–628 (2013).
456. Peng, W. *et al.* PD-1 Blockade Enhances T-cell Migration to Tumors by Elevating IFN-γ Inducible Chemokines. *Cancer Res.* **72**, 5209–5218 (2012).
457. Gonzalez, H., Hagerling, C. & Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* **32**, 1267–1284 (2018).
458. Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 235–271 (2011).
459. Tripathi, P. & Agrawal, S. Non-Classical HLA-G Antigen and Its Role in the Cancer Progression. *Cancer Invest.* **24**, 178–186 (2006).
460. Stern-Ginossar, N. *et al.* Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat. Immunol.* **9**, 1065–1073 (2008).
461. Groh, V., Wu, J., Yee, C. & Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **419**, 734–738 (2002).
462. Galon, J., Angell, H. K., Bedognetti, D. & Marincola, F. M. The Continuum of Cancer Immunosurveillance: Prognostic, Predictive, and Mechanistic Signatures. *Immunity* **39**, 11–26 (2013).
463. Fridman, W. H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 298–306 (2012).
464. Martin-Orozco, N. *et al.* Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
465. Peters, A. *et al.* Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity* **35**, 986–996 (2011).
466. Jin, W. & Dong, C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg. Microbes Infect.* **2**, 1–5 (2013).
467. Ma, S. *et al.* IL-17A Produced by γδ T Cells Promotes Tumor Growth in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* **74**, 1969–1982 (2014).
468. Pan, B. *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci. Rep.* **5**, 16053 (2015).
469. Bailey, S. R. *et al.* Th17 Cells in Cancer: The Ultimate Identity Crisis. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
470. Chalmin, F. *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**, 362–373 (2012).
471. Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S. J. & Xiang, J. Th17 and Th17-stimulated CD8+ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1473 (2011).
472. Guéry, L. & Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Research International* https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/314620/ (2015)

doi:https://doi.org/10.1155/2015/314620.
473. Ye, J., Livergood, R. S. & Peng, G. The Role and Regulation of Human Th17 Cells in Tumor Immunity. *Am. J. Pathol.* **182**, 10–20 (2013).
474. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1149 (2009).
475. Baban, B. *et al.* IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 2475–2483 (2009).
476. Punt, S. *et al.* The correlations between IL-17 vs. Th17 cells and cancer patient survival: a systematic review. *OncoImmunology* **4**, e984547 (2015).
477. Dieu-Nosjean, M.-C. *et al.* Tertiary lymphoid structures, drivers of the anti-tumor responses in human cancers. *Immunol. Rev.* **271**, 260–275 (2016).
478. Helmink, B. A. *et al.* B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature* **577**, 549–555 (2020).
479. Chaisemartin, L. de *et al.* Characterization of Chemokines and Adhesion Molecules Associated with T cell Presence in Tertiary Lymphoid Structures in Human Lung Cancer. *Cancer Res.* **71**, 6391–6399 (2011).
480. Goc, J. *et al.* Dendritic Cells in Tumor-Associated Tertiary Lymphoid Structures Signal a Th1 Cytotoxic Immune Contexture and License the Positive Prognostic Value of Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Res.* **74**, 705–715 (2014).
481. Gu-Trantien, C. *et al.* CXCL13-producing TFH cells link immune suppression and adaptive memory in human breast cancer. *JCI Insight* **2**,.
482. Nielsen, J. S. *et al.* CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 3281–3292 (2012).
483. Montfort, A. *et al.* A Strong B-cell Response Is Part of the Immune Landscape in Human High-Grade Serous Ovarian Metastases. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **23**, 250–262 (2017).
484. Di Caro, G. *et al.* Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 2147–2158 (2014).
485. Gentilini, A., Pastore, M., Marra, F. & Raggi, C. The Role of Stroma in Cholangiocarcinoma: The Intriguing Interplay between Fibroblastic Component, Immune Cell Subsets and Tumor Epithelium. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
486. Erez, N., Truitt, M., Olson, P. & Hanahan, D. Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-κB-Dependent Manner. *Cancer Cell* **17**, 135–147 (2010).
487. Affo, S., Yu, L.-X. & Schwabe, R. F. The Role of Cancer-Associated Fibroblasts and Fibrosis in Liver Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **12**, 153–186 (2017).
488. Najafi, M. *et al.* Macrophage polarity in cancer: A review. *J. Cell. Biochem.* **120**, 2756–2765 (2019).
489. van Dalen, F. J., van Stevendaal, M. H. M. E., Fennemann, F. L., Verdoes, M. & Ilina, O. Molecular Repolarisation of Tumour-Associated Macrophages. *Molecules* **24**, (2018).
490. Thanee, M. *et al.* Quantitative changes in tumor-associated M2 macrophages characterize cholangiocarcinoma and their association with metastasis. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **16**, 3043–3050 (2015).
491. Fabris, L. *et al.* The tumour microenvironment and immune milieu of cholangiocarcinoma. *Liver Int.* **39**, 63–78 (2019).
492. Høgdall, D., Lewinska, M. & Andersen, J. B. Desmoplastic Tumor Microenvironment and Immunotherapy in Cholangiocarcinoma. *Trends Cancer* **4**, 239–255 (2018).
493. Nywening, T. M. *et al.* Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* **17**, 651–662 (2016).
494. Pathria, P., Louis, T. L. & Varner, J. A. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.* **40**, 310–327 (2019).
495. Hasita, H. *et al.* Significance of alternatively activated macrophages in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Sci.* **101**, 1913–1919 (2010).
496. Brivio, S., Cadamuro, M., Strazzabosco, M. & Fabris, L. Tumor reactive stroma in cholangiocarcinoma: The fuel behind cancer aggressiveness. *World J. Hepatol.* **9**, 455–468 (2017).
497. Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C. & Hermoso, M. A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* **2014**, 149185 (2014).
498. Miura, T. *et al.* Prognostic Impact of CD163+ Macrophages in Tumor Stroma and CD8+ T-Cells in Cancer Cell Nests in Invasive Extrahepatic Bile Duct Cancer. *Anticancer Res.* **37**, 183–190 (2017).
499. Boulter, L. *et al.* WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically

inhibited. *J. Clin. Invest.* **125**, 1269–1285 (2015).
500. Loilome, W. *et al.* Activated macrophages promote Wnt/β-catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **35**, 5357–5367 (2014).
501. Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* **66**, 605–612 (2006).
502. Zhang, Q. *et al.* Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PloS One* **7**, e50946 (2012).
503. Jeong, H., Hwang, I., Kang, S. H., Shin, H. C. & Kwon, S. Y. Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *J. Breast Cancer* **22**, 38–51 (2019).
504. Rakaee, M. *et al.* Prognostic Value of Macrophage Phenotypes in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer Assessed by Multiplex Immunohistochemistry. *Neoplasia N. Y. N* **21**, 282–293 (2019).
505. Yu, M. *et al.* Prognostic value of tumor-associated macrophages in pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Manag. Res.* **11**, 4041–4058 (2019).
506. Kumar, A. T. *et al.* Prognostic Significance of Tumor-Associated Macrophage Content in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **9**, 656 (2019).
507. Atanasov, G. *et al.* Tumor necrosis and infiltrating macrophages predict survival after curative resection for cholangiocarcinoma. *Oncoimmunology* **6**, (2017).
508. Ibberson, M. *et al.* TIE-2 and VEGFR Kinase Activities Drive Immunosuppressive Function of TIE-2–Expressing Monocytes in Human Breast Tumors. *Clin. Cancer Res.* **19**, 3439–3449 (2013).
509. Atanasov, G. *et al.* Prognostic significance of TIE2-expressing monocytes in hilar cholangiocarcinoma. *J. Surg. Oncol.* **114**, 91–98 (2016).
510. Fridlender, Z. G. & Albelda, S. M. Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* **33**, 949–955 (2012).
511. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF-β: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
512. Zhou, S.-L. *et al.* CXCL5 contributes to tumor metastasis and recurrence of intrahepatic cholangiocarcinoma by recruiting infiltrative intratumoral neutrophils. *Carcinogenesis* **35**, 597–605 (2014).
513. Gu, F.-M. *et al.* Intratumoral IL-17^{+} cells and neutrophils show strong prognostic significance in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **19**, 2506–2514 (2012).
514. Brandau, S., Dumitru, C. A. & Lang, S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin. Immunopathol.* **35**, 163–176 (2013).
515. Cools-Lartigue, J. *et al.* Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* (2013) doi:10.1172/JCI67484.
516. Kitano, Y. *et al.* Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br. J. Cancer* **118**, 171–180 (2018).
517. Mao, Z.-Y., Zhu, G.-Q., Xiong, M., Ren, L. & Bai, L. Prognostic value of neutrophil distribution in cholangiocarcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* **21**, 4961–4968 (2015).
518. Tan, D.-W. *et al.* Prognostic Significance of Neutrophil to Lymphocyte Ratio in Oncologic Outcomes of Cholangiocarcinoma: A Meta-analysis. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
519. Gabrilovich, D. I. Myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 3–8 (2017).
520. Budhwar, S., Verma, P., Verma, R., Rai, S. & Singh, K. The Yin and Yang of Myeloid Derived Suppressor Cells. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
521. Dunne, R. F. *et al.* The role of myeloid derived suppressor cells in cholangiocarcinoma: A potential target for therapy. *J. Clin. Oncol.* **34**, 273–273 (2016).
522. Yang, X. *et al.* FAP Promotes Immunosuppression by Cancer-Associated Fibroblasts in the Tumor Microenvironment via STAT3–CCL2 Signaling. *Cancer Res.* **76**, 4124–4135 (2016).
523. Chiossone, L., Dumas, P.-Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 671–688 (2018).
524. Melum, E. *et al.* Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated with NKG2D polymorphisms. *Hepatology* **47**, 90–96 (2008).
525. Jung, I. H. *et al.* In Vivo Study of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity Against Cholangiocarcinoma in a Nude Mouse Model. *In Vivo* **32**, 771–781 (2018).
526. Tran, E. *et al.* Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer. *Science* **344**, 641–645 (2014).
527. Veglia, F. & Gabrilovich, D. I. Dendritic cells in cancer: the role revisited. *Curr. Opin. Immunol.* **45**, 43–51 (2017).
528. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 263–274 (2005).
529. Disis, M. L. Immune Regulation of Cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4531–4538 (2010).
530. Johansson, M., DeNardo, D. G. & Coussens, L. M. Polarized immune responses differentially

regulate cancer development. *Immunol. Rev.* **222**, 145–154 (2008).
531. Takagi, S. *et al.* Dendritic cells, T-cell infiltration, and grp94 expression in cholangiocellular carcinoma. *Hum. Pathol.* **35**, 881–886 (2004).
532. Oshikiri, T. *et al.* Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J. Surg. Oncol.* **84**, 224–228 (2003).
533. Goeppert, B. *et al.* Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br. J. Cancer* **109**, 2665–2674 (2013).
534. Dunne, R. F. *et al.* Association of FoxP3 expression with worse outcomes in cholangiocarcinoma: Evidence to support the use of immunotherapy. *J. Clin. Oncol.* **34**, e15631–e15631 (2016).
535. Ma, C. *et al.* Downregulation of FOXP3 inhibits invasion and immune escape in cholangiocarcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **458**, 234–239 (2015).
536. Okada, K., Shimizu, Y., Nambu, S., Higuchi, K. & Watanabe, A. Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **9**, 462–467 (1994).
537. Joyce, J. A. & Fearon, D. T. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* **348**, 74–80 (2015).
538. Jing, C.-Y. *et al.* HHLA2 in intrahepatic cholangiocarcinoma: an immune checkpoint with prognostic significance and wider expression compared with PD-L1. *J. Immunother. Cancer* **7**, (2019).
539. Fontugne, J. *et al.* PD-L1 expression in perihilar and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **8**, 24644–24651 (2017).
540. Nakamura, H. *et al.* Genomic spectra of biliary tract cancer. *Nat. Genet.* **47**, 1003–1010 (2015).
541. Sabbatino, F. *et al.* PD-L1 and HLA Class I Antigen Expression and Clinical Course of the Disease in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **22**, 470–478 (2016).
542. Sabbatino, F. *et al.* Variability in immune infiltrates and HLA expression in cholangiocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* **32**, 230–230 (2014).
543. Sirica, A. E. & Gores, G. J. Desmoplastic Stroma and Cholangiocarcinoma: Clinical Implications and Therapeutic Targeting. *Hepatol. Baltim. Md* **59**, 2397–2402 (2014).
544. Ene–Obong, A. *et al.* Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8+ T Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **145**, 1121–1132 (2013).
545. Zhou, G. *et al.* Reduction of immunosuppressive tumor microenvironment in cholangiocarcinoma by ex vivo targeting immune checkpoint molecules. *J. Hepatol.* (2019) doi:10.1016/j.jhep.2019.05.026.
546. Gujar, S., Pol, J. G., Kim, Y., Lee, P. W. & Kroemer, G. Antitumor Benefits of Antiviral Immunity: An Underappreciated Aspect of Oncolytic Virotherapies. *Trends Immunol.* **39**, 209–221 (2018).
547. Gujar, S., Pol, J. G. & Kroemer, G. Heating it up: Oncolytic viruses make tumors 'hot' and suitable for checkpoint blockade immunotherapies. *Oncoimmunology* **7**, e1442169 (2018).
548. Maverakis, E., Goodarzi, H., Wehrli, L. N., Ono, Y. & Garcia, M. S. The Etiology of Paraneoplastic Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **42**, 135–144 (2012).
549. Sands, J. & Tuscano, J. M. Geoepidemiology and autoimmune manifestations of lymphoproliferative disorders. *Autoimmun. Rev.* **9**, A335–A341 (2010).
550. Bowen, G. M. *et al.* Lichenoid dermatitis in paraneoplastic pemphigus: a pathogenic trigger of epitope spreading? *Arch. Dermatol.* **136**, 652–656 (2000).
551. Corbière, V. *et al.* Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Cancer Res.* **71**, 1253–1262 (2011).
552. Amos, S. M. *et al.* Autoimmunity associated with immunotherapy of cancer. *Blood* **118**, 499–509 (2011).
553. Simpson, T. R. *et al.* Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti–CTLA-4 therapy against melanoma. *J. Exp. Med.* **210**, 1695–1710 (2013).
554. Cha, E. *et al.* Improved Survival with T Cell Clonotype Stability After Anti–CTLA-4 Treatment in Cancer Patients. *Sci. Transl. Med.* **6**, 238ra70 (2014).
555. Blackburn, S. D., Shin, H., Freeman, G. J. & Wherry, E. J. Selective expansion of a subset of exhausted CD8 T cells by αPD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 15016–15021 (2008).
556. June, C. H., Warshauer, J. T. & Bluestone, J. A. Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nat. Med.* **23**, 540–547 (2017).
557. Wadhera, A. *et al.* Thymoma-associated multiorgan autoimmunity: a graft-versus-host-like disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **57**, 683–689 (2007).
558. Thompson, E. D., Enriquez, H. L., Fu, Y.-X. & Engelhard, V. H. Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors. *J. Exp. Med.* **207**, 1791–1804 (2010).
559. Jablonska, E. *et al.* TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leuk. Lymphoma* **46**, 1307–1312 (2005).
560. Caspi, R. R. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nat. Rev.*

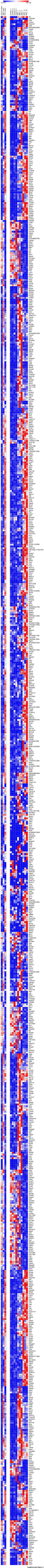
Immunol. **8**, 970–976 (2008).
561. Teulings, H.-E. *et al.* Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 773–781 (2015).
562. Franzke, A. *et al.* Autoimmunity Resulting From Cytokine Treatment Predicts Long-Term Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Cancer. *J. Clin. Oncol.* **17**, 529–529 (1999).
563. Giat, E., Ehrenfeld, M. & Shoenfeld, Y. Cancer and autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **16**, 1049–1057 (2017).
564. Scott, F. I. *et al.* Risk of Nonmelanoma Skin Cancer Associated With the Use of Immunosuppressant and Biologic Agents in Patients With a History of Autoimmune Disease and Nonmelanoma Skin Cancer. *JAMA Dermatol.* **152**, 164–172 (2016).
565. Teulings, H. E. *et al.* Decreased risk of melanoma and nonmelanoma skin cancer in patients with vitiligo: a survey among 1307 patients and their partners. *Br. J. Dermatol.* **168**, 162–171 (2013).
566. Akisawa, N. *et al.* Case Report: Primary Biliary Cirrhosis Associated with Cholangiocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 2138–2142 (1998).
567. Zitvogel, L. *et al.* The anticancer immune response: indispensable for therapeutic success? *J. Clin. Invest.* **118**, 1991–2001 (2008).
568. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès–Fridman, C. & Kroemer, G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 717–734 (2017).
569. Paillet, J., Kroemer, G. & Pol, J. G. Immune contexture of cholangiocarcinoma. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **36**, 70–76 (2020).
570. Byrne, K. T. *et al.* Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8+ memory T cell responses to mouse melanoma. *J. Clin. Invest.* **121**, 1797–1809 (2011).
571. Lane, C. *et al.* Vaccination-induced autoimmune vitiligo is a consequence of secondary trauma to the skin. *Cancer Res.* **64**, 1509–1514 (2004).
572. Paradisi, A. *et al.* Markedly reduced incidence of melanoma and nonmelanoma skin cancer in a nonconcurrent cohort of 10,040 patients with vitiligo. *J. Am. Acad. Dermatol.* **71**, 1110–1116 (2014).
573. Ikenaga, N. *et al.* Selective targeting of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) suppresses hepatic fibrosis progression and accelerates its reversal. *Gut* **66**, 1697–1708 (2017).
574. Trivedi, P. J. & Cullen, S. Etiopathogenesis of primary biliary cirrhosis: an overview of recent developments. *Hepatol. Int.* **7**, 28–47 (2013).
575. Kalathil, S. G., Hutson, A., Barbi, J., Iyer, R. & Thanavala, Y. Augmentation of IFN-γ+ CD8+ T cell responses correlates with survival of HCC patients on sorafenib therapy. *JCI Insight* **4**, (2019).
576. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–848 (2006).
577. Corthay, A. *et al.* Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity* **22**, 371–383 (2005).
578. Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K. & Oliveira, M. J. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Front. Immunol.* **9**, 847 (2018).
579. Perrin, S., Firmo, C., Lemoine, S., Le Crom, S. & Jourdren, L. Aozan: an automated post-sequencing data-processing pipeline. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **33**, 2212–2213 (2017).
580. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **29**, 15–21 (2013).
581. Romagnoli, M. *et al.* Laminin-binding integrins are essential for the maintenance of functional mammary secretory epithelium in lactation. *Dev. Camb. Engl.* **147**, (2020).
582. Gacem, N. *et al.* ADAR1 mediated regulation of neural crest derived melanocytes and Schwann cell development. *Nat. Commun.* **11**, 198 (2020).
583. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* **40**, D109-114 (2012).
584. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2009).
585. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
586. Enot, D. P., Vacchelli, E., Jacquelot, N., Zitvogel, L. & Kroemer, G. TumGrowth: An open-access web tool for the statistical analysis of tumor growth curves. *Oncoimmunology* **7**, e1462431 (2018).
587. Dhirapong, A. *et al.* Therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte antigen 4/immunoglobulin on a murine model of primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **57**, 708–715 (2013).
588. Zhao, S. *et al.* Emperipolesis mediated by CD8+ T cells correlates with biliary epithelia cell injury in primary biliary cholangitis. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 1268–1275 (2020).
589. Mariotti, V., Strazzabosco, M., Fabris, L. & Calvisi, D. F. Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1864**, 1254–1261 (2018).

590. Katsumi, T. *et al.* Animal Models of Primary Biliary Cirrhosis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **48**, 142–153 (2015).
591. Bernatsky, S., Ramsey-Goldman, R. & Clarke, A. Malignancy and autoimmunity. *Curr. Opin. Rheumatol.* **18**, 129–134 (2006).
592. Mao, S., Shen, H. & Zhang, J. Systemic lupus erythematosus and malignancies risk. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 253–262 (2016).
593. Liang, Y., Yang, Z., Qin, B. & Zhong, R. Primary Sjögren's syndrome and malignancy risk: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1151–1156 (2014).
594. Okamoto, A., Watanabe, T., Kamata, K., Minaga, K. & Kudo, M. Recent Updates on the Relationship between Cancer and Autoimmune Pancreatitis. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **58**, 1533–1539 (2019).
595. Tansel, A. *et al.* Incidence and Determinants of Hepatocellular Carcinoma in Autoimmune Hepatitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **15**, 1207-1217.e4 (2017).
596. Roberti, M. P. *et al.* Chemotherapy-induced ileal crypt apoptosis and the ileal microbiome shape immunosurveillance and prognosis of proximal colon cancer. *Nat. Med.* (2020) doi:10.1038/s41591-020-0882-8.
597. Nakagawa, R. *et al.* CD4+ T cells from patients with primary biliary cholangitis show T cell activation and differentially expressed T-cell receptor repertoires. *Hepatol. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hepatol.* **49**, 653–662 (2019).
598. Yang, J.-B. *et al.* Successful treatment of murine autoimmune cholangitis by parabiosis: Implications for hematopoietic therapy. *J. Autoimmun.* **66**, 108–117 (2016).
599. Gershwin, M. E. & Mackay, I. R. The causes of primary biliary cirrhosis: Convenient and inconvenient truths. *Hepatol. Baltim. Md* **47**, 737–745 (2008).
600. Sarvaria, A., Madrigal, J. A. & Saudemont, A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.* **14**, 662–674 (2017).
601. Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P. & Domschke, C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *OncoImmunology* **2**, e25443 (2013).
602. Bindea, G. *et al.* Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
603. DiLillo, D. J., Yanaba, K. & Tedder, T. F. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **184**, 4006–4016 (2010).
604. Yamano, T. *et al.* Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* **122**, 227–231 (2000).
605. Shindo, M. *et al.* Cytokine mRNA expression in the liver of patients with primary biliary cirrhosis (PBC) and chronic hepatitis B (CHB). *Clin. Exp. Immunol.* **105**, 254–259 (1996).
606. Chuang, Y.-H. *et al.* Increased levels of chemokine receptor CXCR3 and chemokines IP-10 and MIG in patients with primary biliary cirrhosis and their first degree relatives. *J. Autoimmun.* **25**, 126–132 (2005).
607. Deng, Q. *et al.* The Emerging Epigenetic Role of CD8+T Cells in Autoimmune Diseases: A Systematic Review. *Front. Immunol.* **10**, 856 (2019).
608. Saxena, A. *et al.* Tc17 CD8+ T cells potentiate Th1-mediated autoimmune diabetes in a mouse model. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **189**, 3140–3149 (2012).
609. Fridman, W.-H. *et al.* The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* **6**, 117–122 (2013).
610. Ahn, E.-Y., Pan, G., Vickers, S. M. & McDonald, J. M. IFN-γupregulates apoptosis-related molecules and enhances Fas-mediated apoptosis in human cholangiocarcinoma. *Int. J. Cancer* **100**, 445–451 (2002).
611. Lin, G. *et al.* Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent poor prognostic factor in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* **7**, 50963–50971 (2016).
612. Lleo, A. *et al.* Biliary apotopes and anti-mitochondrial antibodies activate innate immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **52**, 987–998 (2010).
613. Yuen, G. J., Demissie, E. & Pillai, S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* **2**, 747–757 (2016).
614. Kaplon, H. & Dieu-Nosjean, M.-C. [Which future for B lymphocytes infiltrating solid tumors: prognostic biomarker and/or therapeutic target?]. *Med. Sci. MS* **34**, 72–78 (2018).
615. Calderaro, J. *et al.* Intra-tumoral tertiary lymphoid structures are associated with a low risk of early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **70**, 58–65 (2019).
616. Germain, C., Gnjatic, S. & Dieu-Nosjean, M.-C. Tertiary Lymphoid Structure-Associated B Cells are Key Players in Anti-Tumor Immunity. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
617. Kroeger, D. R., Milne, K. & Nelson, B. H. Tumor-Infiltrating Plasma Cells Are Associated with Tertiary Lymphoid Structures, Cytolytic T-Cell Responses, and Superior Prognosis in Ovarian Cancer. *Clin. Cancer Res.*

Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. **22**, 3005–3015 (2016).
618. Martinet, L. *et al.* Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. *Cancer Res.* **71**, 5678–5687 (2011).
619. Germain, C. *et al.* Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 832–844 (2014).
620. Li, Y. *et al.* Chemokine (C-X-C motif) ligand 13 promotes intrahepatic chemokine (C-X-C motif) receptor 5+ lymphocyte homing and aberrant B-cell immune responses in primary biliary cirrhosis. *Hepatol. Baltim. Md* **61**, 1998–2007 (2015).
621. Wakita, D. *et al.* Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur. J. Immunol.* **40**, 1927–1937 (2010).
622. Guéry, L. & Hugues, S. Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. *BioMed Res. Int.* **2015**, 314620 (2015).
623. Tajima, M., Wakita, D., Satoh, T., Kitamura, H. & Nishimura, T. IL-17/IFN-γ double producing CD8+ T (Tc17/IFN-γ) cells: A novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12. *Int. Immunol.* **23**, 751–759 (2011).
624. Hinrichs, C. S. *et al.* Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood* **114**, 596–599 (2009).
625. Yen, H.-R. *et al.* Tc17 CD8 T Cells: Functional Plasticity and Subset Diversity. *J. Immunol.* **183**, 7161–7168 (2009).
626. Stubbington, M. J. T. *et al.* T cell fate and clonality inference from single cell transcriptomes. *Nat. Methods* **13**, 329–332 (2016).
627. Tu, A. A. *et al.* TCR sequencing paired with massively parallel 3' RNA-seq reveals clonotypic T cell signatures. *Nat. Immunol.* **20**, 1692–1699 (2019).
628. Li, B. *et al.* Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nat. Genet.* **48**, 725–732 (2016).
629. Leruste, A. *et al.* Clonally Expanded T Cells Reveal Immunogenicity of Rhabdoid Tumors. *Cancer Cell* **36**, 597-612.e8 (2019).
630. Springer, I., Besser, H., Tickotsky-Moskovitz, N., Dvorkin, S. & Louzoun, Y. Prediction of specific TCR-peptide binding from large dictionaries of TCR-peptide pairs. *bioRxiv* 650861 (2020) doi:10.1101/650861.
631. Lanzarotti, E., Marcatili, P. & Nielsen, M. T-Cell Receptor Cognate Target Prediction Based on Paired α and β Chain Sequence and Structural CDR Loop Similarities. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
632. Fischer, D. S., Wu, Y., Schubert, B. & Theis, F. J. Predicting antigen-specificity of single T-cells based on TCR CDR3 regions. *bioRxiv* 734053 (2019) doi:10.1101/734053.
633. Ternette, N. & Purcell, A. W. Immunopeptidomics Special Issue. *Proteomics* **18**, e1800145 (2018).
634. Freudenmann, L. K., Marcu, A. & Stevanović, S. Mapping the tumour human leukocyte antigen (HLA) ligandome by mass spectrometry. *Immunology* **154**, 331–345 (2018).
635. Garrido, F., Romero, I., Aptsiauri, N. & Garcia-Lora, A. M. Generation of MHC class I diversity in primary tumors and selection of the malignant phenotype. *Int. J. Cancer* **138**, 271–280 (2016).
636. Saeed, A., Park, R., Al-Jumayli, M., Al-Rajabi, R. & Sun, W. Biologics, Immunotherapy, and Future Directions in the Treatment of Advanced Cholangiocarcinoma. *Clin. Colorectal Cancer* **18**, 81–90 (2019).
637. Loeuillard, E., Conboy, C. B., Gores, G. J. & Rizvi, S. Immunobiology of cholangiocarcinoma. *JHEP Rep.* **1**, 297–311 (2019).
638. Galon, J. & Bruni, D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **18**, 197–218 (2019).
639. Balatoni, T. *et al.* Tumor-infiltrating immune cells as potential biomarkers predicting response to treatment and survival in patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 141–151 (2018).
640. Hamid, O. *et al.* A prospective phase II trial exploring the association between tumor microenvironment biomarkers and clinical activity of ipilimumab in advanced melanoma. *J. Transl. Med.* **9**, 204 (2011).
641. Bourgeois-Daigneault, M.-C. *et al.* Combination of Paclitaxel and MG1 oncolytic virus as a successful strategy for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res. BCR* **18**, 83 (2016).
642. Pol, J. G. *et al.* Maraba virus as a potent oncolytic vaccine vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **22**, 420–429 (2014).
643. Pol, J. G. *et al.* Development and applications of oncolytic Maraba virus vaccines. *Oncolytic Virotherapy* **7**, 117–128 (2018).
644. Jakubowski, C. D. & Azad, N. S. Immune checkpoint inhibitor therapy in biliary tract cancer (cholangiocarcinoma). *Chin. Clin. Oncol.* **9**, 2 (2020).
645. Overwijk, W. W. *et al.* Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a 'self' antigen induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc.*

Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**, 2982–2987 (1999).
646. Dudley, M. E. *et al.* Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science* **298**, 850–854 (2002).
647. Schlom, J. *et al.* THERAPEUTIC CANCER VACCINES. *Adv. Cancer Res.* **121**, 67–124 (2014).
648. Finn, O. J. Cancer vaccines: between the idea and the reality. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 630–641 (2003).
649. Hodge, J. W., Grosenbach, D. W., Aarts, W. M., Poole, D. J. & Schlom, J. Vaccine Therapy of Established Tumors in the Absence of Autoimmunity. *Clin. Cancer Res.* **9**, 1837–1849 (2003).
650. Chatenoud, L., Salomon, B. & Bluestone, J. A. Suppressor T cells – they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol. Rev.* **182**, 149–163 (2001).
651. Gilboa, E. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2**, 789–792 (2001).
652. Vincent, B. G. *et al.* Toxin-Coupled MHC Class I Tetramers Can Specifically Ablate Autoreactive CD8+ T Cells and Delay Diabetes in Nonobese Diabetic Mice. *J. Immunol.* **184**, 4196–4204 (2010).
653. Hess, P. R. *et al.* Selective deletion of antigen-specific CD8+ T cells by MHC class I tetramers coupled to the type I ribosome-inactivating protein saporin. *Blood* **109**, 3300–3307 (2007).
654. Schultz, J. Success of Vaccine Offers Promise of Cervical Cancer Prevention. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **95**, 102–104 (2003).
655. Huang, K.-Y. & Lin, S.-R. Nationwide vaccination: A success story in Taiwan. *Vaccine* **18**, S35–S38 (2000).
656. Finn, O. J. & Forni, G. Prophylactic cancer vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 172–177 (2002).
657. Jaini, R. *et al.* An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. *Nat. Med.* **16**, 799–803 (2010).

Annexe


-2
0
2
Control
Control
Control

université PARIS-SACLAY

ÉCOLE DOCTORALE
Cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)

Titre : Le lien entre auto-immunité et immunosurveillance des cancers dans le cas des cholangites et du cholangiocarcinome

Mots clés : Immunosurveillance du cancer, auto-immunité, cholangite biliaire primitive, cholangite sclérosante primitive, cholangiocarcinome, lymphocytes T

Résumé : Le cancer des voies biliaires ou cholangiocarcinome (CC) est le 2è cancer hépatique primaire le plus fréquent. L'arsenal des traitements contre le CC est extrêmement limité en raison de la résistance aux chimioradiothérapies standardes et la faible efficacité de la résection chirurgicale. L'inflammation chronique est un facteur de risque reconnu pour le développement du cancer et deux maladies inflammatoires chroniques des voies biliaires sont caractérisées : la cholangite sclérosante primitive (CSP) et la cholangite biliaire primitive (CBP). Dans cette ligne, la CSP est la 1è étiologie du CC dans les pays occidentaux. En revanche, les patients atteints de CBP ne développent jamais de CC. De cette observation, nous avons émis l'hypothèse que l'autoimmunité associée à la CBP alimenterait l'immunosurveillance du CC et protégerait les patients de son émergence. Dans nos modèles murins, nous avons pu observer que la CBP réduisait la fréquence de développement de tumeurs et retardait la cinétique de croissance tumorale. A l'inverse, la CSP n'impactait pas la progression du CC. Nous avons également mis en évidence que cette protection était spécifique du CC et sans effet contre d'autres histotype de tumeur ; qu'elle était dépendante des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, des lymphocytes B, et en particulier dépendante de la réponse médiée par l'IFNγ. Dans l'ensemble, ces résultats appuient la possibilité que des réactions auto-immunes contre un auto-antigène spécifique d'un tissu, contribuent à l'immunosurveillance des cellules malignes de ce même tissu.

Title : The link between autoimmunity and cancer immunosurveillance during cholangitis and cholangiocarcinoma

Keywords : Cancer immunosurveillance, autoimmunity, primary biliary cholangitis, primary sclerosing cholangitis, cholangiocarcinoma, T lymphocytes

Abstract : Bile duct cancer or cholangiocarcinoma (CCA) is the second most common primary liver tumor. The arsenal of treatments for CCA is highly limited due to the resistance to standard chemoradiotherapies and to the low resection efficiency. Chronic inflammation is a well-known risk factor for cancer development, and two chronic inflammatory diseases of the bile ducts are characterized: primary sclerosing cholangitis (PSC) and primary biliary cholangitis (PBC). Hence, PSC is the 1st etiology established of CCA in Western countries. In contrast, patients with PBC never develop CCA. Based on this observation, we hypothesized that PBC- associated autoimmunity would fuel CCA immunosurveillance and protect the patients from its emergence. In our mouse models, we observed that PBC reduced the frequency of tumor onset and delayed the tumor growth kinetic. Conversely, PSC did not impact the progression of the CCA. We demonstrated that this protection was CCA-specific and did not have any effects on others tumor histotypes. It was also dependent on $CD4^+$ and $CD8^+$ T lymphocytes, B cells, and especially dependent on the IFNγ-mediated response. Altogether, these results evidence a mechanistic overlapping between autoimmunity and cancer immunosurveillance, with autoimmune reactions against organ-specific self-antigens contributing to the elimination of malignant cells originating from the same tissue.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France