



**HAL**  
open science

# Suivi de la réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène exprimé dans le foie

Anaïs Cardon

► **To cite this version:**

Anaïs Cardon. Suivi de la réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène exprimé dans le foie. Immunologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1002 . tel-04161344

**HAL Id: tel-04161344**

**<https://theses.hal.science/tel-04161344>**

Submitted on 13 Jul 2023

**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.

# THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « *Immunologie* »

Par

**Anaïs CARDON**

## **Suivi de la réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène exprimé dans le foie**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 29 juin 2022

Unité de recherche : Centre de recherche translationnelle en transplantation et immunologie (CR2TI), INSERM UMR1064, Nantes

### **Rapporteurs avant soutenance :**

Sylvaine You Directrice de recherche – Institut Cochin (INSERM U1016)  
David-Alexandre Gross Chargé de recherche – INTEGRARE (INSERM UMR951)

### **Composition du Jury :**

Présidente :	Sylvaine You	Directrice de recherche – Institut Cochin (INSERM U1016)
Examineurs :	Sara Lemoine Philippe Gual	MCU-PH – Hôpital Saint-Antoine, Paris Directeur de recherche – Centre méditerranéen de médecine moléculaire (INSERM U1065)
Dir. de thèse :	Sophie Conchon	Directrice de recherche - Centre de recherche translationnelle en transplantation et immunologie (INSERM UMR1064)
Co-enc. de thèse :	Amédée Renand	Chargé de recherche - Centre de recherche translationnelle en transplantation et immunologie (INSERM UMR1064)



## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier les docteurs Sophie Conchon et Amédée Renand pour leur supervision durant cette thèse. Merci d'avoir cru en moi et mes capacités et de m'avoir épaulée tout au long de cette aventure. Car oui, la thèse est une aventure, certes semée d'embûches et de détours, mais surtout parcourue de moments d'exaltations scientifiques qui nous donnent l'envie d'aller toujours plus loin. Je vous remercie pour les nombreuses discussions qui ont permis de faire avancer ce projet. J'ai beaucoup appris à vos côtés, merci.

Je voudrais également remercier les membres de mon jury de thèse, les docteurs Sylvaine You et David-Alexandre Gross en leur qualité de rapporteurs et les docteurs Sara Lemoine et Philippe Gual en leur qualité d'examineurs, d'avoir accepté d'évaluer ce travail et pour le temps consacré à la lecture de ce manuscrit.

Je remercie les docteurs Emmanuelle Godefroy et Jean-Pierre Couty pour leur participation à mes comités de suivi individuel tout au long de ma thèse. Votre écoute, vos remarques et vos conseils ont permis de faire avancer ce travail.

L'une des principales personnes méritant des remerciements, sinon la principale, est Jean-Paul Judor. Je te suis infiniment reconnaissante du temps que tu m'as accordé, de mes débuts en tant que stagiaire jusqu'à cette fin de thèse. Tu as toujours su prêter une oreille attentive et être de bon conseil. Je ne saurais également mentionner les nombreuses heures de manip pendant lesquelles tu m'as été d'une grande aide. Sans toi, cette thèse n'aurait pu être ce qu'elle est aujourd'hui.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'UTE IRS-UN, qui non seulement ont fourni un support technique pour l'avancée de ce projet mais également ont permis de rendre le travail à l'animalerie plus agréable. Je remercie ensuite l'ensemble des membres de la plateforme MicroPICell pour leur aide technique et aussi pour les discussions toujours intéressantes, scientifiques et moins scientifiques.

J'aimerais remercier l'ensemble des membres du laboratoire pour avoir contribué à instaurer un climat enrichissant et stimulant scientifiquement. Quelle que soit la technique

étudiée, il y aura toujours une personne bienveillante pour vous conseiller. Je remercie particulièrement Juliette R., Gwen, Flora, Cécile P., Laurence D., Manu, Jean-Marc et bien d'autres encore pour les discussions et les rigolades au détour d'un couloir. C'était toujours un vrai bonheur de vous croiser.

Enfin, d'un point de vue plus personnel, je tiens à remercier les personnes grâce à qui ces quatre années de thèse ont été ponctuées de moments de rire, de joie et de soutien. Tout d'abord, les copains du laboratoire : Éléa (à jamais n°1), Estelle, Rokhaya, Olivia, Venceslas, Cécile B., Aurore, Abel, Magalie, Marion, Marine, Alice, Malo, Alex, Pierre et Nathan. Mais également les copains du quotidien : Helena, Lennaïg, Édouard, Vincent, Maxime, Sebastien et Flavie. Un grand merci à ma famille pour leur soutien intarissable depuis toujours. Enfin, je souhaite mentionner Laïka, qui m'a permis de m'aérer l'esprit lors de multiples balades et de nombreux moments de folie.

Pour terminer, je remercie particulièrement Corentin pour sa patience et son soutien au quotidien. Je ne saurais imaginer comment ces quatre années se seraient déroulées sans toi.

# Table des matières

Liste des figures et tableaux.....	7
Liste des abréviations.....	9
INTRODUCTION.....	12
PARTIE 1 Introduction à la réponse immunitaire adaptative.....	13
1. L'activation du système immunitaire adaptatif.....	13
1.1. La différenciation des lymphocytes T.....	13
1.2. La différenciation des lymphocytes B.....	17
2. La réponse immunitaire adaptative auto-réactive.....	19
2.1. La tolérance centrale.....	20
2.2. L'échappement des lymphocytes auto-réactifs.....	21
PARTIE 2 La réponse immunitaire tolérogène dans le foie.....	24
1. L'architecture particulière du foie.....	24
1.1. L'anatomie hépatique.....	24
1.2. Les cellules hépatiques présentatrices d'antigènes.....	26
2. La réponse immunitaire hépatique pro-tolérogène.....	28
2.1. Les cellules hépatiques pro-tolérogènes.....	28
2.2. Le foie en homéostasie.....	31
2.2.1. La tolérisation des LT CD8 <sup>+</sup> dans le foie.....	31
2.2.2. La tolérisation des LT CD4 <sup>+</sup> dans le foie.....	33
2.3. Le foie en condition pathologique.....	39
2.3.1. Les LT CD8 <sup>+</sup> et CD4 <sup>+</sup> dans le cas d'infections virales hépatiques chroniques.....	40
2.3.2. Les LT CD8 <sup>+</sup> et LT CD4 <sup>+</sup> dans le cas du carcinome hépatocellulaire.....	45
3. Le détournement du potentiel tolérogène hépatique à des fins thérapeutiques.....	48
3.1. La thérapie génique ciblant le foie pour le traitement de pathologies monogéniques et auto-immunes.....	48
3.2. La thérapie génique ciblant le foie pour la transplantation.....	50
3.3. L'utilisation de nanoparticules ciblant le foie.....	52
PARTIE 3 La réponse immunitaire auto-immune dans le foie.....	56
1. Les caractéristiques cliniques de l'hépatite auto-immune.....	56
1.1. L'épidémiologie.....	56
1.2. Le diagnostic et les traitements.....	57
1.3. Les prédispositions génétiques et facteurs environnementaux.....	59

2. Les caractéristiques immunologiques et cellulaires de l'hépatite auto-immune.....	61
2.1. Les auto-anticorps .....	61
2.2. L'infiltration lymphocytaire hépatique .....	62
2.3. Les modifications des cellules non-parenchymateuses.....	64
2.4. La réactivité antigénique .....	65
3. Le rôle des LT CD4 <sup>+</sup> dans l'hépatite auto-immune.....	67
3.1. Les LT CD4 <sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients .....	67
3.1.1. L'enrichissement en LT CD4 <sup>+</sup> pathogéniques .....	67
3.1.2. Le défaut de régulation des LT CD4 <sup>+</sup> .....	69
3.2. L'implication des LT CD4 <sup>+</sup> dans les modèles murins.....	71
3.2.1. Les modèles sans spécificité antigénique .....	71
3.2.2. Les modèles TCR transgéniques.....	77
3.2.3. Les modèles d'immunisation ciblant des auto-antigènes hépatiques .....	81
PARTIE 4 Synthèse du projet.....	88
RÉSULTATS.....	90
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	137
1. L'induction d'une réponse de type auto-réactive dans le foie dans un contexte inflammatoire .....	140
2. L'induction de l'expression d'un antigène dans le foie post-immunisation périphérique conditionne le recrutement intra-hépatique des LT CD4 <sup>+</sup> antigène-spécifiques.....	145
3. La tolérance vis-à-vis d'un néo-antigène hépatique exprimé en condition non-inflammatoire est robuste.....	150
4. Les LT CD8 <sup>+</sup> HA-spécifiques dans les modèles Ad Cre.....	154
5. Les LT CD4 <sup>+</sup> antigène-spécifiques intra-hépatiques présentent un profil auto-réactif .....	157
6. L'étude de la rupture des mécanismes de tolérisation des LT CD4 <sup>+</sup> auto-réactifs.....	160
7. Perspectives pour une amélioration de la caractérisation de nos modèles .....	163
CONCLUSION .....	165
RÉFÉRENCES.....	168
ANNEXES.....	188

## Liste des figures et tableaux

Figure 1 : La reconnaissance antigénique par les LT CD4 <sup>+</sup> et LT CD8 <sup>+</sup> .....	14
Figure 2 : L'apoptose provoquée par les LT cytotoxiques.....	15
Figure 3 : Les différentes sous-populations de LT CD4 <sup>+</sup> .....	16
Figure 4 : Les fonctions effectrices des anticorps. ....	18
Figure 5 : La sélection positive et la sélection négative des thymocytes.....	20
Figure 6 : Les maladies auto-immunes organe-spécifiques. ....	22
Figure 7 : L'anatomie hépatique. ....	25
Figure 8 : Le rôle des cellules hépatiques dans la tolérance.....	30
Figure 9 : Les mécanismes de tolérisation des LT CD4 <sup>+</sup> dans le foie. ....	39
Figure 10 : Prévalence de l'hépatite B et de l'hépatite C dans le monde. ....	40
Figure 11 : Les LT CD8 <sup>+</sup> et CD4 <sup>+</sup> antigène-spécifiques dans la pathogenèse des hépatites virales chroniques. ....	42
Figure 12 : L'incidence du carcinome hépatocellulaire dans le monde. ....	45
Figure 13 : Les LT CD8 <sup>+</sup> et CD4 <sup>+</sup> dans la pathogenèse du CHC. ....	47
Figure 14 : Induction de tolérance vis-à-vis d'une greffe de peau présentant une molécule de CMH allogénique via l'utilisation d'une thérapie génique ciblant le foie.....	52
Figure 15 : L'hépatite d'interface. ....	58
Figure 16 Le mimétisme moléculaire.....	60
Figure 17 : Le rôle précurseur des LT CD4 <sup>+</sup> dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune. ....	63
Figure 18 : Le rôle des LT CD4 <sup>+</sup> dans l'HAI mis en évidence chez les patients. ....	69
Figure 19 : Le modèle ConA.....	73
Figure 20 : Le modèle NTxPD-1 <sup>-/-</sup> . ....	75
Figure 21 : Le modèle TAM <sup>-/-</sup> . ....	77
Figure 22 : Les modèles TCR transgéniques.....	80
Figure 23 : Les modèles d'immunisation antigène-spécifiques ciblant des auto-antigènes hépatiques.....	83

Figure 24 : Les LT CD4 <sup>+</sup> dans l'HAI.....	87
Figure 25 : Représentation schématique de la génération du modèle HA <sup>fl</sup> /Cre <sup>ind-/+</sup> .....	138
Figure 26 : L'injection de l'Ad Cre permet l'expression d'une recombinaise Cre induisant l'expression de HA. ....	140
Figure 27 : Mécanisme d'action de l'Ad Cre injecté en intraveineux. ....	141
Figure 28 : Une faible pré-immunisation périphérique permet le recrutement intra-hépatique de LT CD4 <sup>+</sup> antigène-spécifiques après induction de l'expression hépatique de l'antigène.	147
Figure 29 : La réponse adaptative anti-HA est proportionnelle à la dose d'Ad Cre i.m. injectée. ....	149
Figure 30 : L'expression hépatique de HA induite par le tamoxifène inhibe le recrutement intra-hépatique de LT CD4 <sup>+</sup> HA-spécifiques provoqué par l'Ad Cre i.v.....	152
Figure 31 : L'Ad Cre induit une forte réponse T CD8 <sup>+</sup> HA-spécifique.....	155
Figure 32 : Le mimétisme moléculaire associé à une exposition chronique de l'auto-antigène pourraient déclencher la réaction auto-immune hépatique. ....	162
Figure 33 : L'auto-réactivité hépatique est induite dans un contexte d'immunisation périphérique mais est fortement régulée chez la souris.....	166
Tableau 1 : Les mécanismes de tolérisation des LT CD4 <sup>+</sup> dans le foie.....	34
Tableau 2 : Les molécules du CMH de classe I et II du système H-2 murin et la variabilité des haplotypes H-2 selon les souches de souris.....	51
Tableau 3 : Caractéristiques de l'HAI-1 et de l'HAI-2.....	57
Tableau 4 : Score diagnostique simplifié de l'HAI. ....	59
Tableau 5 : Le rôle des LT CD4 <sup>+</sup> dans la pathogenèse de l'HAI. ....	86
Tableau 6 : Principaux gènes dont l'expression est augmentée dans les LT CD4 <sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques.....	158

## Liste des abréviations

### A

- AAV : *Adeno-associated virus*, virus adéno-associé
- ADCC : *Antibody-dependent cell-mediated toxicity*, cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps
- ADH : Alcool déshydrogénase
- AHR : *Aryl hydrocarbon receptor*
- AIRE : *Autoimmune regulator*
- ALAT : Alanine
- ANA : *Anti-nuclear antibodies*, anticorps anti-nucléaires
- ASAT : Aspartate
- ASGPR : *Asialoglycoprotein receptor*, récepteur à l'asialoglycoprotéine

### B

- BCR : *B cell receptor*, récepteur des cellules B
- $\beta$ -Gal :  $\beta$ -galactosidase

### C

- CBP : Cholangite biliaire primitive
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
  - CMH-I / CMH-II : de classe I / de classe II
- CHC : Carcinome hépatocellulaire
- ConA : Concanavaline A
- CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
- CSP : Cholangite sclérosante primitive
- CYP2D6 : Cytochrome P450 2D6
  - hCYP2D6 : humain

### D

- DAMP : *Danger-associated molecular pattern*, motif moléculaire associé au danger

### F

- FasL : Fas ligand
- FIX : Facteur IX
- FTCD : Formiminotransférase cyclodésaminase
  - hFTCD : humain

### H

- HAV/HBV/HCV/HDV/HEV : *Hepatitis A/B/C/D/E virus*, virus de l'hépatite A/B/C/D/E
- HA : Hémagglutinine
- HAI : Hépatite auto-immune
  - HAI-1 / HAI-2 : de type 1 / de type 2
- hDC : *hepatic dendritic cell*, cellule dendritique hépatique
- HLA : *Human leukocyte antigen*, antigène leucocytaire humain
- HSC : *hepatic stellate cell*, cellule étoilée hépatique

### I

- ICI : *immune checkpoint inhibitor*, inhibiteur de point de contrôle immunitaire
- ICP : *immune checkpoint*, point de contrôle immunitaire
- IFA : *incomplete Freund's adjuvant*, adjuvant de Freund incomplet

- Ig : Immunoglobuline
- IL-17R : Récepteur à l'IL-17

## K

- KC : *Kupffer cell*, cellule de Kupffer

## L

- LB : Lymphocyte B
- LC-1 : *Liver cytosol 1*
- LCMV : *Lymphocytic choriomeningitis virus*, virus de la chorioméningite lymphocytaire
  - Arm : souche Armstrong
  - C13 : souche clone 13
- LKM-1 : *Liver kidney microsomal type 1*
- LPS : Lipopolysaccharide
- LSEC : *Liver sinusoidal endothelial cell*, cellule endothéliale des sinusoides hépatiques
- LSP : *Liver-specific membrane lipoprotein*, lipoprotéine membranaire spécifiques du foie
- LT : Lymphocyte T

## M

- MAI : Maladie auto-immune
- MAIT : *Mucosal associated invariant T cell*, lymphocyte T invariant associé aux muqueuses
- MOG : *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*, glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline

## N

- (cellules) NK : *Natural killer (cells)*
- (cellules) NKT : *Natural killer T (cells)*
- NP : Nanoparticules
- NPC : *Non-parenchymal cells*, cellules non-parenchymateuses

## O

- OVA : Ovalbumine

## P

- PBMC : *Peripheral blood mononuclear cells*, cellules mononucléées sanguines périphériques
- PD-1 : *Programmed cell death 1*
- PD-L1 : *Programmed death-ligand 1*
- PRR : *Pattern recognition receptor*, récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

## R

- RTE : *Recent thymic emigrant*

## S

- SLA : *Soluble liver antigen*, antigène soluble du foie
- SLP : *Soluble liver pancreas*
- SMA : *Anti-smooth muscles antibodies*, anticorps anti-muscles lisses

## T

- TAM : Tyro3, Axl, MERTK
- TCR : *T cell receptor*, récepteur des cellules T

- TEC : Cellule épithéliale thymique
  - cTEC : du cortex
  - mTEC : de la médulla
- Tfh : *T follicular helper*, lymphocyte T auxiliaire folliculaire
- Tfr : *follicular regulatory T cell*, lymphocyte T folliculaire régulateur
- TLR : *Toll-like receptors*, récepteur de type Toll
- Tph : *Peripheral T helper cells*, lymphocyte T auxiliaire périphérique
- Tregs : Lymphocyte T régulateur CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>
- T<sub>RM</sub> : *Tissue-resident memory T cell*, lymphocyte T résident des tissus

# **INTRODUCTION**

# PARTIE 1

## Introduction à la réponse immunitaire adaptative

Notre système immunitaire est une machinerie remarquablement évoluée. Il nous protège contre les infections et le développement de pathologies. Ce système se divise en deux types de réponses : la réponse innée et la réponse adaptative [1].

L'immunité innée est notre première ligne de défense contre les infections par des pathogènes. Cette immunité est non-spécifique, elle est donc extrêmement rapide à se mettre en place. La réponse immunitaire adaptative est plus longue à se développer, jusqu'à 7 jours, mais elle est spécifique du pathogène et permet une mémoire immunitaire sur le long terme, notamment via la génération d'anticorps [1].

Cette partie n'a pas vocation à étudier en détail la mise en place de la réponse immunitaire adaptative mais à présenter brièvement les différents acteurs de cette réponse et à introduire la notion de lymphocytes auto-réactifs.

### 1. L'activation du système immunitaire adaptatif

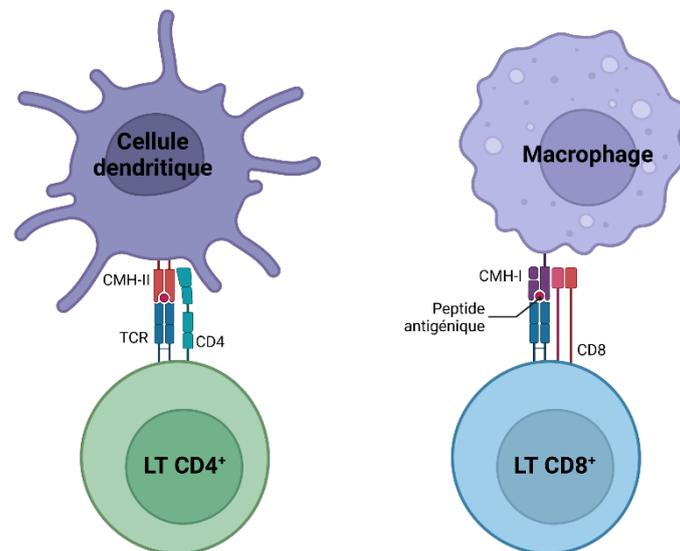
L'activation de notre système immunitaire adaptatif se fait en deux temps. D'abord, les sentinelles de notre organisme, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), reconnaissent les antigènes étrangers. Puis, elles induisent l'activation des acteurs clés de notre réponse adaptative : les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Ces cellules activées migrent alors sur le site infectieux afin d'éliminer le pathogène [2].

#### 1.1. La différenciation des lymphocytes T

Les LT peuvent être activés par toutes les CPA professionnelles (cellules dendritiques, macrophages, LB). Cette activation nécessite la reconnaissance par le récepteur des cellules T (*T cell receptor* en anglais ou TCR) de complexes CMH/peptide présentés à la surface des CPA.

Il existe deux types de molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) : les molécules de classe I (CMH-I) et les molécules de classe II (CMH-II) [3]. Ces molécules, de

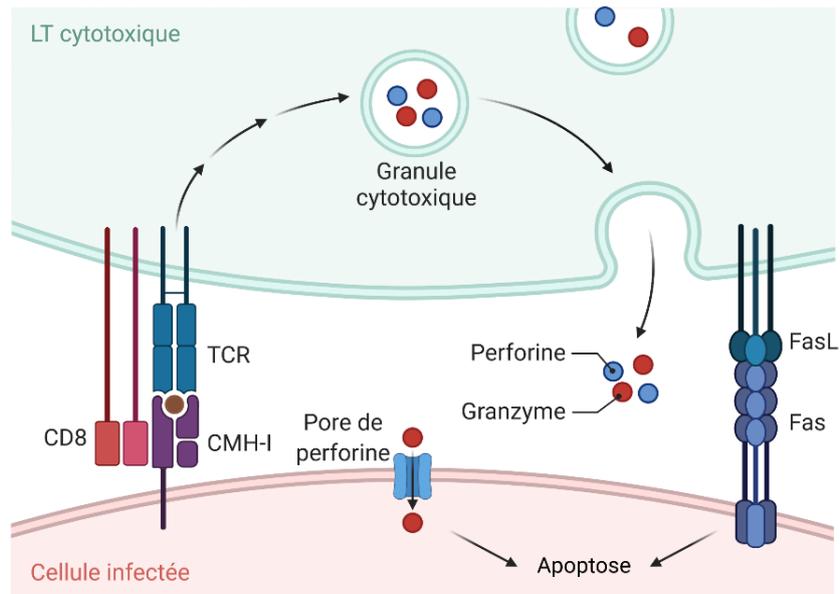
structures différentes, sont spécifiques de l'activation des LT CD4<sup>+</sup> (CMH-II) et des LT CD8<sup>+</sup> (CMH-I) (Figure 1).



**Figure 1 : La reconnaissance antigénique par les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup>.** Les CPA, telles que les cellules dendritiques ou les macrophages, sont capables d'activer les LT en présentant des peptides antigéniques à la surface de molécules de CMH, on parle de complexe CMH/peptide. Les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent des complexes CMH/peptide composés respectivement de molécules de CMH-II ou de molécules de CMH-I.

Les CPA fournissent également des signaux de co-stimulation tels que l'interaction de CD28 à la surface des LT avec les molécules CD80 ou CD86 à la surface des CPA permettant de stimuler la prolifération et la différenciation des LT.

Après activation par les CPA, les LT CD8<sup>+</sup> se différencient en LT cytotoxiques. Ces cellules sont capables de s'activer sans nécessité de signal de co-stimulation (interaction de CD28 avec CD80 ou CD86). Elles induisent la lyse des pathogènes grâce à la production de granules cytoplasmiques (granzyme, perforine) et à l'expression de certaines molécules membranaires, telles que Fas ligand (FasL) [4]. Les perforines façonnent un pore dans la membrane de la cellule cible puis les granzymes pénètrent dans la cellule et induisent une cascade de signalisation provoquant l'apoptose de la cellule cible (Figure 2). De la même manière, la liaison de FasL au récepteur de mort Fas à la surface de la cellule cible entraîne l'apoptose de cette dernière (Figure 2).



**Figure 2 : L'apoptose provoquée par les LT cytotoxiques.** Les LT cytotoxiques produisent des granules cytotoxiques constituées de perforine et de granzyme. La perforine forme un pore dans la membrane de la cellule cible permettant le passage du granzyme. Ce dernier induit l'apoptose de la cellule infectée. De même, la liaison de FasL au récepteur de mort Fas sur la cellule cible induit l'apoptose de cette cellule.

Les LT CD4<sup>+</sup> après activation peuvent se différencier en différentes sous-populations dont les principales sont les lymphocytes Th1, les lymphocytes Th2, les LT régulateurs et les lymphocytes Th17. Cette liste n'est pas exhaustive et il en existe d'autres telles que les lymphocytes Tfh (*T follicular helper* en anglais, lymphocytes T auxiliaires périphériques) ou encore les lymphocytes Th9. L'engagement dans une voie de différenciation dépend des cytokines environnantes lors de l'activation (Figure 3) [5]. Ces lymphocytes expriment alors diverses molécules et cytokines leur conférant des rôles différents dans la réponse immunitaire (Figure 3) [6].

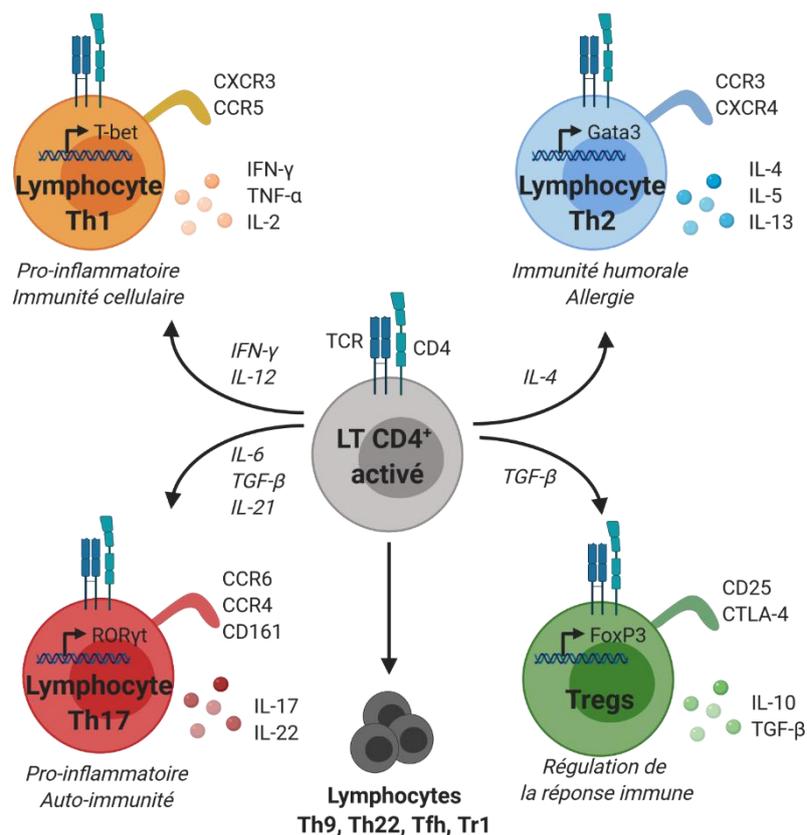
Les lymphocytes Th1 participent à l'immunité cellulaire en sécrétant de l'IL-2 ou de l'IFN- $\gamma$  qui leur permet respectivement de stimuler l'activité des LT cytotoxiques ou d'activer les macrophages. Grâce à leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ , ils participent également à l'induction et l'entretien de l'inflammation.

Les lymphocytes Th2 participent à l'immunité humorale en fournissant l'IL-4 et l'IL-13 permettant la production d'anticorps par les LB différenciés. Ils sont impliqués dans la réponse anti-parasitaire mais également dans l'allergie puisqu'ils favorisent la production d'IgE par les LB grâce à leur production d'IL-4.

Les LT régulateurs sont les acteurs centraux de la régulation de la réponse immune. Cette appellation regroupe une grande variété de cellules dont les plus étudiées et caractérisées sont les LT régulateurs exprimant le facteur de transcription FoxP3 et le récepteur de surface CD25 (sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2). Dans la suite de ce manuscrit, nous emploierons donc le terme de Tregs afin de désigner les LT régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Les Tregs expriment des récepteurs inhibiteurs participant à la régulation de la réponse immune tels que CTLA-4 ou encore PD-1. Leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  permet également d'inhiber l'activation des LT.

Les lymphocytes Th17 sont pro-inflammatoires grâce à leur production d'IL-17. Ils sont principalement impliqués dans la réponse anti-fongique et ont notamment été décrits comme acteurs de différentes pathologies auto-immunes [7].

Les lymphocytes Tfh sont les acteurs de l'immunité humorale grâce à leur sécrétion d'IL-21 permettant la différenciation des LB dans les centres germinatifs.



**Figure 3 : Les différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup>.** En fonction des signaux cytokiniques reçus, les LT CD4<sup>+</sup> activés peuvent se différencier en différentes sous-populations.

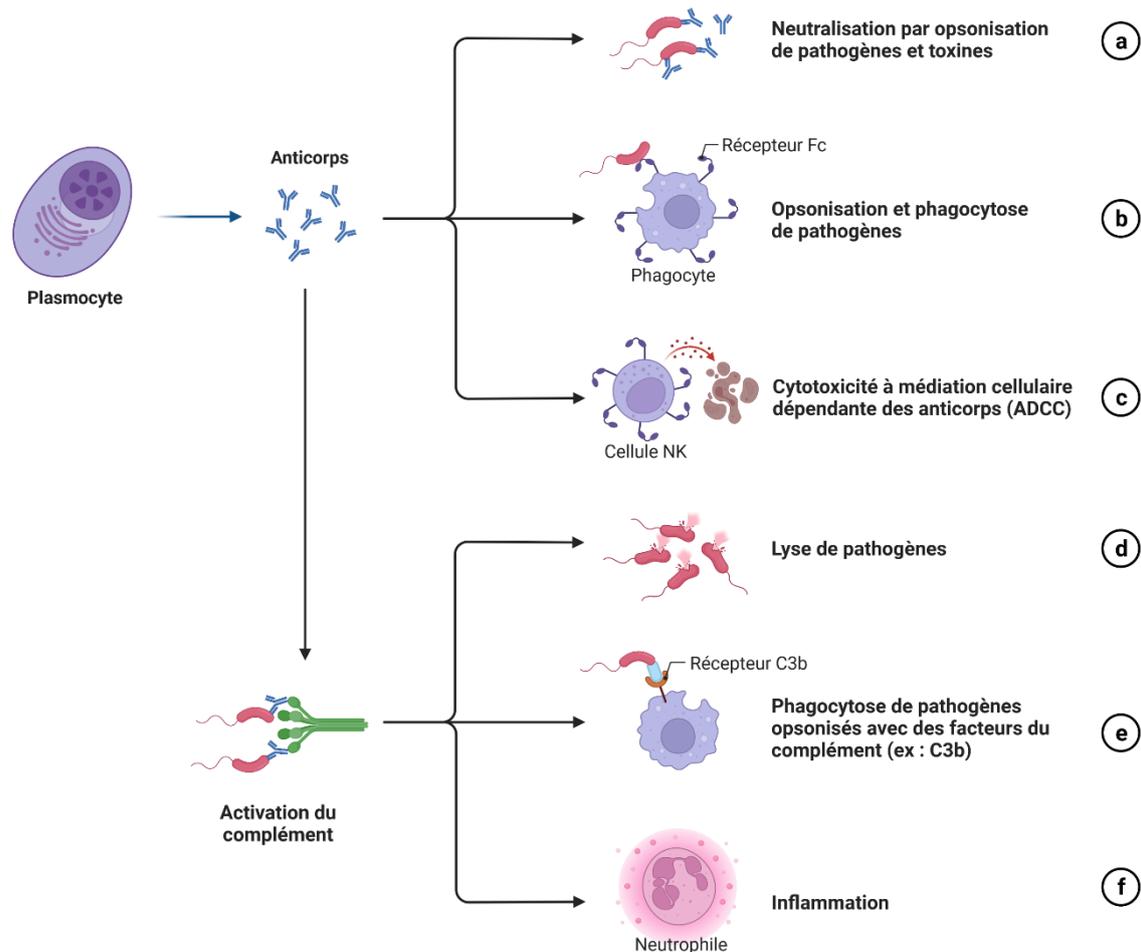
Après la phase effectrice de différenciation et de prolifération, les LT peuvent se différencier en LT mémoires. Ces cellules sont les gardiens de la réponse antigène-spécifique initiée lors de la réponse primaire (première infection par un pathogène). Ils vont permettre l'induction d'une réponse immunitaire secondaire lors de la deuxième infection plus rapide que lors de la réponse primaire [5].

## 1.2. La différenciation des lymphocytes B

Les LB sont des CPA professionnelles particulières. Elles sont capables de reconnaître directement et de manière spécifique les antigènes grâce à leur récepteur de cellules B (*B cell receptor* en anglais ou BCR). Le BCR à la surface des LB est associé à différents co-récepteurs, tels que CD19, participant à l'induction d'un signal d'activation intracellulaire [6].

L'activation des LB est en majorité dépendante des LT CD4<sup>+</sup>, plus particulièrement Tfh et Th2. Ces derniers vont présenter la molécule CD40L à leur surface, ligand de la molécule de co-stimulation CD40 présente à la surface des LB. De plus, l'IL-21 produite par les lymphocytes Tfh ainsi que l'IL-4 et l'IL-13 produites par les lymphocytes Th2 permettent aux LB de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en LB mémoires [8].

Les anticorps sécrétés par les plasmocytes sont des immunoglobulines (Ig) sous une forme libre. Ils participent à l'élimination des pathogènes grâce à différents modes d'action directs ou indirects [9]. Les anticorps sont capables de neutraliser directement les pathogènes en se fixant à leur surface empêchant la fixation de ces derniers sur nos cellules selon le phénomène d'opsonisation (Figure 4a). La fixation des anticorps sur le pathogène peut également entraîner l'internalisation et la lyse de celui-ci par les phagocytes (cellules dendritiques, macrophages, neutrophiles) (Figure 4b). Les anticorps sont également capables d'induire la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (*antibody-dependent cell-mediated toxicity* en anglais ou ADCC). Les anticorps fixés sur un pathogène vont se lier aux cellules NK (*natural killer* en anglais) grâce aux récepteurs Fc à leur surface, ces derniers vont alors entraîner la lyse du pathogène grâce au relargage de diverses molécules cytotoxiques (Figure 4c).



**Figure 4 : Les fonctions effectrices des anticorps.** Les anticorps peuvent provoquer l'élimination des pathogènes de façon directe et indirecte. En se fixant à la surface des pathogènes, ils peuvent neutraliser leur fixation sur les cellules, induire leur opsonisation et leur phagocytose ou encore déclencher un mécanisme d'ADCC. Les anticorps peuvent également activer le système du complément qui va alors provoquer directement la lyse des pathogènes, induire leur phagocytose ou entraîner une inflammation.

De manière indirecte, les anticorps vont également provoquer la lyse du pathogène grâce à l'activation du complément. Le complément est un système regroupant plusieurs enzymes protéolytiques appelés facteurs du complément [10]. Ces facteurs peuvent directement entraîner la lyse du pathogène grâce à leur activité enzymatique (Figure 4d). Comme les anticorps, le facteur du complément C3b peut induire l'opsonisation du pathogène permettant la phagocytose et la dégradation de celui-ci (Figure 4e). Enfin, certains facteurs du complément vont induire une inflammation qui va permettre le recrutement d'autres cellules immunitaires, tels que les neutrophiles (Figure 4f).

Le BCR à la surface des LB est une Ig dans sa forme ancrée dans la membrane du LB. Lorsque les LB se différencient en plasmocytes, ils sécrètent des anticorps de même classe que le BCR à la surface du plasmocyte. Il existe cinq classes d'Ig (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA) mais avant activation, les LB naïfs présentent à leur surface uniquement des BCR de classe IgM ou IgD. Ainsi, la réponse primaire va principalement induire une réponse IgM. Toutefois, il peut se produire un phénomène de commutation isotypique induisant des réarrangements géniques au sein du LB et entraînant une conversion de classe d'Ig à sa surface [11]. Le plasmocyte va alors pouvoir sécréter les différentes classes d'Ig ayant des fonctions effectrices différentes. La neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément sont principalement effectuées par les IgG, IgM et IgA. L'ADCC est principalement induite par les IgG. Les IgE sont plutôt impliquées dans la lutte contre les parasites et dans la réponse allergique via l'activation de basophiles et mastocytes sécréteurs de granules. Enfin, les IgD sont peu abondantes et ne présentent pas de fonction biologique effectrice particulière [12].

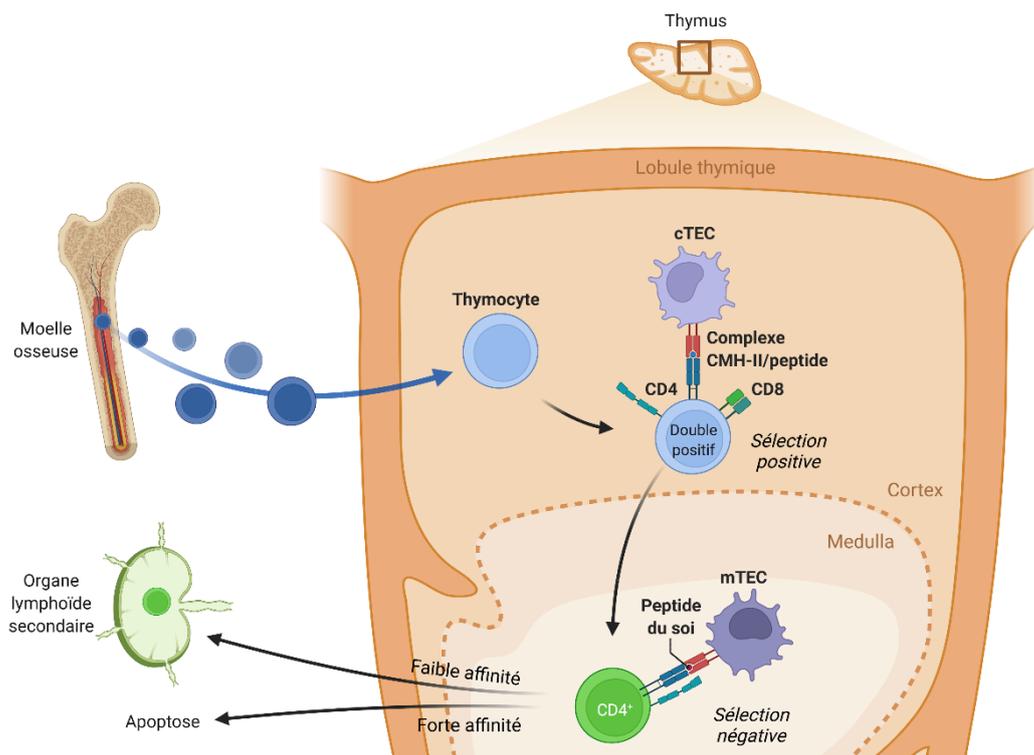
Les LB activés peuvent également se différencier en LB mémoires induisant une réponse immunitaire plus rapide lors de la réponse secondaire, environ 3 jours contre 6 à 7 jours lors de la réponse primaire [13].

## 2. La réponse immunitaire adaptative auto-réactive

Les LB et les LT sont capables de reconnaître une immense variété d'antigènes. Cette variabilité est rendue possible grâce aux différents réarrangements géniques qui s'opèrent lors de la génération du BCR ou du TCR [6]. Ces réarrangements étant aléatoires, une proportion importante des lymphocytes générés exprime des récepteurs non fonctionnels ou capables de reconnaître nos peptides du soi exprimés à la surface de nos cellules. Afin d'éviter la mise en place d'une auto-immunité, c'est-à-dire d'une attaque de nos antigènes du soi ou auto-antigènes par notre système immunitaire, il est primordial que ces lymphocytes dits auto-réactifs soient éliminés [14,15].

## 2.1. La tolérance centrale

L'élimination des LT auto-réactifs se déroule très tôt dans leur processus de maturation, lorsque les LT ne sont pas encore des cellules matures mais plutôt des précurseurs immatures appelés thymocytes [6]. Ces derniers sont générés dans la moelle osseuse puis ils migrent dans le thymus afin de subir des étapes de sélection permettant d'éliminer les LT auto-réactifs, c'est la tolérance centrale. Cette sélection se déroule en deux temps : une phase de sélection positive puis une phase de sélection négative [6] (Figure 5). La sélection positive fait intervenir les cellules épithéliales thymiques du cortex (cTEC) exprimant des complexes CMH/peptide et permet d'éliminer les thymocytes non-fonctionnels incapables de reconnaître ces complexes [16]. Ensuite, les thymocytes résiduels subissent une sélection négative impliquant les cellules épithéliales thymiques de la médulla (mTEC) exprimant des complexes CMH/peptide du soi. Elle permet d'éliminer les thymocytes reconnaissant ces complexes avec une trop grande affinité. La sélection négative dépend de l'expression d'auto-antigène par les



**Figure 5 : La sélection positive et la sélection négative des thymocytes.** Les thymocytes originaires de la moelle osseuse migrent vers le thymus. Ces thymocytes doubles positifs, exprimant les récepteurs CD4 et CD8, interagissent avec les cTEC. S'ils reconnaissent le complexe CMH/peptide présenté par la cTEC, ils reçoivent un signal de survie, c'est la sélection positive. Cette reconnaissance induit également la perte d'un des récepteurs CD4 ou CD8, ils deviennent simples positifs. Les thymocytes simples positifs interagissent ensuite avec les mTEC présentant des complexes CMH/peptide du soi. Si les thymocytes reconnaissent ce complexe avec une faible affinité, ils reçoivent un signal de survie et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires, ils deviennent des LT naïfs. S'ils reconnaissent ce complexe avec une forte affinité, ils sont éliminés, c'est la sélection négative.

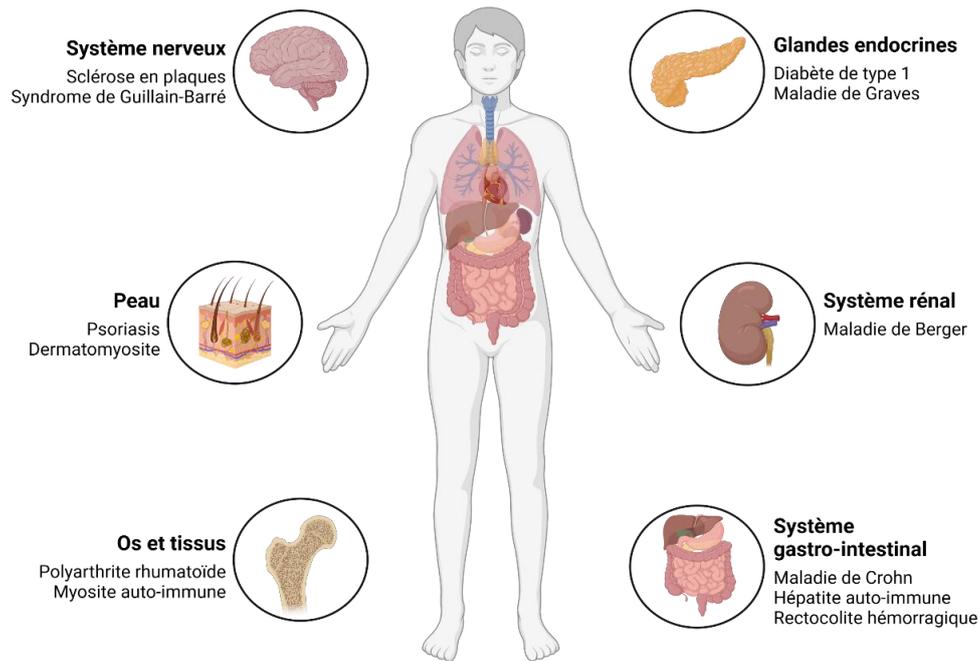
mTEC qui est régulée par le facteur de transcription AIRE (*autoimmune regulator* en anglais). À l'issue de ces deux étapes de sélection, seuls 5% des thymocytes initialement produits survivent et deviennent des LT matures naïfs.

De la même manière, les LB auto-réactifs sont éliminés via une unique étape de sélection négative. Celle-ci se déroule directement dans la moelle osseuse. Les LB immatures reconnaissant les peptides du soi avec une trop forte affinité sont éliminés par apoptose [8]. Seuls 10% des LB immatures survivent à la sélection négative et deviennent des LB matures naïfs.

## 2.2. L'échappement des lymphocytes auto-réactifs

Dans certaines situations, il arrive que les lymphocytes auto-réactifs échappent à la sélection négative (LT ayant une faible affinité pour l'auto-antigène, auto-antigène non présenté dans le thymus, défaut du facteur de transcription AIRE impliqué dans la présentation des auto-antigènes, etc.). Ces cellules peuvent alors conduire au développement de maladies auto-immunes (MAI). Ces maladies correspondent à une attaque et une destruction des tissus de notre organisme par notre système immunitaire [17].

Les MAI sont des pathologies rares, présentes chez 3 à 5% de la population générale [17]. L'échappement des lymphocytes auto-réactifs et leur présence dans notre organisme ne conduit pas nécessairement au développement de MAI. Ce développement est souvent associé à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux [18]. Parmi les facteurs génétiques, il existe une susceptibilité accrue à certaines MAI des individus présentant des allèles particuliers du CMH humain, le HLA (*Human Leukocyte Antigen* en anglais). Par exemple, la polyarthrite rhumatoïde est associée aux allèles DR4 et DR1 du HLA de classe II [19]. Toutefois, le ou les mécanismes par lesquels certains allèles HLA contribuent au développement de MAI ne sont pas encore bien caractérisés. Une hypothèse suggère que certaines molécules de HLA vont présenter des peptides du soi dans des complexes de faible affinité conduisant à la survie du lymphocyte auto-réactif lors de la sélection négative [20]. Des facteurs environnementaux peuvent également contribuer au développement des MAI tels que les infections virales ou l'exposition à des toxines ou médicaments [17,18].



**Figure 6 : Les maladies auto-immunes organe-spécifiques.** Liste non exhaustive des MAI organe-spécifiques.

Il existe deux grandes catégories de MAI : les MAI organe-spécifiques et les MAI systémiques. Les MAI organe-spécifiques atteignent un seul organe, comme le cerveau dans le cas de la sclérose en plaques ou encore le pancréas dans le cas du diabète de type 1 (Figure 6). En revanche, les MAI systémiques touchent plusieurs organes, c'est le cas de l'APECED ou encore du syndrome de Sjögren [17]. Non traitées, ces pathologies peuvent conduire à une défaillance d'organe voire une défaillance multiviscérale.

En conclusion, le système immunitaire adaptatif est le garant du maintien de notre homéostasie. Ses acteurs, les LT et les LB, sont des cellules spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes et leur élimination. Grâce à leurs différentes sous-populations, ils contrôlent et endiguent les infections virales, bactériennes ou parasitaires et empêchent le développement de pathologies. Toutefois, il convient de contrôler cette réponse immunitaire adaptative d'une part lors de sa mise en place, évitant ainsi le développement de MAI, et d'autre part lors de son activation afin d'éviter un emballement de cette réponse.

L'ensemble des tissus et organes de notre organisme sont le théâtre de réponses immunitaires effectrices efficaces. Toutefois, un organe fait office d'exception. Du fait de ses fonctions et de sa situation anatomique particulière, le foie présente la capacité exceptionnelle de réguler fortement les réponses immunitaires.

## PARTIE 2

### La réponse immunitaire tolérogène dans le foie

Le foie est le plus gros organe du corps humain. Il est impliqué dans plus de 300 fonctions de notre organisme dont l'une des principales est la filtration du sang. Environ 30% de notre volume sanguin total passe à travers le foie chaque minute. Il est également le siège de nombreuses fonctions telles que le métabolisme des nutriments, le stockage de protéines, la synthèse de protéines plasmatiques, la production de la bile ou encore l'élimination de toxines.

Le foie reçoit le sang venant directement du système mésentérique par la veine porte hépatique, l'exposant ainsi continuellement aux antigènes dérivés de l'alimentation et notamment aux antigènes microbiens présents dans le sang. Par conséquent, le foie peut être considéré comme une sentinelle primordiale pour notre réponse immunitaire.

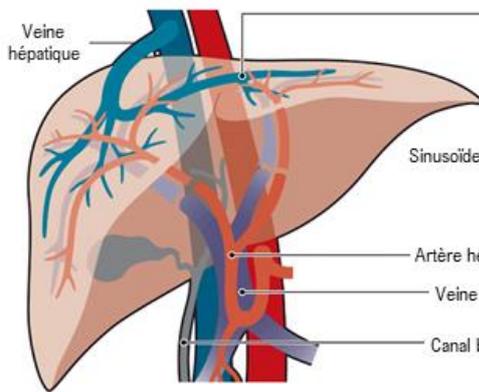
Toutefois, ce rôle immunitaire privilégié doit être temporisé afin d'éviter un état inflammatoire hépatique perpétuel ou une suractivation de notre système immunitaire, pouvant conduire à une destruction du parenchyme hépatique et donc à une importante altération des fonctions hépatiques vitales. C'est pourquoi, en homéostasie, le foie présente différents mécanismes de tolérance. Cette tolérance hépatique ne passe pas par une absence de réponse immune vis-à-vis de l'antigène cible mais par des mécanismes immuns actifs conduisant à une forte régulation de la réponse immune, notamment adaptative.

#### 1. L'architecture particulière du foie

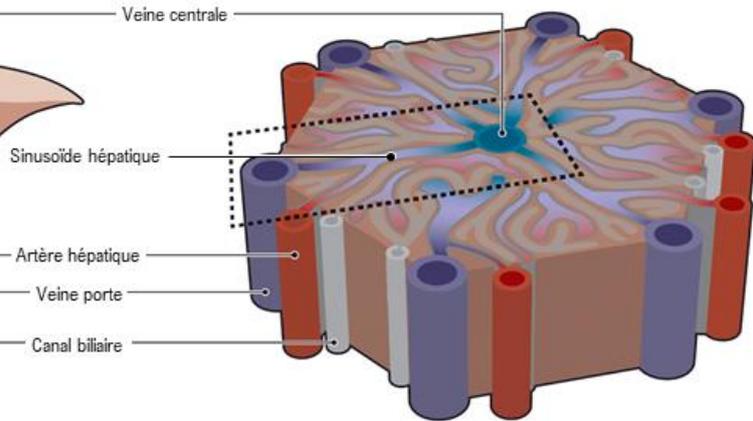
##### 1.1. L'anatomie hépatique

Le foie est situé dans la cavité abdominale, juste sous le diaphragme. Il est composé de 4 lobes chez l'Homme et de 5 lobes chez la souris. Grâce à son anatomie particulière, le foie reçoit d'une part le sang veineux via la veine porte hépatique et d'autre part le sang artériel par l'artère hépatique (Figure 7A). L'artère hépatique est directement reliée à l'aorte, elle transporte un sang artériel riche en oxygène. La veine porte et l'artère hépatique se ramifient ensuite à l'intérieur du foie afin de constituer un réseau de capillaires, les sinusoides hépatiques, permettant les échanges entre les éléments présents dans le sang et les hépatocytes.

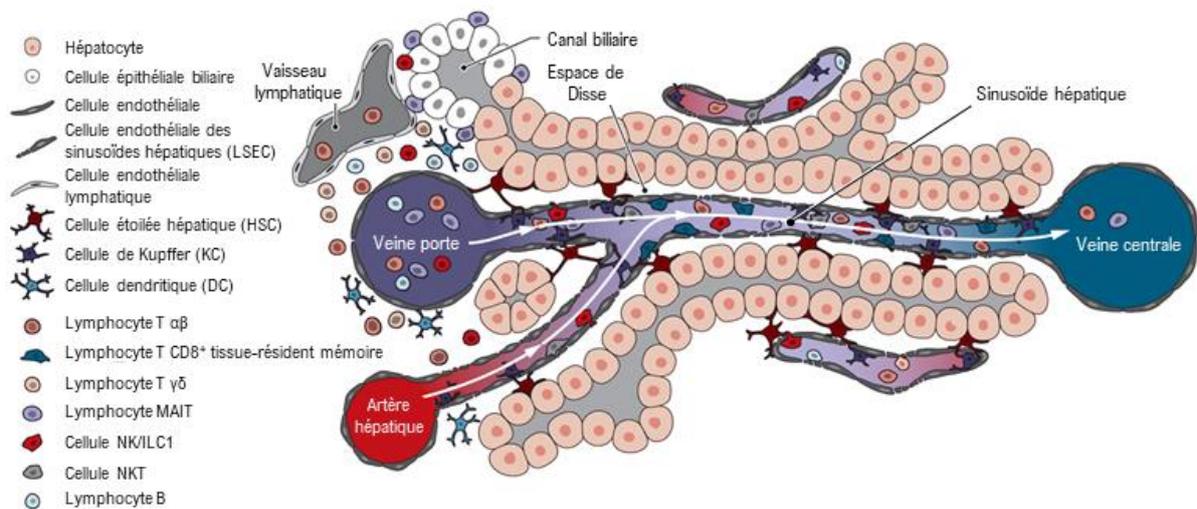
### A Anatomie du foie



### B Lobule hépatique



### C Histologie du parenchyme hépatique



**Figure 7 : L'anatomie hépatique.** Le foie reçoit le sang veineux via la veine porte hépatique et le sang artériel via l'artère hépatique. Chez l'Homme, le foie est composé de 4 lobes eux-mêmes divisés en lobules. Les lobules hépatiques sont constitués d'une veine centrale, ou centro-lobulaire, entouré par 6 unités constituées d'un rameau de veine porte, d'un rameau d'artère hépatique et d'un rameau de canal biliaire. Le sang provenant de l'artère hépatique et de la veine porte se réunit au sein du lobule dans les sinusoides hépatiques convergeant vers la veine centrale. Le parenchyme hépatique est constitué d'une variété de cellules regroupées en cellules parenchymateuses, les hépatocytes, et cellules non-parenchymateuses. Adapté de *Ficht and Iannacone, Sci. Immunol., 2020*.

Chaque lobe hépatique est constitué de plusieurs unités fonctionnelles appelées lobules. Ces lobules ont une forme caractéristique présentant en leur centre une veine centrale ou centro-lobulaire entourée de 6 unités constituées d'un rameau de veine porte, d'un rameau d'artère hépatique et d'un rameau de canal biliaire (Figure 7B). Le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique converge dans des sinusoides hépatiques, puis l'ensemble de ces sinusoides rejoint la veine centro-lobulaire. Les veines centro-lobulaires de chaque lobule

hépatique se réunissent pour former les veines sus-hépatiques par lesquelles le sang filtré quitte le foie vers la veine cave inférieure (Figure 7B).

Le foie est composé principalement d'hépatocytes, ce sont les cellules du parenchyme hépatique. Ces dernières représentent 80% des cellules hépatiques totales. Les hépatocytes sont séparés des sinusoides hépatiques par un espace appelé espace de Disse (Figure 7C). Cet espace est bordé d'une part par les hépatocytes, et d'autre part par les cellules endothéliales des sinusoides hépatiques (*liver sinusoidal endothelial cells* en anglais, LSEC) (Figure 7C). Ces LSEC constituent une barrière entre le sinusoides hépatique et l'espace de Disse. Une particularité de cette barrière endothéliale est qu'elle est fenestrée. Ces fenestrations permettent un passage bidirectionnel de molécules (médicaments, toxines, protéines, lipoprotéines, etc.) entre les sinusoides hépatiques et le parenchyme hépatique, permettant d'assurer les nombreuses fonctions du foie dont notamment le rôle de détoxification et de synthèse protéique [21]. De plus, les fenestrations vont également permettre des interactions entre les cellules présentes dans la circulation sanguine des sinusoides hépatiques et les hépatocytes ou les cellules présentes au sein de l'espace de Disse.

Grâce à une circulation sanguine ralentie dans les sinusoides hépatiques [22], la détection et la capture des pathogènes par les CPA est facilitée. En outre, les cellules non-parenchymateuses hépatiques (*non-parenchymal cells* en anglais, NPC) sont nombreuses et peuvent fonctionner comme CPA dites non-professionnelles : les LSEC, les cellules de Kupffer (*Kupffer cells* en anglais, KC), les cellules dendritiques hépatiques (*hepatic dendritic cells* en anglais, hDC), les cellules étoilées hépatiques (*hepatic stellate cells* en anglais, HSC) et les lymphocytes intra-hépatiques (Figure 7C).

## 1.2. Les cellules hépatiques présentatrices d'antigènes

L'organisation anatomique particulière du foie en fait un acteur clé de notre système immunitaire. Toutefois, en homéostasie, les réponses immunitaires hépatiques sont biaisées vers la tolérance. Cette corruption de la réponse immunitaire est grandement liée aux différentes cellules qui constituent le foie, tant les cellules parenchymateuses (les hépatocytes) que les NPC (LSEC, KC, hDC, HSC), aux capacités de CPA.

Les hépatocytes, les LSEC et les KC sont les CPA dont l'implication dans la réponse immunitaire hépatique a été la plus étudiée tant chez l'Homme que dans des modèles murins. Chez l'Homme, les LSEC et les KC constituent respectivement 50% et 35% des NPC. Les KC sont des macrophages résidents du foie, ils représentent jusqu'à 90% de tous les macrophages résidents des tissus de notre organisme [23,24].

Ces trois types cellulaires sont capables de capturer des antigènes et de les présenter directement aux LT. Pour cela, ils expriment constitutivement à leur surface des molécules du CMH-I et peuvent induire dans des conditions particulières, comme l'inflammation, des molécules du CMH-II [23]. Associées au CMH, elles expriment également des molécules de co-stimulation telles que CD80, CD86 ou encore CD40 [23]. Les LSEC et les KC expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptor* en anglais, PRR) comme les TLR (*toll-like receptors* en anglais) leur permettant de reconnaître les motifs moléculaires associés au danger (*danger-associated molecular pattern* en anglais, DAMP) [22]. Enfin, les LSEC expriment des molécules d'adhésion telles que ICAM et les KC peuvent exprimer des récepteurs du complément ainsi que des molécules inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ ). Dans certaines conditions, elles peuvent induire l'expression de molécules inhibitrices telles que PD-L1 (*programmed death-ligand 1* en anglais), le ligand de la molécule inhibitrice PD-1 (*programmed cell death 1* en anglais) [23].

Les hépatocytes, les LSEC et les KC ne sont pas les seules cellules hépatiques capables d'agir en tant que CPA, les hDC (cellules dendritiques hépatiques) peuvent également remplir ce rôle. Les hDC sont localisées autour des vaisseaux portaux et des veines hépatiques. Ces cellules sont capables de passer à travers l'endothélium fenestré pour atteindre l'espace de Disse (Figure 7C). Chez l'Homme, il existe deux types de hDC : les DC myéloïdes (CD11c<sup>high</sup>) et les DC plasmacytoïdes (CD123<sup>+</sup>). Chez la souris, deux autres types de hDC ont été identifiées : les DC CD11c<sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> et les DC CD11c<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>, ces dernières présentant les caractéristiques non seulement de DC mais également de cellules NK [25,26]. En condition d'homéostasie, les hDC sont pro-tolérologènes. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce biais de tolérance serait leur phénotype immature [25]. Les hDC expriment notamment de faibles niveaux de molécules de CMH et de molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) [27].

Le compartiment non-parenchymateux hépatique est également constitué de HSC (cellules étoilées hépatiques). Ces cellules, aussi appelées cellules Ito, sont localisées dans l'espace de Disse et représentent 5 à 8% des cellules hépatiques (Figure 7C). Elles stockent jusqu'à 80% de la vitamine A de notre organisme et grâce à leur capacité de conversion en myofibroblastes producteurs de matrice extracellulaire telle que le collagène, elles régulent le flux de la circulation sanguine dans les sinusoides hépatiques mais sont également impliquées dans le développement de la fibrose hépatique [28]. Le fait que les HSC soient capables de fonctionner comme CPA est toujours en débat.

Grâce à l'architecture particulière du foie, les diverses cellules hépatiques peuvent être en contact direct avec les antigènes présents dans le sang des sinusoides hépatiques. L'endothélium fenestré formé par les LSEC rend possible les interactions entre les lymphocytes présents dans le sinusoides hépatique et les cellules présentes dans l'espace de Disse ou les hépatocytes (Figure 7C). De plus, dans des expériences de transmigration *in vitro*, il a été montré que les LSEC sont capables de transcytose, c'est-à-dire qu'elles peuvent internaliser des molécules présentes dans le sinusoides et les relarguer dans l'espace de Disse et inversement [29,30] ; ces molécules pourront alors être internalisées par les cellules présentes dans le compartiment opposé à la barrière de LSEC (Figure 8).

## 2. La réponse immunitaire hépatique pro-toléro-gène

Les propriétés toléro-gènes particulières du foie sont étudiées depuis des décennies. Les premières constatations de ce phénomène dans un contexte allogénique remontent à 1969. Dans un modèle de transplantation hépatique orthotopique chez le porc, Calne *et al.* ont montré une survie prolongée du greffon, même en absence d'immunosuppression [31]. De plus, non seulement cette tolérance hépatique était effective localement mais elle l'était aussi de manière systémique.

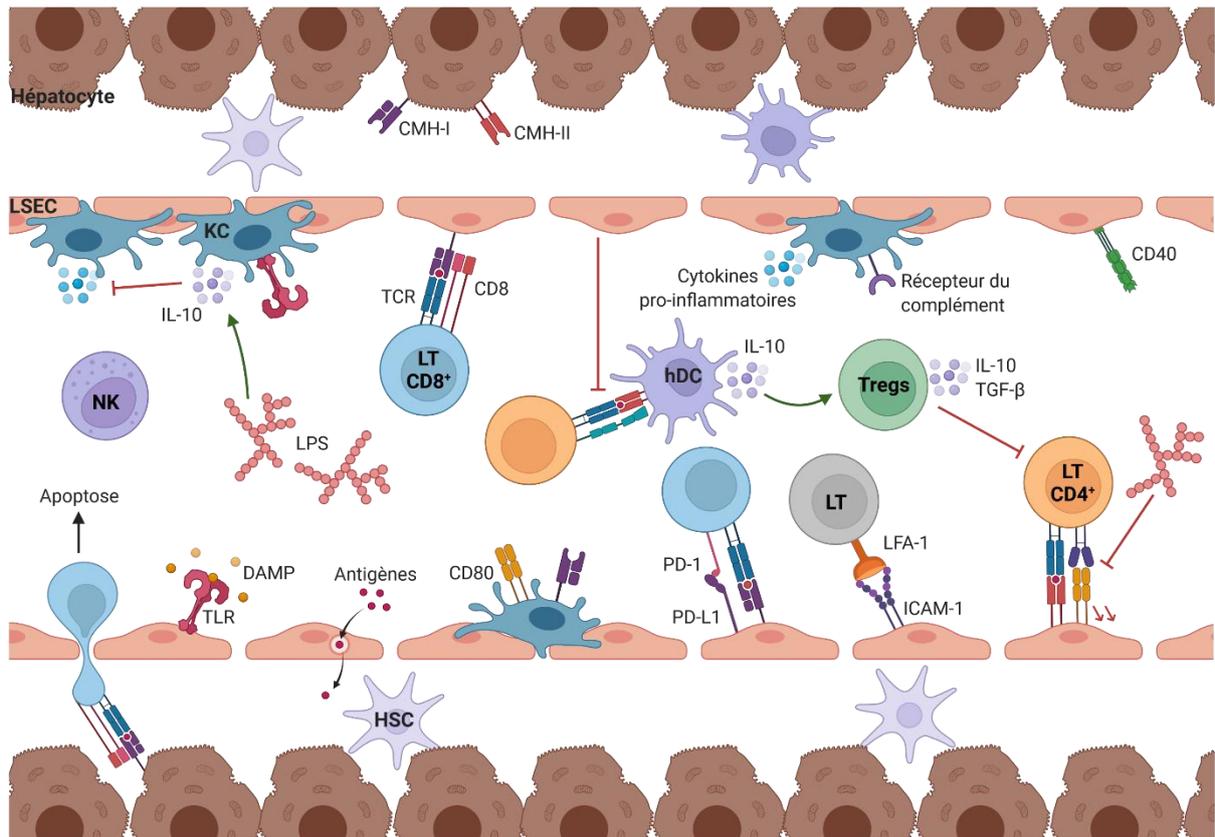
### 2.1. Les cellules hépatiques pro-toléro-gènes

En homéostasie, les cellules hépatiques favorisent une importante tolérance immune. De plus, du fait du lien vasculaire direct entre foie et intestin, les sinusoides hépatiques

transportent continuellement des lipopolysaccharides (LPS) provenant de l'alimentation. Grâce à l'utilisation de la microscopie intravitale chez le rat, il a été montré que la surexposition aux LPS induit un environnement tolérogène inhibant les interactions LSEC-leucocytes [32] et altère *in vitro* le traitement des antigènes par les LSEC via la diminution d'expression à leur surface de CD80, CD86 et des molécules de CMH-II [33]. Ceci conduit à une diminution de la capacité des LSEC à activer les LT CD4<sup>+</sup>. Par ailleurs, Knolle *et al.* ont montré *in vitro* que la constante exposition aux LPS induit la production de cytokines régulatrices IL-10 par les KC. Or, l'exposition *in vitro* des KC à l'IL-10 induit une inhibition de leur sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  [34]. Ainsi, en produisant de l'IL-10, les KC contribueraient à inhiber leur propre réactivité immune. Enfin, l'IL-10 inhibe *in vitro* la capacité des LSEC à activer les LT CD4<sup>+</sup> via la diminution de l'expression de CD80, CD86 et des molécules de CMH-II à la surface des LSEC [35]. Ainsi, la surexposition aux LPS, contribuant à la production d'IL-10, biaise la réponse immunitaire hépatique vers un état de tolérance.

En condition d'homéostasie, les LSEC et les KC sont essentielles à l'immuno-surveillance. Ces deux types cellulaires sont capables d'inhiber *in vitro* la capacité des DC à activer les LT [36,37]. De plus, les LSEC peuvent inhiber *in vitro* et *in vivo* la cytotoxicité des LT CD8<sup>+</sup> [38,39]. Les KC, en association avec les Tregs, induisent un environnement tolérogène et leur déplétion chez la souris conduit à l'abrogation de la tolérance hépatique [40,41].

Grâce à l'endothélium fenestré, les hépatocytes peuvent interagir directement avec les LT CD8<sup>+</sup> circulants et résidents du foie [42]. Toutefois, il a été montré que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> par les hépatocytes pouvait conduire à l'apoptose Bim-dépendante de ces cellules [43] favorisant la tolérance (voir partie « 2.2.1. La tolérisation des LT CD8<sup>+</sup> dans le foie »). En outre, l'expression de molécules de CMH-II à la surface des hépatocytes peut être induite en condition inflammatoire, permettant l'activation de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques par les hépatocytes [44]. Néanmoins, cela favorise la différenciation en lymphocyte de type Th2 et inhibe la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes de type Th1 [45] (voir partie « 2.2.2. La tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie »).



**Figure 8 : Le rôle des cellules hépatiques dans la tolérance.** Les cellules parenchymateuses (hépatocytes) et non-parenchymateuses (LSEC, KC, hDC, HSC) participent à la tolérance hépatique. Elles expriment des molécules de co-stimulation capables d'activer les LT. Toutefois, leur capacité à activer les réponses T est inhibée par l'environnement hépatique suppresser chargé en IL-10 et en LPS et par les fonctions inhibitrices des Tregs.

Bamboot *et al.* ont montré *in vitro* que les hDC humaines produisent de l'IL-10, promeuvent la génération de Tregs et de lymphocytes Th2 et ont une capacité réduite à stimuler la prolifération des LT par rapport aux autres DC [46]. Tokita *et al.* ont montré que les hDC plasmacytoïdes sont capables d'induire l'apoptose des LT CD4<sup>+</sup> *in vitro* [47]. Ainsi, ces données supportent l'idée que les hDC participent également à maintenir un environnement hépatique pro-tolérologène.

Winau *et al.* ont montré que les HSC expriment des molécules de CMH et de co-stimulation chez l'Homme et la souris et grâce à un modèle murin ovalbumine (OVA)-spécifique, ils ont montré que les HSC sont capables *in vitro* de présenter des antigènes aux LT [48]. À l'inverse, Ichikawa *et al.* ont observé que les HSC murines n'expriment pas constitutivement des molécules de co-stimulation et n'induisent l'expression de molécules de CMH-II seulement après stimulation *in vitro* [49]. De plus, les HSC auraient seulement un effet indirect *in vitro* sur la génération de Tregs et sur l'inhibition de la génération de lymphocytes Th17 en produisant

de l'acide rétinoïque [49,50]. Enfin, les HSC humaines et murines sont capables d'inhiber *in vitro* l'activation de LT CD8<sup>+</sup> naïfs par les DC [51]. Par ailleurs, selon Yu *et al.*, il existe une différence entre HSC quiescentes et HSC activées. Les HSC quiescentes expriment de faibles niveaux de molécules de CMH et de molécules de co-stimulation. Leur activation induirait l'augmentation de l'expression de ces molécules à leur surface et conduirait à l'induction de l'apoptose des LT via la voie PD-1/PD-L1 [52].

En conclusion, la surexposition aux LPS, le micro-environnement hépatique suppresseur (IL-10) et la capacité des différentes cellules hépatiques à réguler la réponse immune biaisent les réponses immunitaires hépatiques vers un état pro-tolérologène (Figure 8).

## 2.2. Le foie en homéostasie

En condition d'homéostasie, l'environnement hépatique est capable d'inhiber les réponses T, nous parlerons alors de tolérisation des réponses T.

### 2.2.1. La tolérisation des LT CD8<sup>+</sup> dans le foie

Grâce à l'utilisation de la microscopie intravitale, Iannacone et son équipe [53] ont montré que les LT CD8<sup>+</sup> circulants naïfs étaient capables de s'arrêter dans le sinusoiide hépatique et ce même en absence de reconnaissance antigénique. Les LT CD8<sup>+</sup> se fixent aux agrégats de plaquettes ayant adhérees à l'acide hyaluronique sinusoidal. Puis, les LT rampent le long du sinusoiide tout en élançant des extensions membranaires à travers les fenêtres de la barrière endothéliale hépatique afin de former des synapses immunologiques avec les hépatocytes. En absence de reconnaissance antigénique, la majorité des LT CD8<sup>+</sup> entrent en apoptose mais jusqu'à 5% de ces cellules peuvent s'implanter dans le foie et devenir des LT résidents des tissus (*tissue-resident memory T cells* en anglais ou T<sub>RM</sub>), participant à la surveillance immunologique hépatique [54].

De manière unique par rapport aux autres organes alors que le foie n'est pas un organe lymphoïde secondaire, haut-lieu traditionnel de l'activation des LT, ces derniers vont pouvoir être activés localement dans le foie [55,56]. De ce fait, lorsque les LT CD8<sup>+</sup> reconnaissent un antigène à la surface des hépatocytes, ils vont s'activer et proliférer localement. Cependant, des expériences de transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> naïfs antigène-spécifiques chez des souris

exprimant l'antigène à la surface des hépatocytes ont montré que cette activation ne conduit pas à leur différenciation en cellules effectrices mais entraîne leur dégradation ou encore la prolifération de LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels [55]. Ces cellules dysfonctionnelles forment des agrégats au niveau des vaisseaux portaux, produisent peu ou pas d'IFN- $\gamma$  après re-stimulation *in vitro*, ne sont pas capables d'activité cytotoxique et augmentent l'expression de la molécule inhibitrice PD-1 les rendant susceptibles à la tolérisation [55]. De plus, ces LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels sont réfractaires au stimuli permettant la différenciation en cellules effectrices mais présentent des caractéristiques distinctes de celles de LT épuisés ou tolérogènes [55]. La persistance de l'antigène dans le foie conduit à l'apparition progressive d'un phénotype d'épuisement chez ces LT CD8<sup>+</sup> dysfonctionnels activés dans le foie [55,57].

La dégradation des LT CD8<sup>+</sup> activés par les hépatocytes passe soit par un mécanisme d'apoptose Bim-dépendant [43], soit par un mécanisme de « suicide par empéripolèse » [58]. Ce dernier est décrit par Bertolino et son équipe dans un modèle de transfert adoptif chez des souris C57BL/6 (H-2K<sup>b</sup>) de LT CD8<sup>+</sup> présentant un TCR transgénique spécialisé dans la reconnaissance antigénique dans un contexte H-2K<sup>b</sup>. Grâce à l'utilisation de la microscopie électronique et confocale, ils montrent que les LT CD8<sup>+</sup> activés localement dans le foie vont activement envahir les hépatocytes, entrer dans les compartiments endosomaux/lysosomaux et être dégradés. L'équipe suppose alors que ce mécanisme unique permet le maintien de la tolérance en permettant l'élimination des LT auto-réactifs. De plus, les hépatocytes, via l'expression de la molécules PD-L1, sont capables d'induire *in vitro* l'apoptose des LT [59]. Cependant, dans un modèle murin d'induction de l'expression hépatique d'un antigène, le transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques associé à l'utilisation d'anticorps bloquant PD-L1 *in vivo* ne permet pas de restaurer une réponse T CD8<sup>+</sup> effectrices fonctionnelle [55].

Tout comme les hépatocytes, les LSEC sont capables d'activer les LT CD8<sup>+</sup> dans le foie et d'induire leur tolérisation [39,60]. Ce mécanisme passe par la voie PD-1/PD-L1 via l'augmentation de l'expression de PD-L1 à la surface des LSEC [38]. Après une phase initiale d'expansion, ces LT CD8<sup>+</sup> activés par les LSEC deviennent réfractaires à l'activation. Ces LT CD8<sup>+</sup> réfractaires diminuent leur production d'IL-2 ainsi que d'IFN- $\gamma$  [61]. De plus, les LSEC sont capables d'inhiber *in vitro* l'activation des LT par les autres CPA environnantes, notamment les hDC, en diminuant l'expression de molécules de co-stimulation à leur surface, on parle alors de « véto d'activation » [36]. Ce mécanisme ne passe pas par un médiateur

soluble mais est dépendant du contact cellulaire avec les LSEC [36]. De même, les HSC sont capables *in vitro* de veto d'activation de manière ICAM-1-dépendante et en inhibant la production d'IL-2 par les LT CD8<sup>+</sup> et réprimant l'expression du récepteur à l'IL-2 à leur surface [51]. De plus, les HSC sont capables *in vitro* d'induire l'hyporéactivité ainsi que l'apoptose des LT via la voie PD-1/PD-L1 [52].

En conclusion, bien que l'activation des LT CD8<sup>+</sup> soit possible dans le foie, et ce de manière unique par rapport aux autres organes non-lymphoïdes de notre organisme, leur activation intra-hépatique conduit soit à leur tolérisation, soit à leur dégradation. La voie PD-1/PD-L1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de leur réactivité. De plus, des mécanismes originaux de suicide par empéripolèse et de veto d'activation ont été découverts et participent à la tolérisation des LT CD8<sup>+</sup> dans le foie.

#### 2.2.2. La tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie

Tout comme pour les LT CD8<sup>+</sup>, le micro-environnement hépatique suppresseur induit une tolérisation des LT CD4<sup>+</sup>. Ce phénomène passe par différents mécanismes comme l'hyporéactivité, la déviation immune, la suppression des LT CD4<sup>+</sup> de type Th1 ou encore l'implication des Tregs (Tableau 1).

Dans le foie, nous pouvons observer une hyporéactivité globale des LT CD4<sup>+</sup> [62]. Comme énoncé précédemment, ceci est en partie dû à la constante exposition aux LPS [32–34] et à l'environnement hépatique suppresseur chargé en IL-10 et en TGF- $\beta$  [63]. Cet environnement induit alors une diminution de l'expression des molécules de CMH-II et des molécules de co-stimulation à la surface des cellules hépatiques. De plus, ces cellules participent activement à l'inhibition de la réactivité des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie. Par exemple, les hDC sont capables d'induire *in vitro* l'hyporéactivité des LT via la sécrétion de la cytokine immunosuppressive IL-10 et d'IL-27 [46,64]. De plus, l'IL-10 peut induire une inhibition de la capture des antigènes via le récepteur au mannose à la surface des LSEC et une diminution de l'expression des molécules de CMH-II et des molécules de co-stimulation (CD80, CD86, CD40) à leur surface pouvant alors conduire à l'inhibition de l'activation des LT [35,65].

**Tableau 1 : Les mécanismes de tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie.**

Mécanisme	Espèce	Modèle	Stimulation	Induit par	Détail	Références
<b>Hyporéactivité des LT CD4<sup>+</sup></b>						
	Souris	<i>In vivo</i>	LPS	LSEC	Inhibition des interactions LSEC-leucocytes	[32]
<b>Exposition aux LPS</b>	Souris	<i>In vitro</i>	LPS	LSEC	Présentation antigénique par les LSEC altérée	[33]
	Homme	<i>In vitro</i>	LPS	KC	Sécrétion d'IL-10 par les KC	[34]
	Souris	<i>In vitro</i>	LPS	hDC	Sécrétion d'IL-27	[64]
<b>Micro-environnement suppressif (IL-10, TGF-β)</b>						
	Homme	<i>In vitro</i>	LPS	hDC	Sécrétion d'IL-10	[46]
	Souris	<i>In vitro</i>	PPD, anti-CD3/CD28	LSEC	Inhibition de la capture d'antigène, diminution de l'expression de molécules de CMH-II et de co-stimulation	[35,65]
<b>Activation intra-hépatique</b>						
	Souris	<i>In vivo</i>	OVA, Ag85b	/	Activation intra-hépatique des LT CD4 <sup>+</sup> controversée	[66-68]
<b>Déviations immunes</b>						
<b>Différenciation en lymphocytes Th2</b>	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA, LCMV	Hépatocytes exprimant du CMH-II	Expression altérée de ligands Notch	[45]
	Homme, souris	<i>In vitro</i>	Polyclonal, anti-CD3/CD28	hDC	Mécanisme dépendant de l'IL-10	[46,69]
<b>Expansion favorisée des lymphocytes Th2</b>						
	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA	LSEC	Coculture de LSEC et de lymphocytes Th1 et Th2 OVA-spécifiques	[70]
<b>Génération de lymphocytes Th1 suppresseurs</b>						
	Souris	<i>In vitro</i>	OVA	LSEC	Génération de lymphocytes Th1 suppresseurs producteurs d'IL-10 via un mécanisme dépendant de la voie Notch	[71]

**Tableau 1 (suite) : Les mécanismes de tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie.**

Mécanisme	Espèce	Modèle	Stimulation	Induit par	Détail	Références
<b>Inhibition des lymphocytes Th1</b>						
<b>Différenciation Th1 altérée</b>	Souris	<i>In vitro</i>	Anti-CD3/CD28	hDC	Co-culture de hDC et de LT CD4 <sup>+</sup> naïfs	[69]
	Souris	<i>In vitro</i>	HA	LSEC	Coculture de LSEC et de LT CD4 <sup>+</sup> naïfs	[72]
<b>Déletion de lymphocytes Th1 antigène-spécifiques</b>	Souris	<i>In vivo</i>	OVA	LSEC	Transfert adoptif de lymphocytes Th1 OVA-spécifiques	[70]
	Souris	<i>In vivo</i>	OVA	/	Transfert adoptif de lymphocytes Th1 OVA-spécifiques	[66]
<b>Fonction Th1 altérée</b>	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA, LCMV	Hépatocytes CMH-II	Expression altérée de ligands Notch	[45]
	Souris	<i>In vivo</i>	OVA	LSEC	Transfert adoptif de lymphocytes Th1 OVA-spécifiques	[70]
<b>Inhibition de la sécrétion de cytokines Th1</b>						
<b>Inhibition de la sécrétion de cytokines Th1</b>	Souris	<i>In vitro</i>	Anti-CD3/CD28	LSEC	Mécanisme dépendant des voies de signalisation de l'IL-10 et PD-1/PD-L1	[65]
	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA, LCMV	Hépatocytes CMH-II	Expression altérée de ligands Notch	[45]
	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA, LCMV	/	Production d'IFN- $\gamma$ par les LT CD4 <sup>+</sup> LCMV-spécifiques altérée	[45]
<b>Implication de cellules régulatrices</b>						
<b>Induction de Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup></b>	Souris	<i>In vitro</i>	MBP	LSEC, hDC, KC, HSC	Mécanisme dépendant du TGF- $\beta$	[73]
	Souris	<i>In vitro</i>	OVA	HSC	Mécanisme dépendant de l'acide rétinoïque	[50]
	Souris	<i>In vivo</i>	OVA	KC	Différenciation en Tregs de LT CD4 <sup>+</sup> OVA-spécifiques transférés, expansion de Tregs naturels	[74]
<b>Induction de Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> FoxP3<sup>+</sup></b>	Homme, souris	<i>In vitro</i>	Polyclonal, LPS	hDC	Mécanisme dépendant de l'IL-10	[46,64]
	Souris	<i>In vitro, in vivo</i>	OVA	LSEC	Inhibition de la prolifération de LT CD4 <sup>+</sup> naïfs Inhibition de l'inflammation hépatique	[75]
<b>RTE CD4<sup>+</sup> hépatiques</b>	Souris	<i>In vitro</i>	Anti-CD3/CD28	LSEC	Sécrétion d'IL-10 Inhibition de la prolifération des LT	[76,77]

Des expériences de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques (TCR-transgéniques) naïfs dans des modèles d'induction d'expression hépatique d'un antigène ont montré que les hépatocytes n'étaient pas capable d'induire l'activation de ces cellules [66,68], contrairement aux LT CD8<sup>+</sup> [55]. Alors que la plupart de ces expériences ont été conduites dans les modèles d'induction de l'expression d'OVA dans les hépatocytes avant transfert adoptif, Tay *et al.* ont comparé l'activation intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans un modèle OVA à un modèle d'induction d'une protéine mycobactérienne (Ag85b) dans les hépatocytes [67]. Ils ont montré que l'activation intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> Ag85b-spécifiques était possible et, grâce à des expériences de déplétion *in vivo* et d'activation *in vitro*, que cette activation était provoquée par les KC. Ces travaux marquent la première démonstration dans un modèle de spécificité antigénique de la capacité du foie, et plus précisément des hépatocytes, à induire l'activation des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques. La principale hypothèse concernant la différence d'activation des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans les deux modèles porte sur une éventuelle différence d'affinité entre les TCR spécifiques d'OVA et les TCR spécifiques d'Ag85b. Bien que l'affinité entre ces TCR et leur ligand respectif n'ait pas été directement testée, le TCR présent à la surface des LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques serait un TCR de faible affinité [67]. Ainsi, l'analyse de l'affinité du TCR spécifiques d'Ag85b permettrait de statuer sur cette hypothèse et de démontrer l'importance de l'affinité du TCR pour son ligand dans l'activation intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifique. Enfin, dans le modèle Ag85b, bien que l'activation des LT CD4<sup>+</sup> Ag85b-spécifiques ait été observée, le rôle, la fonction et le devenir de ces cellules n'ont pas été étudiés. Ainsi, la question demeure concernant leur rôle dans la réponse immune dirigée contre Ag85b, qu'elle soit effectrice ou tolérogène.

Dans le foie, l'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs est biaisée vers une différenciation en LT CD4<sup>+</sup> de type Th2. Les LT CD4<sup>+</sup> hépatiques produisent plus de cytokines de type Th2 et de cytokines régulatrices (IL-4, IL-5, IL-10) que leur équivalent splénique [62,70]. Cette différenciation biaisée est provoquée par différentes cellules hépatiques. Wiegard *et al.* ont observé que les hépatocytes exprimant des molécules de CMH-II à leur surface induisaient *in vitro* la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes de type Th2, et ce phénomène était associé avec une diminution de l'expression de l'ARN messenger Delta-like 4, promouvant normalement

la différenciation en lymphocyte Th1 [45]. Dans les modèles OVA, dans des expériences de co-culture *in vitro* de lymphocytes Th1 et Th2 OVA-spécifiques, il a été montré que les LSEC induisaient l'expansion des lymphocytes Th2 [70]. Enfin, les hDC [46,69], via des mécanismes IL-10-dépendants, ainsi que les cellules NKT (*natural killer T* en anglais) et les lymphocytes  $\gamma\delta$  [62] sont capables d'orienter une différenciation Th2.

De façon intéressante, Neumann *et al.* ont induit *in vitro* la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes Th1 producteurs d'IL-10, en présence de LSEC et d'IL-12 (cytokine de différenciation clé pour les lymphocytes Th1) [71]. Ces cellules ne présentaient aucune propriété pro-inflammatoire (caractéristique des lymphocytes Th1 classiques) mais plutôt des fonctions immunosuppressives.

Les cellules hépatiques ne sont pas capables d'induire la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en lymphocytes de type Th1 et suppriment même l'expansion de ces cellules *in vitro* [69,72].

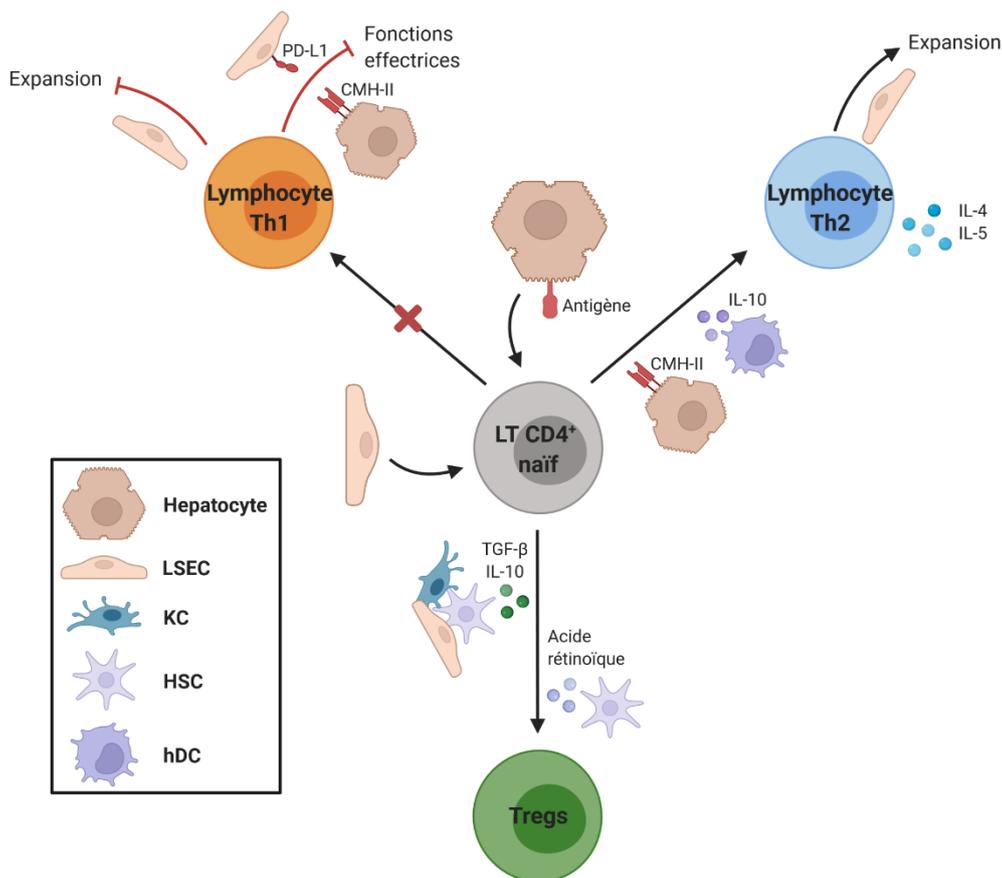
Dans des expériences de transfert adoptif de lymphocytes Th1 ou Th2 OVA-spécifiques, Klugewitz *et al.* ont démontré la délétion *in vivo* des lymphocytes Th1 OVA-spécifiques dans le foie après injection intraveineuse (i.v.) d'OVA et ont montré *in vitro* que l'inhibition de leur expansion pouvait être causée par les LSEC [70]. Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de culture de lymphocytes Th1 OVA-spécifiques et d'hépatocytes en présence d'OVA et de transfert adoptif de lymphocytes Th1 OVA-spécifiques dans des souris exprimant OVA à la surface de leurs hépatocytes, il a été montré le dysfonctionnement des fonctions effectrices des lymphocytes Th1 OVA-spécifiques [45,66]. Wiegard *et al.* ont par ailleurs montré *in vitro* que cette défaillance était induite par des hépatocytes exprimant à leur surface des molécules de CMH-II et un faible niveau de ligand Notch Delta-like, impliqué dans la différenciation Th1 [45].

Enfin, les LSEC sont capables *in vitro* d'altérer voire de supprimer la sécrétion de cytokines par les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th17 [65,70]. Carambia *et al.* ont montré que cette suppression passait par les voies de signalisation liée à l'IL-10 et également par les contacts cellule-cellule via la voie PD-1/PD-L1 [65]. Les hépatocytes exprimant des molécules de CMH-II sont également capables d'inhiber la production de cytokines par les lymphocytes Th1, ce qui a été montré *in vitro* mais également *in vivo* via la diminution de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> LCMV-spécifiques [45].

Pour finir, le foie est un haut lieu d'induction de Tregs. Grâce à l'utilisation de modèles de spécificité antigénique (notamment OVA), il a été montré que la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs en Tregs pouvait être induite en présence de TGF-β sécrété par les LSEC, les KC et les HSC. Elle peut également être induite en présence d'acide rétinoïque produit par les HSC. Toutefois, parmi ces cellules hépatiques, les LSEC sont les cellules les plus efficaces pour la différenciation *in vitro* de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques naïfs en Tregs via la production de TGF-β [73]. Les HSC, quant à elles, promeuvent *in vitro* la différenciation des Tregs via la production d'acide rétinoïque et de TGF-β en association avec les DC [50]. Enfin, Heymann *et al.* ont montré *in vivo* dans un modèle de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques dans des souris injectées avec OVA que les KC induisent la génération et l'activation des Tregs permettant la suppression de l'activité cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques, protégeant ainsi contre les dommages hépatiques [74].

L'IL-10 intervient également dans le processus de différenciation des Tregs. Cette cytokine peut être sécrétée par les LSEC, les KC et les HSC. De même, les hDC peuvent induire la différenciation *in vitro* de LT CD4<sup>+</sup> en Tregs via la production d'IL-10 [46,64]. De plus, l'IL-10 est une cytokine clé pour le maintien de l'expression de FoxP3 dans les Tregs [78].

Toutefois, d'autres cellules régulatrices sont capables d'induire une tolérance hépatique. Dans un modèle murin dans lequel la présentation antigénique par les molécules de CMH-II est limitée aux CPA non-professionnelles, Kruse *et al.* [75] ont observé l'émergence de lymphocytes régulateurs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> FoxP3<sup>-</sup>, induits par les LSEC. Ces cellules sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et de supprimer l'inflammation hépatique dans un modèle d'hépatite auto-immune. Enfin, un sous-type de LT CD4<sup>+</sup> hépatiques persistants, appelés *recent thymic emigrants* en anglais (RTE), présente un phénotype régulateur (CD44<sup>high</sup> CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> LAG-3<sup>+</sup> CD49b<sup>-</sup>) et est capable de fonctions suppressives. Ces RTE CD4<sup>+</sup> peuvent être induits par les LSEC, peuvent produire de l'IL-10 et sont capables *in vitro* d'inhiber la prolifération des LT [76,77].



**Figure 9 : Les mécanismes de tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie.** Les différentes cellules hépatiques induisent une forte tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et effecteurs biaisant la réponse immunitaire hépatique adaptative vers une réponse pro-toléro-gène.

Finalement, malgré la capacité exceptionnelle du foie à induire l'activation intra-hépatique des LT CD8<sup>+</sup> et des LT CD4<sup>+</sup>, l'environnement hépatique supprimeur biaise la réponse immunitaire vers un état de tolérance en favorisant la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> naïfs en cellules épuisées ou suppressives et en inhibant les fonctions des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs voire en induisant leur dégradation (Figure 9). En condition d'homéostasie, cette tolérance hépatique est essentielle au bon fonctionnement de notre organisme. Elle empêche un emballement du système immunitaire, qui pourrait alors conduire à un phénomène de sur-inflammation hépatique pouvant provoquer la destruction du parenchyme hépatique.

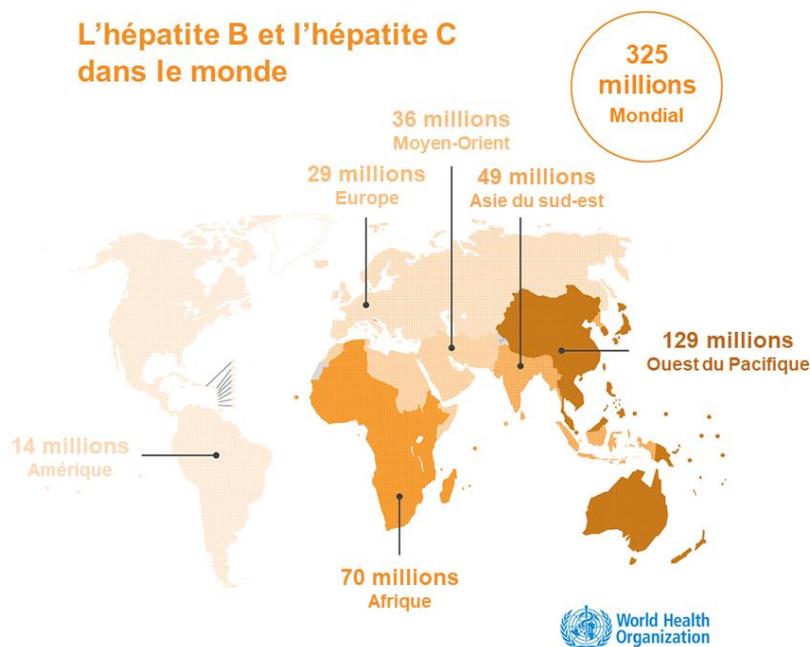
### 2.3. Le foie en condition pathologique

Malgré un avantage certain en condition homéostatique, le potentiel toléro-gène hépatique peut être détourné dans certaines conditions pathologiques. Dans des cas d'infections virales ou encore dans le cas du carcinome hépatocellulaire, les particules infectieuses ou les cellules

tumorales vont profiter de l'environnement hépatique tolérogène pour se développer et se multiplier, entraînant alors le développement d'une infection chronique ou d'un cancer.

### 2.3.1. Les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> dans le cas d'infections virales hépatiques chroniques

Les infections virales hépatiques, ou hépatites virales, débutent par une phase aiguë. Une réponse antivirale se met alors rapidement en place, constituée dans un premier temps d'une réponse innée puis d'une forte réponse adaptative [79]. Toutefois, dans certains cas, cette réponse antivirale ne suffit pas à induire la clairance du virus et l'infection devient alors chronique. Cette chronicité peut se mettre en place notamment lorsque le virus touche des cellules non-immunitaires telles que les hépatocytes [79].



**Figure 10 : Prévalence de l'hépatite B et de l'hépatite C dans le monde.** L'hépatite B et l'hépatite C touchent environ 325 millions de personnes à travers le monde. Ces deux types d'hépatites peuvent évoluer vers une forme chronique et sont responsables du plus grand nombre de décès parmi les hépatites virales. Adapté de l'infographie « *Viral hepatitis in the world* » de l'Organisation mondiale de la santé (*World Health Organization* en anglais).

Les hépatites virales peuvent être causées par cinq virus : les virus de l'hépatite A, B, C, D et E (HAV, HBV, HCV, HDV et HEV respectivement). Le HBV, le HCV et le HDV peuvent causer des hépatites virales chroniques. L'Organisation mondiale de la santé (*World Health Organization* en anglais) rapporte qu'environ 325 millions de personnes sont infectées par le

HBV et par le HCV (Figure 10). Ces deux types d'infections virales sont responsables de la plupart des décès dans le cas d'hépatites virales, le plus souvent suite à une cirrhose ou au développement d'un carcinome hépatocellulaire.

La transition d'une infection virale aiguë vers une infection virale chronique est souvent la conséquence non pas d'une diminution du nombre de LT mais d'un épuisement de la réponse T. Dans le cas du HBV, les protéines du virus peuvent induire la tolérance par les LT via des mécanismes de délétion clonale, d'ignorance ou d'anergie [80].

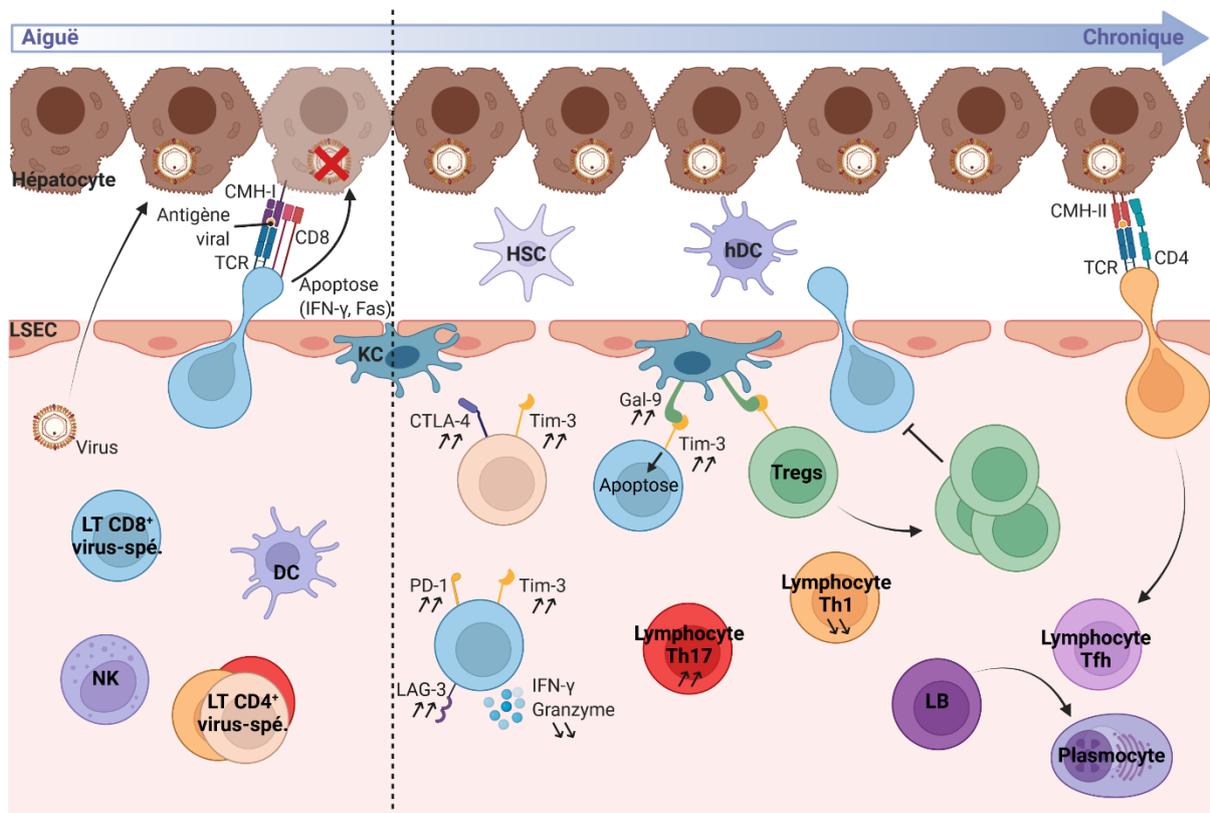
Les LT CD8<sup>+</sup> provenant de patients infectés par le HBV et le HCV présentent un profil épuisé avec une capacité réduite d'activation, de production de cytokines et de cytotoxicité [81–83]. La dysfonction des LT CD8<sup>+</sup> virus-spécifiques est notamment associée à une augmentation de l'expression de la molécule inhibitrice PD-1 par ces cellules [82,84]. Chez le chimpanzé, Park *et al.* ont montré que l'infection répétée par le HCV induisait la diminution de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les LT CD8<sup>+</sup> HCV-spécifiques [85] (Figure 11).

De plus, la voie de signalisation Tim-3/Gal-9 semble jouer un rôle important dans l'inhibition de la réponse T dans le cas des hépatites virales. Les patients infectés montrent une augmentation de la fréquence en LT CD8<sup>+</sup> ou LT CD4<sup>+</sup> exprimant la molécule inhibitrice Tim-3 [86,87] et une augmentation de la fréquence en KC exprimant à leur surface la molécule Gal-9, ligand de Tim-3 [88]. L'interaction Tim-3/Gal-9 conduit à l'apoptose des LT CD8<sup>+</sup> exprimant Tim-3 et induit l'expansion de Tregs [88,89]. Ces Tregs inhibent ensuite l'activation des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques [90] (Figure 11).

Chez les patients infectés par le HBV ou le HCV, la fréquence en Tregs est augmentée [91,92]. Ces Tregs sont alors capables d'inhiber la réponse T. Ceci permet de protéger le tissu hépatique des dommages causés par les LT activés lors de l'infection [93]. Toutefois, l'inhibition de l'activation des LT virus-spécifiques par les Tregs empêche le contrôle de l'infection virale et favorise de fait le développement d'une infection chronique (Figure 11).

Enfin, dans les cas d'infections virales chroniques, l'expression des molécules inhibitrices PD-1 et CTLA-4 est augmentée à la surface des LT CD4<sup>+</sup> virus-spécifiques [94]. De plus, la persistance du HCV entraîne une stimulation TCR continue provoquant la différenciation des lymphocytes Th1 HCV-spécifiques en lymphocytes Tfh, promoteurs de la différenciation des

LB et de leur production d'anticorps [95,96]. Durant les infections chroniques, Osokine *et al.* ont montré que l'IFN de type I inhibait la formation de nouveaux lymphocytes Th1 virus-spécifiques [97], pourtant essentiels dans l'élimination du virus lors d'infections aiguës. Ce déclin en lymphocytes Th1 contribue à l'épuisement de la réponse T CD8<sup>+</sup>, participant de fait à l'établissement d'une infection chronique [98]. De plus, Ge *et al.* ont montré que la fréquence en lymphocytes Th17 était augmentée chez les patients atteints d'une infection chronique par le HBV et que cette fréquence était négativement corrélée avec la fréquence en lymphocytes Th1 et positivement corrélée avec le taux de transaminases, reflet de la destruction hépatocytaire [99] (Figure 11).



**Figure 11 : Les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans la pathogenèse des hépatites virales chroniques.** Lors de la transition vers une hépatite virale chronique, les LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques, acteurs clés pour la résolution en phase aiguë, acquièrent un profil épuisé, augmentant l'expression de divers récepteurs inhibiteurs et montrant une capacité de cytotoxicité réduite. L'apoptose des LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques est favorisée par la stimulation de la voie Tim-3/Gal-9. Un déséquilibre en sous-populations T CD4<sup>+</sup> se crée en faveur des lymphocytes Th17, des lymphocytes Tfh et des Tregs.

Finalement, l'épuisement de la réponse lymphocytaire T dans le cas d'infections virales hépatiques, telles que le HBV ou le HCV, est l'élément clé de la transition d'une infection aiguë vers une infection chronique. Favorisé par l'environnement hépatique tolérogène, cet

épuisement passe par l'augmentation de l'expression de molécules inhibitrices (PD-1, Tim-3) à la surface des LT mais également par l'augmentation de la fréquence en Tregs et par la diminution de fréquence en lymphocytes Th1 virus-spécifiques.

Des travaux intéressants comparant infections virales aiguë et chronique ont été menés via l'utilisation du virus de la chorioméningite lymphocytaire (*lymphocytic choriomeningitis virus* en anglais, LCMV). Ce virus présente plusieurs souches ayant des dynamiques d'infection différentes permettant la comparaison entre réponse aiguë et réponse chronique. En particulier, la souche Armstrong (Arm) permet d'étudier la réponse aiguë vis-à-vis du LCMV (élimination du virus en environ 8 jours) alors que la souche clone 13 (C13) permet d'étudier la réponse chronique (virus persistant sur le long terme). De plus, ce virus est un pathogène naturel de la souris et du hamster et peut se transmettre à l'Homme via le contact direct ou indirect (liquides biologiques) avec les animaux infectés [100] ce qui en fait un modèle de choix pour des études pré-cliniques.

Plusieurs travaux ont comparé l'effet des souches Arm et C13 sur les réponses T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques après infection chez des souris [101,102]. Dans les deux modèles Arm et C13, les réponses spécifiques persistent sur le long terme dans la rate cependant ces réponses sont biaisées vers un profil épuisé dans le modèle chronique C13. Dans ce dernier, les cellules spécifiques de la rate sont dysfonctionnelles avec des LT CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques montrant une inhibition progressive de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  au cours du temps et des LT CD4<sup>+</sup> LCMV-spécifiques montrant un faible taux initial de sécrétion d'IFN- $\gamma$  et une forte proportion de LT CD4<sup>+</sup> LCMV-spécifiques producteurs d'IL-21 ou co-producteurs d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10. Le profil transcriptomique des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques épuisés dans le modèle chronique C13 est distinct de celui des cellules spécifiques effectrices du modèle aigu Arm ; il diverge également entre les LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> spécifiques épuisés au sein du modèle C13. Les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques épuisés du modèle chronique montrent une augmentation d'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 mais également 2B4 et LAG-3 pour les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques et CTLA-4 pour les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques. En revanche, ils montrent également une augmentation de l'expression de récepteurs co-stimulateurs comme OX40 et ICOS pour les LT CD4<sup>+</sup> spécifiques. L'analyse des facteurs de transcription présents au sein de la population de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques épuisés suggère que cette

population est composée de différentes sous-population de LT CD4<sup>+</sup> telles que des lymphocytes Tfh et des lymphocytes de type Th1 producteurs d'IL-10. La production d'IL-10 par ces derniers est par ailleurs soutenue par la forte expression de BLIMP-1 induite par la persistance de l'antigène [102].

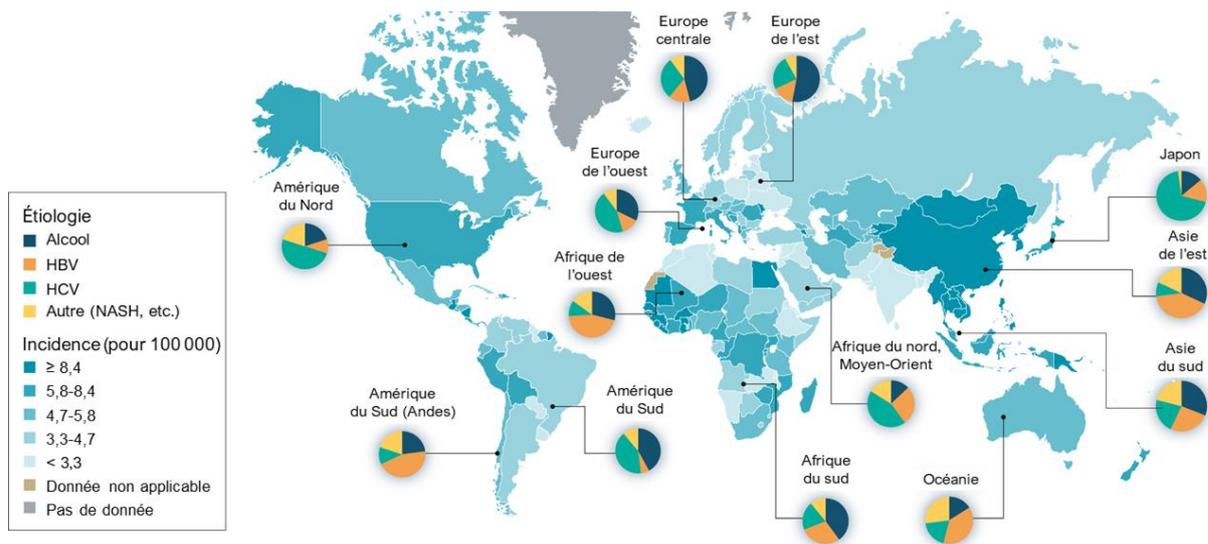
Alors que la plupart des études se sont intéressées à la réponse spécifique présente dans la rate, Sandu *et al.* ont étudié cette réponse dans différents organes grâce à des expériences de transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques dans des souris infectées par la souche chronique C13. Ils ont montré que la réponse T CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifique chronique montrait des divergences tissu-spécifiques et également au sein des tissus [103]. Ils ont alors caractérisé 5 grands types de LT CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques chroniques : proliférant, effecteurs, mémoires, épuisés et intermédiaires entre effecteurs et épuisés. En outre, les LT CD8<sup>+</sup> LCMV-spécifiques présents dans le sang, le foie et la moelle osseuse expriment le plus fort taux de PD-1, CXCR6 et CXCR3 par rapport aux cellules spécifiques des autres organes. Toutefois, parmi les différents organes étudiés, le foie a la particularité de présenter la population organe-spécifique la plus homogène avec plus de 70% des cellules similaires principalement de type épuisé (profil transcriptomique montrant une sur-expression des gènes codant pour PD-1, CD160, 2B4, LAG-3, Eomes et CXCR6) ; les autres organes, hormis la moelle osseuse, montrent une population plus hétérogène composée des 5 sous-types de cellules spécifiques.

Finalement, l'utilisation du modèle LCMV (aigu vs chronique) a permis de montrer que la persistance de l'antigène dans une situation d'infection chronique conduit à l'apparition de LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques au profil épuisé avec des capacités de sécrétion de cytokines altérées et l'augmentation de l'expression de récepteurs inhibiteurs à leur surface (PD-1, LAG-3, 2B4, CTLA-4). Alors que les LT CD4<sup>+</sup> LCMV-spécifiques sont de type Th1 dans le modèle aigu, ces cellules semblent se différencier en lymphocytes Tfh pro-B et lymphocytes Th1 de type régulateur producteurs d'IL-10 dans le modèle chronique. Les travaux de Sandu *et al.* soulignent toutefois que la réponse T LCMV-spécifique présente des particularités organe-spécifiques et montrent que le foie est un organe particulier enrichi en cellules spécifiques épuisées par rapport aux autres organes, démontrant de nouveau la particularité de la réponse immune intra-hépatique.

### 2.3.2. Les LT CD8<sup>+</sup> et LT CD4<sup>+</sup> dans le cas du carcinome hépatocellulaire

L'une des conséquences des infections virales chroniques par le HBV ou le HCV est le développement d'un carcinome hépatocellulaire (CHC).

Le CHC est le sixième cancer le plus représenté dans le monde. En outre, il s'agit du cancer du foie le plus fréquent représentant 90% des cas [104]. La plus forte incidence du CHC s'observe dans l'est de l'Asie ainsi qu'en Afrique, avec un taux d'incidence supérieur à 8,4 pour 100 000 (Figure 12). Le CHC est prédominant chez les hommes, avec un ratio homme:femme de 2-3:1.



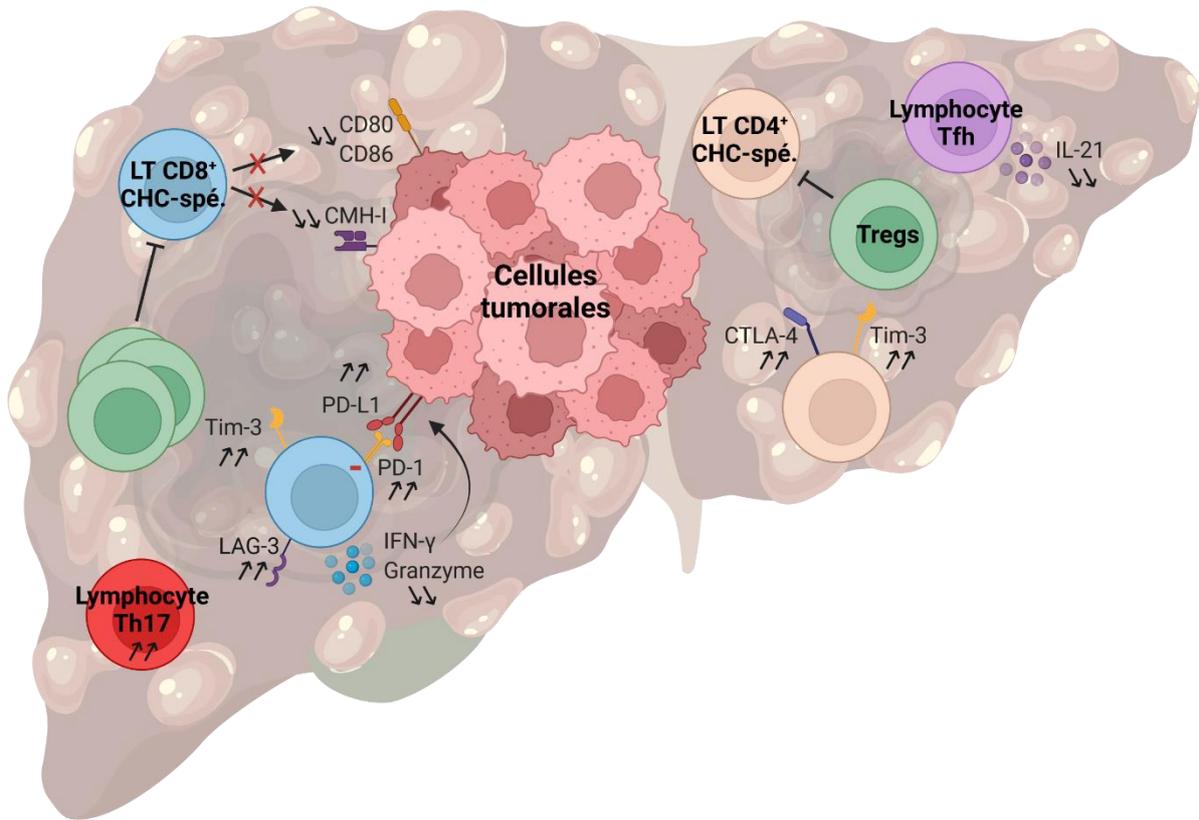
**Figure 12 : L'incidence du carcinome hépatocellulaire dans le monde.** Le CHC est le sixième cancer le plus représenté dans le monde. L'incidence du CHC la plus élevée s'observe en Asie de l'Est ainsi qu'en Afrique, avec une incidence supérieure à 8,4 pour 100 000. Plusieurs facteurs de risques associés aux CHC ont été mis en évidence dont la consommation d'alcool, les infections virales par le HBV ou le HCV ou encore d'autres causes telles que la stéatose hépatique non-alcoolique (NASH). Adapté de Llovet et al., *Nat. Rev. Dis. Primer*, 2021.

Dans la majorité des cas, le CHC se développe en conséquence d'une pathologie hépatique chronique. Le facteur de risque le plus élevé concernant le développement du CHC est la cirrhose. D'autres facteurs de risque du CHC ont été mis en évidence tels que la consommation d'alcool, les infections virales par le HBV ou le HCV ou encore la stéatose hépatique non-alcoolique (*non-alcoholic steatohepatitis* en anglais, ou NASH) [104] (Figure 12). De plus, l'âge ainsi que le tabagisme sont également des facteurs de risque importants du CHC. L'atteinte hépatique chronique entraîne un stress cellulaire constant pouvant causer des dommages, d'un point de vue cellulaire mais également génomique, tout comme le vieillissement et le tabagisme, augmentant alors le risque de développement tumoral.

Le micro-environnement hépatique est enclin à l'immunosuppression. Les cellules tumorales vont donc tirer profit de cet environnement tolérogène et échapper à une reconnaissance et une élimination par le système immunitaire.

Dans le CHC, les cellules tumorales montrent une diminution de l'expression des molécules de co-stimulation CD80 et CD86 ainsi que des molécules de CMH-I [105]. Cette diminution d'expression permet aux cellules tumorales d'échapper à l'immuno-surveillance par les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Figure 13). Or, les LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques sont des agents clés dans l'immunité anti-tumorale. Shalapour *et al.* ont montré que la déplétion de ces cellules accélérerait le développement du CHC chez la souris [106]. Par ailleurs, différents LT CD8<sup>+</sup> spécifiques d'antigènes associés au CHC (CHC-spécifiques) ont été identifiés. L' $\alpha$ -foetoprotéine est l'antigène le plus commun et est sur-exprimé dans la majorité des cas de CHC. Cet antigène induit une forte immunogénicité [107].

De manière générale, les LT CD8<sup>+</sup> présents dans le micro-environnement tumoral des cancers montrent un profil épuisé [108]. Une étude de séquençage des ARN au niveau de la cellule unique (*single-cell RNA sequencing* en anglais) chez des patients atteints de CHC a montré que le micro-environnement tumoral était enrichi en LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques épuisés [109]. Ces LT CD8<sup>+</sup> épuisés montrent des capacités de prolifération et d'activation, notamment de production de cytokines, réduites. De plus, dans le tissu tumoral, les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> montrent une augmentation d'expression de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1, TIM-3, LAG-3 ou encore CTLA-4 [110,111] ; cette expression est notamment plus importante sur les LT CD8<sup>+</sup> CHC-spécifiques par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> totaux présents dans le tissu tumoral. Kim *et al.* ont identifié une population de LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> exprimant une plus forte proportion de gènes impliqués dans la régulation de l'épuisement cellulaire et la présence de ces LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>high</sup> TIM-3<sup>+</sup> LAG-3<sup>+</sup> est associée avec une forme plus agressive de CHC [112]. Associé à cette expression plus importante de PD-1 par les LT CD8<sup>+</sup> infiltrant la tumeur, les cellules tumorales expriment une plus forte proportion de PD-L1, ligand de la molécule PD-1 [110]. Or, les LT CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> sont capables d'induire *in vitro* l'expression de PD-L1, ligand de PD-1, à la surface des cellules tumorales via la production d'IFN- $\gamma$  [110]. Ceci crée donc une boucle de rétrocontrôle positive induisant l'inhibition des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (Figure 13).



**Figure 13 : Les LT CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> dans la pathogénèse du CHC.** Les LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans le microenvironnement tumoral du CHC montrent un profil épuisé avec des capacités de prolifération et cytotoxiques réduites. La diminution de facteurs de co-stimulation et l'importante infiltration en Tregs favorisent l'inhibition des réponses T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques effectrices dans le CHC.

Concernant la réponse CD4, les LT CD4<sup>+</sup> dans le CHC semblent avoir une capacité anti-tumorale altérée. Les patients atteints de CHC montrent une faible fréquence en LT CD4<sup>+</sup> CHC-spécifiques en périphérie mais également intra-tumorale [113]. De même, la capacité des lymphocytes Tfh à produire de l'IL-21 et à induire la différenciation des LB est réduite chez les patients atteints de CHC [114]. À l'inverse, Qin *et al.* ont observé une proportion plus importante de lymphocytes Th17 et Th22 circulants chez les patients atteints de CHC [115]. Toutefois, le micro-environnement tumoral est enrichi en Tregs [109,116,117]. Ces Tregs sont capables d'inhiber directement la prolifération et la sécrétion de cytokines des LT CD8<sup>+</sup> mais également indirectement en inhibant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs [116–118]. De plus, la proportion de Tregs dans le tissu tumoral est plus grande qu'en périphérie de la tumeur et ces Tregs montrent des capacités suppressives plus importantes [119]. Enfin, l'augmentation de la fréquence de Tregs chez les patients est associée avec une diminution de la fréquence en LT CD8<sup>+</sup> dans la tumeur et corrèle avec la progression du CHC chez les

patients [116]. Toutes ces observations montrent que, dans le CHC, les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs ont une capacité anti-tumorale réduite et que les Tregs participent à l'échappement de la tumeur en inhibant notamment la réponse T CD8<sup>+</sup> anti-tumorale mais également en inhibant la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> (Figure 13).

En conclusion, l'épuisement des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, la faible fréquence en LT CD4<sup>+</sup> effecteurs ainsi que la forte proportion en Tregs dans le micro-environnement tumoral contribuent à l'échappement tumoral dans le cas du CHC. Cet échappement est d'autant plus favorisé par la diminution d'expression des molécules de co-stimulation et de CMH-I et la surexpression de PD-L1 par les cellules tumorales. L'environnement hépatique suppresseur joue un rôle particulièrement important dans la gravité du CHC, favorisant un rapide développement et participant à la diminution d'efficacité des mono-immunothérapies, nécessitant le développement de thérapies combinées [120–122].

### 3. Le détournement du potentiel tolérogène hépatique à des fins thérapeutiques

La capacité du foie à induire une tolérance vis-à-vis d'un antigène étranger présente un potentiel prometteur pour le traitement de pathologies, telles que les pathologies monogéniques ou les MAI (maladies auto-immunes), ou encore dans le cas de transplantations avec incompatibilité HLA.

#### 3.1. La thérapie génique ciblant le foie pour le traitement de pathologies monogéniques et auto-immunes

Le potentiel tolérogène hépatique a été détourné dans divers travaux de thérapies géniques. La thérapie génique est une stratégie thérapeutique développée dans l'objectif de traiter des maladies monogéniques (mutation affectant un seul gène et induisant l'absence de production de la protéine associée) en induisant l'expression d'un transgène (matériel génétique fonctionnel correspondant au gène défectueux) dans des cellules afin de pallier la dysfonction du gène endogène. Cette stratégie utilise les propriétés infectieuses des vecteurs viraux afin d'induire l'expression du transgène : adénovirus, virus adéno-associé (ou *adeno-associated virus* en anglais, AAV), lentivirus et rétrovirus [123].

Le ciblage du foie en thérapie génique présente un double avantage. Non seulement cet organe permet d'induire une tolérance robuste de manière locale et systémique mais également la majorité des vecteurs viraux présentent un tropisme hépatique important, c'est-à-dire qu'ils vont infecter préférentiellement les hépatocytes [124]. De plus, grâce à ses fonctions naturelles de production protéique et aux nombreux vaisseaux qui l'irriguent, le foie est un lieu privilégié de production et de distribution pour un produit de transgène.

L'une des stratégies de thérapie génique visant le foie les plus emblématiques est celle développée dans le cadre du traitement de l'hémophilie B. Cette pathologie est une maladie héréditaire monogénique affectant le gène codant pour le facteur IX (FIX) de coagulation exprimé par les hépatocytes. Cette mutation conduit à une absence de production d'un FIX fonctionnel conduisant alors à des défauts de coagulation. Le traitement usuel de l'hémophilie B passe par une stratégie de remplacement, c'est-à-dire de multiples injections par semaine de FIX recombinant. Ce traitement est invasif et conduit souvent à la génération d'anticorps dirigés contre le FIX recombinant. C'est pourquoi Nienhuis, Nathwani et Davidoff ont développé une stratégie de thérapie génique visant à induire la production tolérée d'un FIX [125]. Le développement de cette stratégie a débuté en 1997 par la mise au point de vecteurs AAV et des essais pré-cliniques chez des souris puis des primates non-humains pour finir par des essais cliniques chez 12 patients dont les résultats ont été publiés en 2014 [126]. L'injection d'une seule dose d'un vecteur AAV de sérotype 8, très efficace dans la transduction des hépatocytes, codant pour le FIX a conduit à la production et la tolérance à long terme du FIX chez 12 patients, améliorant significativement leur fonction de coagulation [126]. Dans des modèles murins, Herzog et son équipe ont par ailleurs montré que la tolérance induite par cette stratégie était causée par des Tregs et ceux-ci étaient capables d'induire l'élimination des anticorps anti-FIX recombinant générés lors de la thérapie de remplacement [127,128]. Hoffman *et al.* ont montré que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 agissaient en synergie et étaient nécessaires respectivement pour la génération et pour la fonction suppressive des Tregs dans le maintien de la tolérance vis-à-vis du transgène [129]. Cette thérapie génique fut la première à être testée au stade clinique et avec succès. Il s'agit désormais d'une référence en matière de thérapie génique visant le foie.

Alors que la thérapie génique développée pour le traitement de l'hémophilie B avait pour but de pallier le manque de FIX fonctionnel produit par les hépatocytes, celle-ci a mis en exergue la capacité exceptionnelle du foie à induire la tolérance systémique vis-à-vis d'un transgène. Cette capacité a donc par la suite été utilisée dans d'autres modèles de thérapie génique pour le traitement d'autres pathologies non-spécifiques du foie dont des MAI. Ces thérapies en sont encore au stade pré-clinique mais sont prometteuses.

Dans un modèle murin de diabète de type 1 [130], l'induction de l'expression hépatique d'un peptide de la chaîne  $\beta$  de l'insuline, auto-antigène, grâce à un vecteur lentiviral permet de prévenir la mise en place du diabète chez des souris NOD grâce à l'expansion de Tregs. De la même manière, dans un modèle murin de sclérose en plaques induit par immunisation contre la protéine MOG (glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline), Keeler *et al.* ont induit l'expression hépatique de cette même protéine MOG grâce à un vecteur AAV permettant non seulement de prévenir le développement de la maladie mais également de guérir la maladie déjà déclarée [131]. L'injection de l'AAV MOG seul permet la génération de Tregs MOG-spécifiques et son injection préventive inhibant le développement de la maladie s'accompagne d'une augmentation de la fréquence en Tregs totaux.

Ainsi, ces travaux soulignent encore une fois le potentiel tolérogène hépatique, à la fois local et systémique, et le rôle des Tregs dans l'induction de tolérance. Toutefois, ces études manquent d'analyses des mécanismes précis impliqués dans l'induction de tolérance (rôles des hépatocytes et NPC, voies de signalisation impliquées, implication sur les réponses T effectrices), notamment au niveau antigène-spécifique. Néanmoins, le détournement de la tolérance hépatique à des fins curatives semble présenter un espoir pour le traitement de pathologies monogéniques, comme l'hémophilie B, ou d'autres pathologies comme les MAI, qu'elles soient spécifiques ou non du foie.

### 3.2. La thérapie génique ciblant le foie pour la transplantation

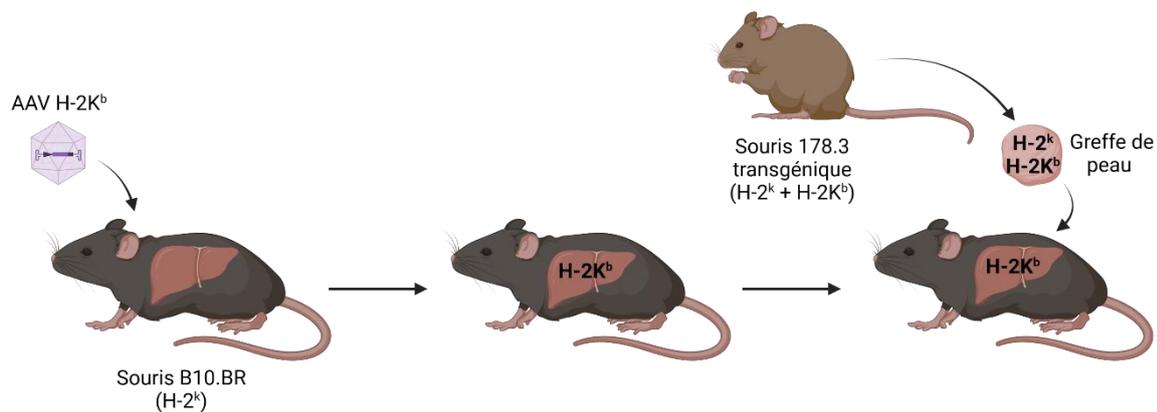
La transplantation correspond au traitement terminal de pathologies menant à une défaillance d'organe. Bien que le nombre de transplantations effectuées augmente chaque année, le nombre de patients en attente de transplantation augmente également selon l'Agence de la Biomédecine. L'une des principales limitations à la transplantation est la

nécessité d'une compatibilité entre molécules du CMH humain (ou HLA) du donneur et du receveur. Le typage HLA systématique des donneurs et receveurs permet d'éviter un taux d'incompatibilité trop élevé et prévient ainsi le rejet hyper-aigu du greffon. Toutefois, du fait de la diversité allélique des molécules du CMH, il subsiste une part d'incompatibilité à l'origine du rejet aigu, impliquant la reconnaissance des molécules de CMH allogéniques du donneur par les LT du receveur. Ainsi, au vu du potentiel d'induction de tolérance du foie vis-à-vis d'un transgène, l'utilisation d'une thérapie génique en transplantation induisant l'expression de molécules de CMH allogéniques chez les receveurs pourrait permettre d'induire une tolérance allogénique en transplantation. Des travaux pré-cliniques chez la souris ont donc été développés. Pour rappel, le CMH murin est nommé système H-2 et est détaillé dans le Tableau 2. Selon la souche de souris utilisée, l'haplotype du CMH varie (Tableau 2).

**Tableau 2 : Les molécules du CMH de classe I et II du système H-2 murin et la variabilité des haplotypes H-2 selon les souches de souris.**

Complexe		H-2				
Classe		I			II	
Région		K	D		I-A	I-E
Produit du gène		H-2K	H-2D	H-2L	H-2I-A	H-2I-E
Souche	Haplotype	Molécules du système H-2 selon la souche de souris				
C57BL/6 C57BL/10 B10	H-2 <sup>b</sup>	H-2K <sup>b</sup>	H-2D <sup>b</sup>	/	H-2I-A <sup>b</sup>	H-2I-E <sup>b</sup>
Balb/c B10.D2	H-2 <sup>d</sup>	H-2K <sup>d</sup>	H-2D <sup>d</sup>	H-2L <sup>d</sup>	H-2I-A <sup>d</sup>	H-2I-E <sup>d</sup>
B10.BR C3H/HeJ 178.3	H-2 <sup>k</sup>	H-2K <sup>k</sup>	H-2D <sup>k</sup>	/	H-2I-A <sup>k</sup>	H-2I-E <sup>k</sup>

Chez des souris B10.BR exprimant des molécules de CMH-I murines H-2 d'haplotype k (H-2<sup>k</sup>), l'injection d'un vecteur AAV codant pour des molécules de CMH-I murines H-2K d'haplotype b (H-2K<sup>b</sup>) a permis l'induction de l'expression de H-2K<sup>b</sup> par les hépatocytes. Cette expression hépatique permet la tolérance d'une greffe de peau H-2<sup>k</sup> transgénique présentant des molécules de CMH allogéniques H-2K<sup>b</sup> [132] (Figure 14). Associée à cette tolérance allogénique, l'expression hépatique de H-2K<sup>b</sup> inhibe également la réponse mémoire préexistante et les réponses T dirigées contre cette molécule allogénique.



**Figure 14 : Induction de tolérance vis-à-vis d'une greffe de peau présentant une molécule de CMH allogénique via l'utilisation d'une thérapie génique ciblant le foie.** L'injection d'un vecteur AAV codant pour une molécule de CMH H-2K<sup>b</sup> induit l'expression hépatique tolérée de cette molécule chez des souris B10.BR d'haplotype H-2<sup>k</sup>. Ceci permet la tolérance d'une greffe de peau allogénique provenant d'une souris 178.3 d'haplotype H-2<sup>k</sup> et exprimant des molécules H-2K<sup>b</sup> transgéniques de manière ubiquitaire.

Récemment, notre équipe a également utilisé ce potentiel tolérogène hépatique afin d'induire la tolérance vis-à-vis de greffes d'îlots pancréatiques allogéniques dans un modèle murin de diabète [133]. Chez des souris C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) rendues diabétiques par injection de streptozotocine, l'injection d'un vecteur AAV codant pour la molécule de CMH allogénique H-2K<sup>d</sup> conduit à la tolérance chez 50% des souris de greffes d'îlots pancréatiques provenant de souris Balb/c (H-2<sup>d</sup>). Cette induction de tolérance passe par l'expansion de LT CD8<sup>+</sup> au profil PD-1<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>, sécrétant de l'IL-10 et aux propriétés régulatrices.

Ainsi, ces modèles pré-cliniques sont prometteurs quant à la capacité d'induction de tolérance vis-à-vis d'une greffe allogénique. Du chemin reste à parcourir avant une utilisation en clinique mais, à terme, ces travaux pourraient mener à la réalisation de transplantations avec une compatibilité HLA moins stricte permettant de pallier le manque d'organes disponibles pour la transplantation.

### 3.3. L'utilisation de nanoparticules ciblant le foie

Une approche originale parmi les thérapies ciblant le foie est l'utilisation de nanoparticules (NP). Les NP sont de petites particules de compositions et de formes variées avec une taille allant de 1 à 100nm. Ces particules sont capables de distribuer des composés chimiques (médicaments) ou biologiques jusque dans les cellules grâce à leur taille nanométrique [134].

Ces matériaux peuvent être administrés dans la circulation sanguine et présentent la particularité, comme les vecteurs viraux, de s'accumuler préférentiellement dans le foie [135]. Ce tropisme hépatique a alors été utilisé dans des stratégies d'induction de tolérance dans des pathologies telles que l'allergie.

Nel et son équipe [136] ont développé un modèle d'allergie basé sur la sensibilisation à l'OVA. Ils ont alors injecté à ces souris des NP comportant de l'OVA (NP<sup>OVA</sup>) et visant les LSEC, grâce à l'ajout de ligands des récepteurs au mannose et des récepteurs *scavenger* présents sur les LSEC. Ils ont observé que ces NP<sup>OVA</sup> s'accumulaient préférentiellement dans le foie et étaient co-localisées avec les LSEC. Injectées en prophylaxie, elles permettent de réduire significativement le développement d'IgE anti-OVA et la production de cytokines Th2 (sous-classe d'Ig et cytokines impliquées dans l'allergie) et permettent de réduire l'inflammation des voies aériennes via l'expansion de Tregs.

Dans un autre contexte, le ciblage des LSEC peut être utilisé afin d'activer une réponse immunitaire dans le cas du cancer. Puisque les LSEC sont d'importants médiateurs de la tolérance hépatique, Yu *et al.* [137] ont montré que le ciblage des LSEC avec des NP constituées de mélittine (peptide connu pour induire de la cytotoxicité cellulaire [138]) permettait d'induire l'activation des LSEC dans un modèle murin. Ceci provoque l'altération de la composition en cytokines et chimiokines du milieu intra-hépatique (augmentation d'IL-1 $\alpha$ , CXCL9, CCL3, CCL4 notamment). Cette modification de l'environnement hépatique permet de protéger les souris contre le développement de métastases dans le foie via l'activation de réponses T anti-tumorales.

Enfin, des travaux originaux de Santamaria et son équipe ont utilisé des NP présentant des complexes CMH-II/peptides spécifiques d'auto-antigènes présentés dans des MAI hépatiques telles la cholangite biliaire primitive (CBP), la cholangite sclérosante primitive (CSP) et l'hépatite auto-immune (HAI) dans des souris [139]. Dans un modèle murin de CBP, les NP CBP-spécifiques permettent l'expansion de lymphocytes régulateurs Tr1 (CD4<sup>+</sup> LAG-3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> LAP<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>) supprimant la progression de la CBP chez la souris. Ces lymphocytes Tr1 sont associés également à une inhibition de la capacité pro-inflammatoire des KC et des monocytes des ganglions drainant le foie. De façon intéressante, dans différents modèles murins d'HAI et de CBP, ils ont montré que les NP spécifiques de chaque maladie étaient non seulement capables d'induire des lymphocytes Tr1 permettant d'inhiber

l'inflammation hépatique observée dans la pathologie ciblée par les NP mais également dans les autres MAI hépatiques de manière organe-spécifique plutôt que maladie-spécifique. Cette capacité régulatrice élargie aux autres MAI hépatiques n'empêche toutefois pas une réponse immunitaire efficace dans le cas de cancer ou d'infection. Dans des travaux ultérieurs [140], ils ont également montré que les lymphocytes Tr1 générés par l'injection des NP spécifiques de la CBP ou de l'HAI et reconnaissant donc des auto-antigènes ubiquitaires étaient capables d'inhiber également la progression d'un modèle murin de sclérose en plaques. Ces observations ouvrent la voie au développement de stratégies permettant le traitement indifférencié de différentes pathologies auto-immunes inflammatoires.

Ainsi, les NP sont des outils intéressants pour la délivrance de molécules jusque dans les cellules. Le tropisme hépatique et la petite taille des NP en font des cibles de choix pour l'internalisation par les différentes CPA hépatiques. Le ciblage du foie via l'utilisation de NP pour l'induction de tolérance dans le cadre du traitement de pathologies telles que l'allergie, pour l'activation de la réponse immune dans le cas du cancer ou encore pour l'inhibition de pathologies auto-immunes inflammatoires extra-hépatiques est une stratégie originale qui pourrait permettre le traitement de nombreux contextes pathologiques.

Finalement, la tolérance hépatique est un système robuste faisant intervenir l'ensemble des cellules hépatiques. Étant donné que le foie reçoit une grande quantité d'antigènes étrangers provenant notamment de l'alimentation, ce système est bénéfique en homéostasie empêchant la sur-activation du système immunitaire et une inflammation hépatique perpétuelle nocive. Ce potentiel tolérogène peut s'avérer utile et peut être détourné pour le traitement de diverses pathologies ou dans le cadre d'induction de tolérance lors de transplantations allogéniques. Ces stratégies permettent l'émergence de LT CD4<sup>+</sup> régulateurs, de type Tregs ou Tr1, impliqués dans l'induction de la tolérance systémique. En revanche, en conditions pathologiques, la tolérance hépatique peut s'avérer délétère en favorisant la mise en place d'infections chroniques ou le développement de tumeurs. Bien que la phase initiale dirigée contre le pathogène ou les cellules tumorales montre une réponse effectrice, la réponse immune mémoire évolue vers une hyporéactivité globale avec l'apparition d'un phénotype

d'épuisement chez les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques et une différenciation favorisée des LT CD4<sup>+</sup> en lymphocytes régulateurs.

Bien que robuste, la tolérance hépatique présente toutefois des limites, ceci s'observe notamment dans la réponse aiguë vis-à-vis d'une infection virale. Il existe également une situation particulière multifactorielle et chronique dans laquelle une réaction auto-immune peut se mettre en place dans le foie, il s'agit de l'hépatite auto-immune.

## PARTIE 3

### La réponse immunitaire auto-immune dans le foie

L'hépatite auto-immune (HAI) est une maladie auto-immune (MAI) organe-spécifique ciblant le foie. Cette pathologie inflammatoire chronique induit une destruction progressive du parenchyme hépatique avec la mise en place d'une importante fibrose. Si elle n'est pas traitée, l'HAI évolue vers une cirrhose voire une insuffisance hépatique.

#### 1. Les caractéristiques cliniques de l'hépatite auto-immune

##### 1.1. L'épidémiologie

L'HAI touche à la fois les enfants et les adultes, avec toutefois un pic d'incidence entre 50 et 60 ans (Tableau 3).

Bien que présente dans le monde entier, il s'agit d'une pathologie rare dont la prévalence en Europe et en Amérique du Nord est de 16,9 pour 100 000 habitants avec une incidence de 0,1 à 1,9 pour 100 000 habitants par an [141]. L'incidence de l'HAI augmente en Europe alors qu'elle reste stable mais haute en Asie de l'Est (de 0,67 à 2,0 pour 100 000) et particulièrement en Nouvelle-Zélande (jusqu'à 2,0 pour 100 000) [142]. Ce phénomène s'expliquerait en partie par l'« hypothèse hygiéniste » selon laquelle l'amélioration des conditions sanitaires dans les pays industrialisés entraîne une diminution de l'exposition des enfants en bas âge aux pathogènes (virus, bactéries, parasites) provoquant une altération de la maturation du système immunitaire et du microbiome favorisant le développement de l'allergie, des pathologies inflammatoires et des MAI [143]. Toutefois, cette hypothèse seule ne saurait expliquer l'importante incidence de l'HAI et son augmentation dans certaines zones géographiques. Ceci pourrait également s'expliquer par une meilleure prise en charge des patients avec un meilleur diagnostic de la pathologie.

L'HAI est divisée en deux sous-types selon les auto-anticorps présents chez les patients : l'HAI de type 1 (HAI-1) et l'HAI de type 2 (HAI-2). (voir partie 1.2. Le diagnostic et les traitements ». Le ratio femme:homme montre une prédisposition féminine qui varie selon le sous-type d'HAI avec un ratio de 4:1 pour l'HAI-1 et de 10:1 pour l'HAI-2 [141] (Tableau 3).

**Tableau 3 : Caractéristiques de l’HAI-1 et de l’HAI-2.**

		HAI-1	HAI-2
<b>Distribution géographique</b>		Mondiale	
<b>Âge</b>		Enfants, adultes	Enfants
<b>Ratio Femme:Homme</b>		4:1	10:1
<b>Éléments diagnostic</b>		Hypergammaglobulinémie, auto-anticorps, hépatite d’interface, absence d’hépatite virale	
<b>Traitement</b>		Prednisolone ; prednisolone + azathioprine	
<b>Susceptibilité génétique</b>		Europe et Amérique du Nord : HLA-DR3, HLA-DR4 Japon, Argentine et Mexique : HLA-DR4 Amérique du Sud : HLA-DR13	HLA-DR7, HLA-DR3
<b>Facteurs environnementaux</b>		Infection(s) virale(s) (mimétisme moléculaire), médicaments (minocycline, nitrofurantoïne, diclofénac, statines)	
<b>Auto-anticorps</b>	<b>Spécifiques</b>	ANA, SMA, anticorps anti-SLA	Anticorps anti-LKM-1, anticorps anti-LC-1
	<b>Communs</b>	Anticorps anti-LSP, anticorps anti-ASGPR, anticorps anti-ADH	
<b>Auto-antigène visé</b>		SepSecs (SLA)	CYP2D6, FTCD

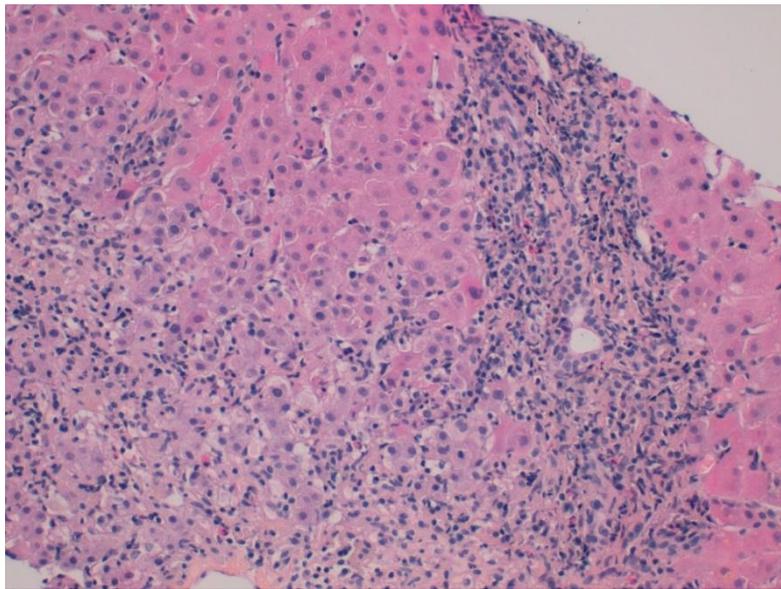
### 1.2. Le diagnostic et les traitements

Les symptômes de l’HAI sont multiples : asthénie (fatigue intense), ictère (coloration jaune de la peau, des muqueuses, du blanc de l’œil), douleurs abdominales (liées à une hépatomégalie), perte de poids, nausées, douleurs articulaires.

L’HAI est caractérisée par un taux sérique élevé des transaminases aspartate (ASAT) et alanine (ALAT) et une hypergammaglobulinémie (taux élevé d’IgG) [144]. Les patients présentent également une quantité importante d’auto-anticorps dans le sang (voir partie « 2.1. Les auto-anticorps »). Plus précisément, l’HAI-1 est caractérisée par la présence d’anticorps anti-nucléaire (*anti-nuclear antibodies* en anglais, ANA), d’anticorps anti-muscle lisse (*anti-smooth muscles antibodies* en anglais, SMA) et d’anticorps anti-antigène soluble du foie (*soluble liver antigen* en anglais, SLA). L’HAI-2 est définie par la présence d’anticorps anti-LKM-1 (*liver kidney microsomal type 1* en anglais) et d’anticorps anti-LC-1 (*liver cytosol 1*

en anglais) (Tableau 3). Les patients présentent également des anticorps communs aux deux formes d'HAI (Tableau 3 et voir partie « 2.1. Les auto-anticorps »).

Grâce au prélèvement d'une biopsie hépatique et à une analyse histologique, l'un des marqueurs diagnostic primordial de l'HAI est l'observation d'une hépatite d'interface (Figure 15). L'hépatite d'interface correspond à l'infiltration massive du parenchyme hépatique par des cellules immunitaires à partir des veines portes hépatiques. Elle est constituée principalement de LT CD4<sup>+</sup> mais également de LT CD8<sup>+</sup> et de LB [144].



**Figure 15 : L'hépatite d'interface.** Infiltration massive du parenchyme hépatique par des cellules immunitaires (en majorité des LT CD4<sup>+</sup>, mais également des LT CD8<sup>+</sup> et des LB) à partir des veines portes hépatiques.

Le diagnostic de l'HAI repose sur l'association de différents marqueurs (clinique, sérologique, histologique) afin de distinguer cette pathologie d'autres pathologies hépatiques telles que l'hépatite médicamenteuse ou les hépatites virales (Tableau 3). En 2008, Hennes *et al.* [145] ont publié un score diagnostique simplifié facilement utilisable en clinique, ayant une forte sensibilité et spécificité et permettant d'établir le diagnostic de l'HAI (Tableau 4).

Les causes précises de l'HAI n'étant pas encore connues, les patients sont traités avec des traitements immunosuppresseurs, dans la majorité des cas prednisolone seule ou prednisolone associée à de l'azathioprine [146] (Tableau 3). Malheureusement, ces traitements non-spécifiques peuvent présenter des effets secondaires graves, tels que la susceptibilité accrue aux infections ou encore la survenue de cancer [147].

**Tableau 4 : Score diagnostique simplifié de l'HAI.**

Paramètre médical		Seuil	Point
<b>Auto-anticorps *</b>	ANA ou SMA	≥ 1:40	1
		≥ 1:80	2
	Anti-LKM-1	≥ 1:40	2
	Anti-SLA	Tout titre	2
<b>IgG *</b>		> Norme limite supérieure	1
		> 1,10 fois norme supérieure	2
<b>Histologie *</b>		Typique de l'HAI	2
		Compatible avec l'HAI	1
<b>Absence d'hépatite virale *</b>		Oui	2
* 2 points maximum par catégorie 8 points totaux maximum		<b>Si total</b>	= 6 : HAI probable ≥ 7 : HAI certaine

La rémission est déterminée par la normalisation des taux sanguins d'ASAT et ALAT et d'IgG et la résolution de l'hépatite d'interface. Une période d'au moins trois ans de traitement ainsi qu'une normalisation des données biologiques pendant au moins deux ans sont recommandées pour l'arrêt du traitement. Bien que 75% des patients atteignent la rémission, 50% rechutent dans les 6 premiers mois et 80% dans les 3 ans après l'arrêt du traitement [148]. Ainsi, il apparaît primordial de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques permettant d'améliorer les conditions de vie et le taux de rémission des patients.

### 1.3. Les prédispositions génétiques et facteurs environnementaux

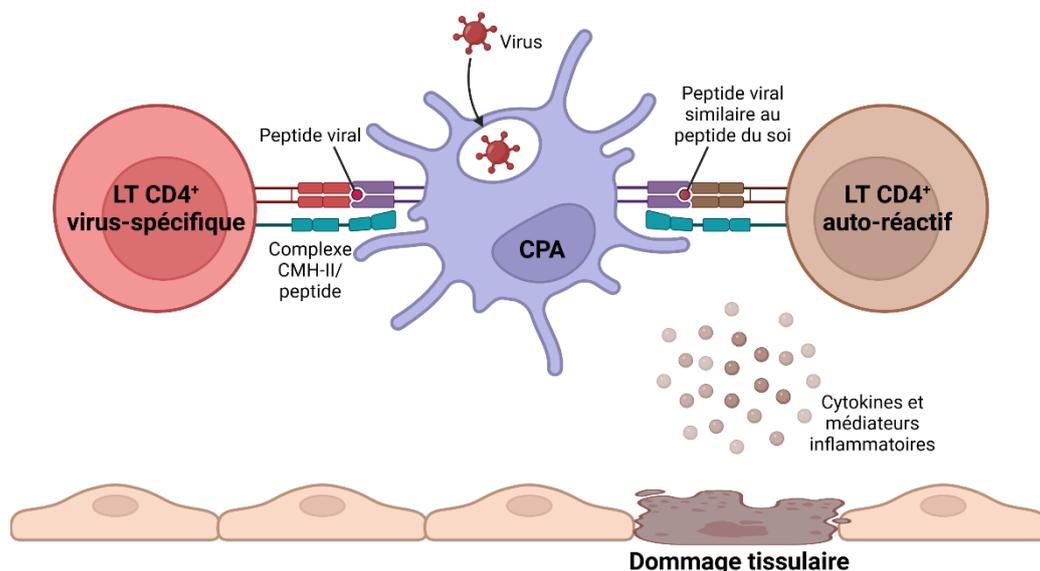
L'étiologie de l'HAI est encore peu caractérisée. Toutefois, certaines prédispositions génétiques et facteurs environnementaux sont associés à l'apparition de la maladie.

La prédisposition génétique à l'HAI est liée aux gènes codant pour les molécules du HLA et plus particulièrement les allèles DRB1 de l'HLA de classe II. Selon les régions géographiques dont sont originaires les patients, les allèles DRB1 conférant la susceptibilité varient. La prédisposition génétique à l'HAI-1 est conférée par les allèles HLA-DR3 (DRB1\*0301) et HLA-DR4 (DRB1\*0401) en Europe et en Amérique du Nord ; par l'allèle HLA-DR4 (DRB1\*0405 et DRB1\*0404) au Japon, en Argentine et au Mexique ; par l'allèle

HLA-DR13 (DRB1\*1301) en Amérique du Sud (Tableau 3). La susceptibilité à l'HAI-2 est conférée par HLA-DR7 (DRB1\*0701), prédisposant alors à une forme plus agressive de la maladie, et par HLA-DR3 (DRB1\*0301) (Tableau 3) [149]. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les allèles DRB1 codent pour des molécules de CMH-II, qui sont impliquées dans la présentation antigénique nécessaire à l'activation des LT CD4<sup>+</sup>, suggérant un rôle important de la restriction de la présentation peptidique par les molécules de CMH-II pour activer les LT CD4<sup>+</sup> dans cette pathologie.

En plus des gènes codant pour les molécules HLA, d'autres gènes sont associés à un risque plus élevé de développer la maladie, comme les gènes codant pour la molécule inhibitrice CTLA-4 ou pour la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  [150–152].

Certains facteurs environnementaux sont également impliqués dans le développement de l'HAI tels que les infections virales, l'exposition à certains médicaments (antibiotiques –minocycline, doxycycline–, diurétiques –nitrofurantoiné–, anti-inflammatoires –diclofénac–, statines) ou encore le mimétisme moléculaire (mécanisme détaillé ci-après, Figure 16) [148] (Tableau 3).



**Figure 16 Le mimétisme moléculaire.** Les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs peuvent être activés grâce à la reconnaissance d'un peptide viral similaire à nos peptides du soi. Ce mécanisme conduit à la lyse de nos cellules provoquant des dommages tissulaires. D'après Münz *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, 2009.

Le mimétisme moléculaire est un mécanisme reposant sur l'hypothèse selon laquelle la réponse immunitaire dirigée contre un pathogène exprimant des peptides similaires à nos

peptides du soi entraînerait une réponse immunitaire contre nos peptides du soi [153] (Figure 16). Ce phénomène semble être un facteur environnemental clé dans l'initiation de l'HAI [154]. Notamment, une séquence de l'un des auto-antigènes cibles dans l'HAI-2, le cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) (voir partie « 2.2. L'infiltration lymphocytaire hépatique », Tableau 3), est similaire aux séquences présentes dans les protéines du HCV [155]. Toutefois, à ce jour, le lien direct entre HCV et HAI-2 n'a pas été montré.

Ces facteurs environnementaux sont notamment sources d'inflammation hépatique. Associés à une prédisposition génétique, ils augmenteraient donc le risque de développement de l'HAI.

## 2. Les caractéristiques immunologiques et cellulaires de l'hépatite auto-immune

Bien que l'étiologie précise de l'HAI n'ait pas encore été élucidée, certaines caractéristiques immunologiques, humorales et cellulaires, impliquées dans la pathogenèse de l'HAI ont été identifiées.

### 2.1. Les auto-anticorps

Tout d'abord, l'HAI se caractérise par une importante production d'auto-anticorps. Ces anticorps peuvent être spécifiques des sous-types d'HAI (ANA, SMA et anticorps anti-SLA pour l'HAI-1, anticorps anti-LKM-1 et anticorps anti-LC-1 pour l'HAI-2) ou communs aux deux formes d'HAI et à d'autres maladies auto-immunes (Tableau 3).

Les anticorps anti-SLA, aussi appelés anticorps anti-SLP (*soluble liver pancreas* en anglais), sont très spécifiques de l'HAI mais ne sont détectés que chez 15 à 30% des patients atteints d'HAI-1 [156]. De plus, les anticorps anti-SLA, ainsi que les anticorps anti-lipoprotéine membranaire spécifiques du foie (*liver-specific membrane lipoprotein* en anglais, LSP), les anticorps anti-récepteur à l'asialoglycoprotéine (*asialoglycoprotein receptor* en anglais, ASGPR) et les anticorps anti-alcool déshydrogénase (ADH) sont corrélés avec la sévérité de la maladie [149].

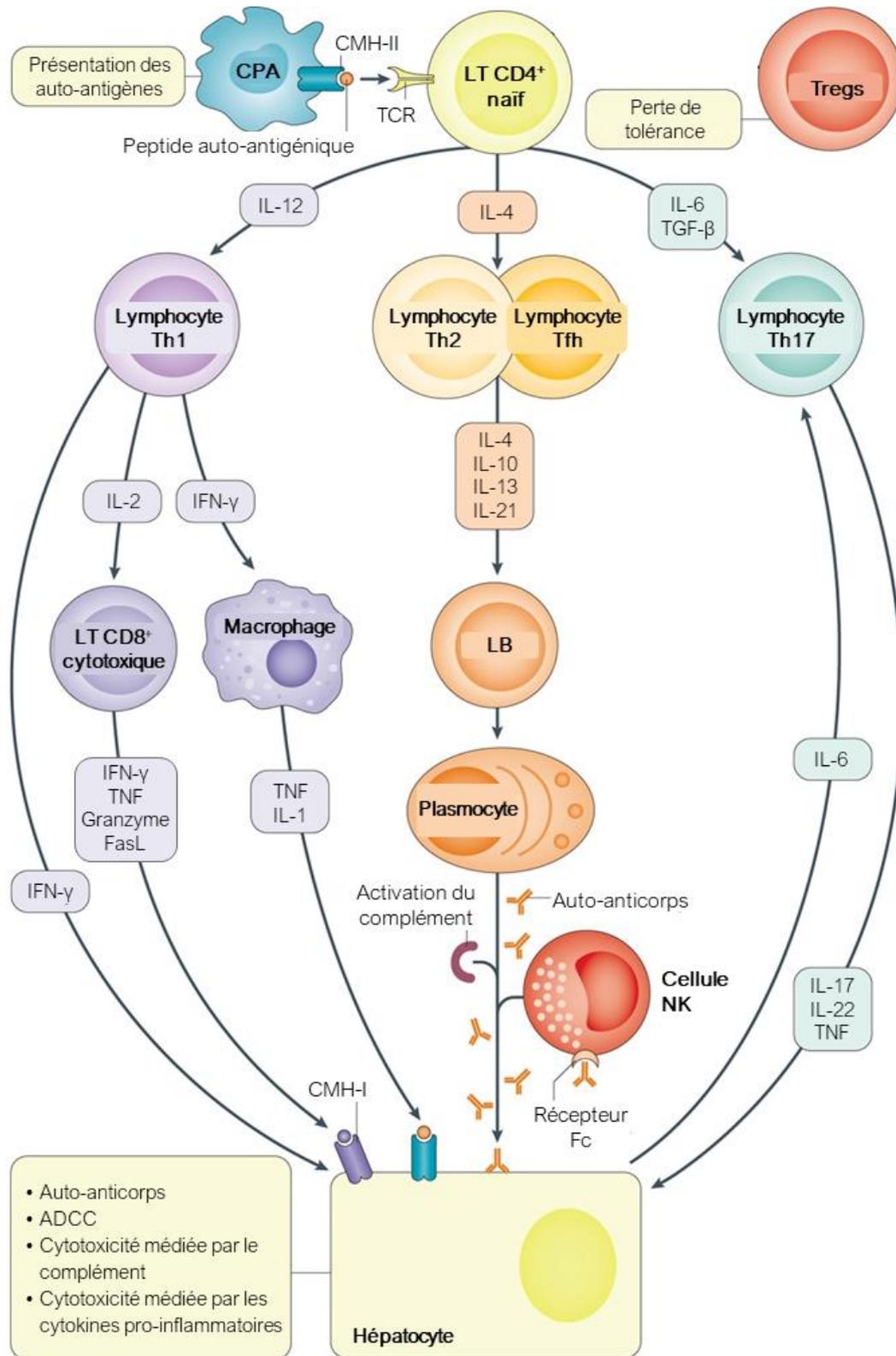
Enfin, dans des expériences *in vitro*, il a été montré que les hépatocytes isolés de patients atteints d'HAI sont recouverts d'IgG. Or, ceci est associé avec un risque accru d'ADCC pouvant alors induire des dommages hépatiques [157,158].

## 2.2. L'infiltration lymphocytaire hépatique

Une autre caractéristique principale de l'HAI, élément clé du diagnostic, est l'hépatite d'interface (Figure 15). L'hépatite d'interface se caractérise par un infiltrat inflammatoire constitué de nombreuses cellules immunitaires, dont en majorité des LT CD4<sup>+</sup> mais également des LT CD8<sup>+</sup>, LB, plasmocytes et monocytes, présentes autour des veines portes hépatiques, au contact du parenchyme hépatique. Cette hépatite d'interface est également souvent associée à une importante fibrose hépatique.

La prépondérance de LT CD4<sup>+</sup> dans l'infiltrat lymphocytaire hépatique de l'hépatite d'interface ainsi que la prédisposition génétique affectant les allèles DRB1 codant pour des molécules de CMH-II et leur capacité à induire l'activation et la différenciation des LB en plasmocytes producteurs d'(auto-)anticorps font des LT CD4<sup>+</sup> des acteurs clés de la pathogénèse de l'HAI. Le rôle de ces cellules sera détaillé plus précisément dans la partie « 3. Le rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans l'hépatite auto-immune ».

Les LT CD8<sup>+</sup>, bien que présents en plus faible quantité dans l'infiltrat hépatique, semblent activés chez les patients atteints d'HAI. En outre, la proportion de FasL et de granzyme B, molécules clés pour la cytotoxicité induite par les LT CD8<sup>+</sup>, est augmentée dans le foie des patients [159]. Notre équipe a par ailleurs identifié une population de LT CD8<sup>+</sup> CD161<sup>+</sup> non MAIT (*mucosal associated invariant T cells* en anglais) augmentée dans le sang des patients et présentant une forte production de granzyme B [160]. Récemment, une autre catégorie de LT CD8<sup>+</sup> a été identifiée comme augmentée chez les patients atteints d'HAI, il s'agit des lymphocytes T<sub>RM</sub> CD8<sup>+</sup> (CD69<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>) [161]. L'augmentation en fréquence de ces lymphocytes résidents des tissus est par ailleurs corrélée avec la sévérité de la maladie. Toutefois, les LT CD8<sup>+</sup> semblent jouer un rôle secondaire dans la pathogénèse de l'HAI fortement imputable aux LT CD4<sup>+</sup>. Dans les étapes précoces de son développement, l'activation des réponses cytotoxiques des LT CD8<sup>+</sup> suivrait l'activation des LT CD4<sup>+</sup> [162,163]. Mieli-Vergani *et al.* a par ailleurs très bien résumé le rôle général et prédominant des LT CD4<sup>+</sup> dans la pathogénèse de l'HAI [154] (Figure 17).



**Figure 17 : Le rôle précurseur des LT CD4<sup>+</sup> dans la pathogenèse de l'hépatite auto-immune.** Chez des individus prédisposés génétiquement, des facteurs environnementaux, tels que le mimétisme moléculaire, favorisent la présentation d'auto-antigènes aux LT CD4<sup>+</sup> naïfs auto-réactifs. Ces derniers se différencient en lymphocytes Th1, Th2, Tfh et Th17. Ils vont alors provoquer l'activation de LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et macrophages et la différenciation de LB en plasmocytes producteurs d'auto-anticorps. L'ensemble de ces cellules participe à la lyse des hépatocytes via une cytotoxicité dépendante des anticorps, des cellules NK, du complément et des cytokines pro-inflammatoires. Adapté de *Mieli-Vergani et al., Nat. Rev. Dis. Primers, 2018.*

### 2.3. Les modifications des cellules non-parenchymateuses

Chez les patients, l'implication des NPC (cellules non-parenchymateuses) dans l'HAI et inversement, l'effet de l'HAI sur ces cellules, ont été peu étudiés. Ces cellules sont résidentes du foie. Or, la difficulté d'obtention de biopsies hépatiques rend leur étude difficile chez les patients. De plus, l'éthique impose un frein à l'obtention de biopsies hépatiques provenant d'individus sains, limitant de fait la comparaison de ces cellules entre un environnement sain et un environnement auto-immun hépatique. Enfin, le faible nombre de ces cellules dans les biopsies restreint la possibilité de réaliser des tests fonctionnels à partir de ces cellules.

Toutefois, malgré ces difficultés, l'utilisation de techniques de microscopie, à partir de biopsies hépatiques provenant de patients, a permis l'observation d'une altération de la barrière fenestrée du sinusoiïde hépatique chez les patients atteints d'HAI [164,165]. Les LSEC (cellules endothéliales des sinusoiïdes hépatiques) ont une morphologie anormale, montrant un gonflement de ces cellules et des lésions dégénératives [165]. La barrière endothéliale présente une défenestration, c'est-à-dire une perte des fenestrations conduisant à la formation d'un endothélium continu [164,165]. Cette défenestration pourrait être associée à la présence d'anticorps anti-LSEC chez les patients [164]. L'observation en microscopie de biopsies hépatiques provenant de patients montre des dépôts d'immunoglobulines associés aux LSEC [164]. De plus, l'incubation *in vitro* de LSEC primaires avec des fragments F(ab')<sub>2</sub> d'anticorps anti-LSEC provenant de sérum de patients entraîne l'augmentation de marqueurs associés aux endothéliums vasculaires, tels que CD31, et également une production de fibronectine, de laminine et de collagène de type IV [164]. Ainsi, la présence d'anticorps anti-LSEC chez les patients pourrait contribuer à l'altération de la barrière endothéliale des sinusoiïdes hépatiques et contribuer à l'altération des fonctions hépatiques chez les patients en empêchant le transfert bidirectionnel de molécules du sinusoiïdes hépatiques vers les hépatocytes, et inversement (voir Partie 2, « 1.1. L'anatomie hépatique »).

La morphologie des KC (cellules de Kupffer) semble également modifiée chez les patients atteint d'HAI, avec notamment un élargissement de ces cellules [165]. Les KC présentent en outre des corps hyalins, ou corps de Mallory (agrégats de filaments de cytokératine dans le cytoplasme), observables en histologie et pouvant servir de marqueur diagnostique [166–168]. De plus, l'analyse de biopsies par immunofluorescence a montré l'augmentation des marqueurs VAV1 et PAK1 à la surface des KC associée à la progression de la maladie [169].

Ces molécules peuvent notamment jouer un rôle dans la régulation de processus cellulaires tels que le réarrangement du cytosquelette d'actine ou encore la mobilité, or ces fonctions peuvent être impliquées dans l'internalisation et la présentation antigénique. Ainsi, les modifications intracellulaires et l'augmentation des molécules VAV1 et PAK1 à la surface des KC suggèrent une probable altération de leur fonction présentatrice d'antigène chez les patients atteints d'HAI, limitant leur capacité d'induction de tolérance.

Enfin, chez les patients, l'hépatite d'interface est souvent associée à une fibrose hépatique. Or, les HSC (cellules hépatiques étoilées) ont été montrées comme importantes dans le développement de la fibrose [28]. En outre, chez les patients atteints d'HAI, le nombre de HSC augmente et ces cellules présentent un profil activé [170,171]. Les biopsies hépatiques montrent une fibrose associée à la présence de fibres de collagènes adhérant aux HSC [165,171]. Ainsi, les HSC semblent être des acteurs centraux de la fibrose hépatique induite dans l'HAI.

Par conséquent, chez les patients atteints d'HAI, il semble s'opérer une modification de la composante NPC avec un changement de morphologie de ces cellules ainsi qu'une altération de leur fonction. Ceci pourrait provoquer une perte des propriétés d'induction de tolérance de ces cellules (voir Partie 2, « 2.1. Les cellules hépatiques pro-tolérologènes ») et participer à la pathogenèse de l'HAI. En revanche, il n'est pas encore clair si les modifications de la composante NPC participent au déclenchement de l'HAI ou si celles-ci sont plutôt une conséquence du développement de la pathologie.

#### 2.4. La réactivité antigénique

Bien que les LT CD4<sup>+</sup> aient été identifiés comme des acteurs majeurs de l'HAI, peu d'informations sont disponibles sur la réactivité antigénique de ces cellules. À ce jour, le seul auto-antigène spécifique de l'HAI-1 identifié est la protéine SepSecs (ou SLA), cible des auto-anticorps anti-SLA, seuls auto-anticorps spécifiques de l'HAI [172]. La présence de ces auto-anticorps chez les patients est associée avec une forme plus agressive de la pathologie [173]. Mix *et al.* ont identifié deux épitopes immuno-dominants de SLA reconnus par les LT CD4<sup>+</sup> : SLA<sub>186-197</sub> et SLA<sub>373-386</sub>, induisant la production d'IFN- $\gamma$  par les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques [174]. Récemment, notre équipe a identifié un nouvel épitope immuno-dominant de SLA, SLA<sub>81-100</sub> [175]. Grâce à l'utilisation d'un test de réactivité antigénique couplé à un

protocole d'enrichissement en cellules CD154<sup>+</sup> (molécule exprimée par les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques rapidement après la stimulation TCR [176]), une nouvelle population unique de LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques a été caractérisée, présente seulement chez les patients atteints d'HAI ayant des auto-anticorps anti-SLA. Ces lymphocytes auto-réactifs ont un profil pro-inflammatoire, producteur d'IFN- $\gamma$ , et participent à la fonction des LB, via la production d'IL-21 [175]. L'article associé à l'identification de ces cellules est présenté en annexe de ce manuscrit et leurs caractéristiques sont détaillées dans la partie « 3.1.1. L'enrichissement en LT CD4<sup>+</sup> pathogéniques ».

Dans l'HAI-2, deux auto-antigènes spécifiques du foie ont été identifiés : CYP2D6 [177] et la formiminotransférase cyclodésaminase (FTCD) [178]. Ces molécules sont toutes deux exprimées dans les hépatocytes.

Plusieurs auto-épitopes de CYP2D6 ont été identifiés et sont reconnus par les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> mais également par les LB (production d'anticorps anti-LKM-1), en particulier 61 peptides chevauchants sont impliqués dans la reconnaissance T [177,179,180]. Par ailleurs, il a été montré que les réponses T polyclonales spécifiques de CYP2D6 sont corrélées avec la sévérité de l'HAI [181,182]. Les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques de CYP2D6 sont biaisés vers un profil pro-inflammatoire sécréteur d'IFN- $\gamma$  [181,182].

FTCD est quant à lui reconnu par les anticorps anti-LC-1 [178]. La réponse dirigée contre FTCD est également polyclonale [183]. Plusieurs épitopes de FTCD sont reconnus par les anticorps anti-LC-1 : FTCD<sub>428-434</sub> et FTCD<sub>440-447</sub> [184].

La présence d'auto-anticorps dirigés contre ces auto-antigènes et l'identification d'épitopes reconnus par les LB et les LT supposent le développement d'une réponse B qui est dépendante des LT CD4<sup>+</sup>. Or, cette réponse est restreinte à une spécificité antigénique du LB et du LT CD4<sup>+</sup>. Ces études suggèrent donc un rôle prépondérant des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques auto-réactifs dans la pathogénèse de l'HAI, promoteurs de la production d'auto-anticorps par les LB. Ces cellules présentent un profil pro-inflammatoire, notamment via la production d'IFN- $\gamma$ .

### 3. Le rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans l'hépatite auto-immune

Plusieurs études se sont intéressées au rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans la pathogenèse de l'HAI chez les patients. De plus, afin de comprendre leur implication dans les événements précoces d'apparition de la pathologie, des modèles murins d'HAI ont été développés. L'étude du rôle de ces cellules, à la fois chez les patients mais également dans les modèles murins, a fait l'objet d'une revue, présentée en annexe de ce manuscrit [144].

#### 3.1. Les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients

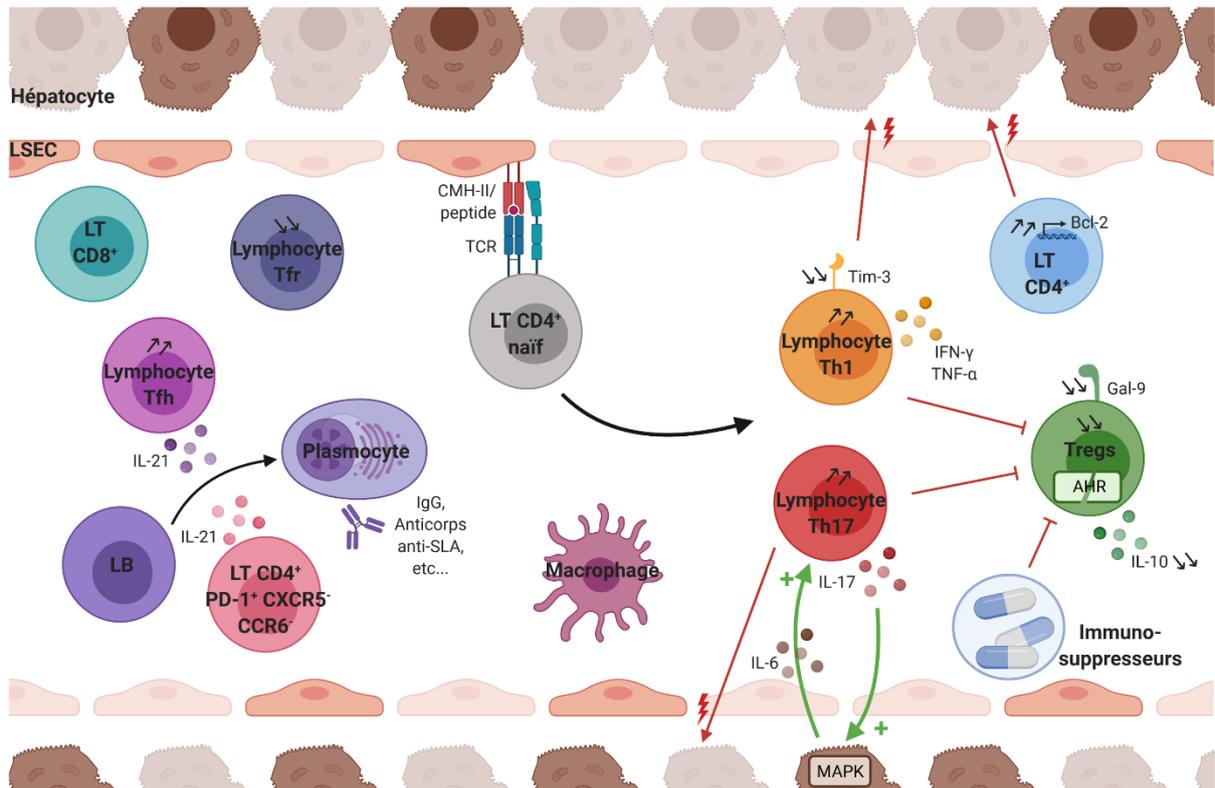
Diverses sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> semblent impliquées dans la pathogenèse de l'HAI, tant pathogéniques (lymphocytes Th1, lymphocytes Th17, lymphocytes Tfh) que régulatrices (Tregs).

##### 3.1.1. L'enrichissement en LT CD4<sup>+</sup> pathogéniques

Parmi les LT CD4<sup>+</sup> infiltrant le foie, les fréquences en lymphocytes Th1 et Th17 ainsi que leurs cytokines associées (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) sont augmentées chez les patients atteints d'HAI [185–187]. De plus, Liang *et al.* ont montré que la fréquence en lymphocytes Th1 et Th17 était négativement corrélée avec le taux de Tregs [187]. Des expériences de culture *in vitro* ont montré que les lymphocytes Th17, via leur production d'IL-17, pourraient induire une boucle de rétrocontrôle positive qui, en stimulant la production d'IL-6 par les hépatocytes, stimulerait en retour leur prolifération [188]. Bovensiepen *et al.* ont constaté l'enrichissement en LT CD4<sup>+</sup> producteurs de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  dans le foie et le sang de patients atteints d'HAI [186]. Or, ces cytokines sont des cytokines clés produites par les lymphocytes Th1. De plus, la stimulation antigène-spécifique *in vitro* de cellules mononucléées sanguines périphériques (*peripheral blood mononuclear cells* en anglais, PBMC) provenant de patients atteints d'HAI présentant des anticorps anti-SLA, via l'utilisation de l'auto-antigène SLA, entraîne l'augmentation significative de la production de TNF- $\alpha$ , suggérant un rôle prépondérant des lymphocytes Th1 producteurs de TNF- $\alpha$  dans l'HAI [186]. Ces données montrent que les lymphocytes Th1 et Th17, tous deux de type pro-inflammatoire, sont des acteurs clés de la pathogenèse de l'HAI, notamment via la production de cytokines pro-inflammatoires entretenant l'inflammation et l'activation du système immunitaire (Figure 18).

Récemment, notre équipe a mis en évidence chez des patients présentant des auto-anticorps anti-SLA des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques au profil pro-inflammatoire/pro-B, spécifiques de l'auto-antigène SLA [175]. Ils présentent un phénotype caractéristique CD45RA<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>. La présence de ces cellules corrèle avec l'activité de la maladie et ces cellules persistent en phase de rémission. Ces lymphocytes auto-réactifs sont capables de soutenir les fonctions des LB, en participant notamment à la différenciation des LB en plasmocytes via la production d'IL-21, et présentent une signature transcriptomique pro-inflammatoire, *IFNG* et *TNF* (Figure 18). Elles représentent le réservoir principal des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients présentant des auto-anticorps anti-SLA. Toutefois, de manière surprenante, ces LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques expriment des gènes associés à des récepteurs impliqués dans l'immuno-régulation, tels que *TIGIT*, *CTLA4*, *CD109* ou encore *NR3C1*, pouvant être induits en réponse à une stimulation antigénique chronique.

Cette population cellulaire unique partage des similarités avec les lymphocytes Tfh, notamment dans sa capacité à soutenir la différenciation B via la production d'IL-21. Or, chez les patients atteints d'HAI, la circulation sanguine est enrichie en lymphocytes Tfh et appauvrie en lymphocytes Tfr (*follicular regulatory T cells* en anglais), pendant des lymphocytes Tfh, inhibiteurs de la production d'anticorps par les LB [189–191]. Le déséquilibre entre les fréquences de lymphocytes Tfh et Tfr pourrait être à l'origine de l'hypergammaglobulinémie et de la production d'auto-anticorps observées chez les patients, en favorisant la production d'anticorps par les plasmocytes grâce aux lymphocytes Tfh (Figure 18). Toutefois, à l'inverse des LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques présentés précédemment, aucune spécificité antigénique des lymphocytes Tfh n'a été observée chez les patients. De plus, les LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques bien qu'ayant un rôle pro-B diffère d'une population lymphocytaire Tfh (CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup>), n'exprimant pas le marqueur CXCR5, mais se rapproche d'une population Tph (*peripheral T helper cells* en anglais, lymphocyte T auxiliaire périphérique). Ces cellules ont été identifiées dans diverses MAI, comme la polyarthrite rhumatoïde et le lupus érythémateux disséminé, et ont la capacité d'appuyer l'activation des LB et la production d'auto-anticorps [192–195]. Elles peuvent être présentes précocement dans l'évolution de la maladie, ce qui suggère un rôle pathogénique de ces cellules, et la présence de ces cellules semble être associée à un risque de progression de la pathologie [196].



**Figure 18 : Le rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans l'HAI mis en évidence chez les patients.** Les patients présentent un infiltrat hépatique composé de LT CD4<sup>+</sup>, de LT CD8<sup>+</sup>, de LB et de macrophages. Le déséquilibre des fréquences entre lymphocytes Tfh (augmentée) et Tfr (diminuée) et la présence de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> producteurs d'IL-21 favorisent la production d'IgG et d'auto-anticorps par les plasmocytes. La fréquence en lymphocytes Th1 et Th17 augmente favorisant l'inhibition de la fonction suppressive des Tregs et la destruction du parenchyme hépatique via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17). L'apoptose des LT CD4<sup>+</sup> est réduite grâce à une augmentation de leur expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et à une diminution du récepteur inhibiteur Tim-3 à leur surface. En parallèle, la fréquence en Tregs est diminuée avec une réduction de l'expression de Gal-9 et une altération de la voie de signalisation AHR, entraînant un défaut de fonction. Les traitements immunosuppresseurs participent à altérer la quantité et les fonctions des Tregs.

### 3.1.2. Le défaut de régulation des LT CD4<sup>+</sup>

Les Tregs sont capables de limiter l'activation des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs [197]. Toutefois, à l'inverse de l'enrichissement en lymphocytes Th1 et Th17, la fréquence en Tregs semble diminuée dans le sang chez les patients atteints d'HAI [187,198]. En plus d'un défaut quantitatif, ces Tregs montreraient un défaut qualitatif avec une capacité d'expansion diminuée et une diminution de leur capacité à inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 et d'IL-17 par les lymphocytes Th17 [198–200]. Liberal *et al.* ont par ailleurs montré une diminution de la production d'IL-10 par les Tregs du fait d'une désensibilisation à l'IL-2, et l'incapacité de ces Tregs à inhiber la prolifération des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs [201] (Figure 18). Toutefois, des controverses existent concernant les défauts quantitatif et qualitatif des Tregs

chez les patients atteints d'HAI. Certaines études ont montré une fréquence en Tregs normale dans le sang ainsi que des fonctions non altérées de ces cellules [202,203]. Ces divergences semblent principalement dues aux différents phénotypes utilisés pour caractériser les Tregs et aux traitements immunosuppresseurs prescrits aux patients non pris en compte dans les analyses. L'étude des Tregs dans le foie chez les patients est plus complexe que dans le sang du fait de la disponibilité en biopsie hépatique moindre par rapport aux PBMC sanguines. Toutefois, certaines études ont pu montrer que le foie des patients atteints d'HAI, grâce à des techniques d'immunohistochimie ou d'immunofluorescence, présentait une forte expression de FoxP3 mais que celle-ci diminuait au cours du traitement immunosuppresseur [163,203–205]. Ainsi, lors des phases initiales de la pathologie, un recrutement massif en Tregs semble s'opérer dans le foie [163,205], probablement afin de contrôler la réponse T auto-réactive, puis les différents traitements immunosuppresseurs pris par les patients semblent affecter la fréquence en Tregs dans le foie [163] (Figure 18).

En plus du déséquilibre en Tregs, une perturbation des voies de signalisation de régulation des réponses immunes apparaît également chez les patients. Yachida *et al.* ont observé une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 par les LT CD4<sup>+</sup> provenant du sang et du foie des patients, suggérant une apoptose réduite des LT CD4<sup>+</sup> chez les patients [206]. De même, Liberal *et al.* ont constaté une altération de la voie de régulation immune Gal-9/Tim-3 avec une diminution de l'expression de Gal-9 sur les Tregs et de l'expression de Tim-3 sur les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs, contribuant ainsi au développement de l'HAI en inhibant l'activité suppressive des Tregs vis-à-vis des lymphocytes Th1 [207] (Figure 18). De plus, l'enrichissement en IL-17 observé chez les patients inhiberait la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en Tregs [208] et l'environnement inflammatoire empêcherait la différenciation de lymphocytes à profil Th1/Th17 en lymphocytes régulateurs de type Tr1 [209]. Vuerich *et al.* ont montré une altération de la voie de signalisation AHR (*aryl hydrocarbon receptor* en anglais) induisant un défaut de fonction suppressive des Tregs et une résistance des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs à l'immuno-régulation, associée à l'inhibition de l'augmentation de l'expression de la molécule régulatrice CD39 [210] (Figure 18).

En résumé, d'après les données obtenues chez les patients, il semblerait que la pathogenèse de l'HAI passe par un enrichissement en lymphocytes pro-inflammatoires, principalement de type Th1, ainsi qu'en lymphocytes pro-B, de type Tfh ou Tph, associé à un défaut d'immuno-régulation (Figure 18).

### 3.2. L'implication des LT CD4<sup>+</sup> dans les modèles murins

Bien que diverses sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> aient été montrées comme modulées chez les patients atteints d'HAI (lymphocytes Th1, Th17, Tfh, Tregs), leur implication dans les événements précoces de la maladie, et notamment son initiation, n'a pu être étudiée chez les patients. C'est pourquoi divers modèles murins d'HAI ont été développés au fil des années.

Avant l'identification des auto-antigènes ciblés dans l'HAI-2, un modèle murin de référence de l'HAI, non basé sur la reconnaissance antigène-spécifique, a été mis au point : le modèle concanavale A (ConA). Par la suite d'autres modèles non basés sur la reconnaissance antigène-spécifiques ont été développés et s'intéressent aux voies de signalisation potentiellement impliquées dans l'HAI : les modèles de déficience génétique NTxPD-1<sup>-/-</sup> et TAM<sup>-/-</sup>. Puis des modèles de souris TCR transgéniques ont permis d'étudier la réactivité des cellules antigène-spécifiques vis-à-vis de l'expression hépatique d'un antigène. Enfin, la découverte des auto-antigènes cibles CYP2D6 et FTCD de l'HAI-2 a permis le développement de modèles d'immunisation spécifiques de l'HAI.

#### 3.2.1. Les modèles sans spécificité antigénique

L'un des premiers modèles murins d'HAI mis au point est celui de la ConA. La ConA est une lectine d'origine végétale capable de se lier aux résidus sucrés à la surface des cellules. Elle est capable de se lier à des cellules bactériennes, végétales ou encore celles de mammifères et peut stimuler la prolifération des LT ainsi que leur sécrétion de cytokines et leur capacité à induire de la cytotoxicité [211].

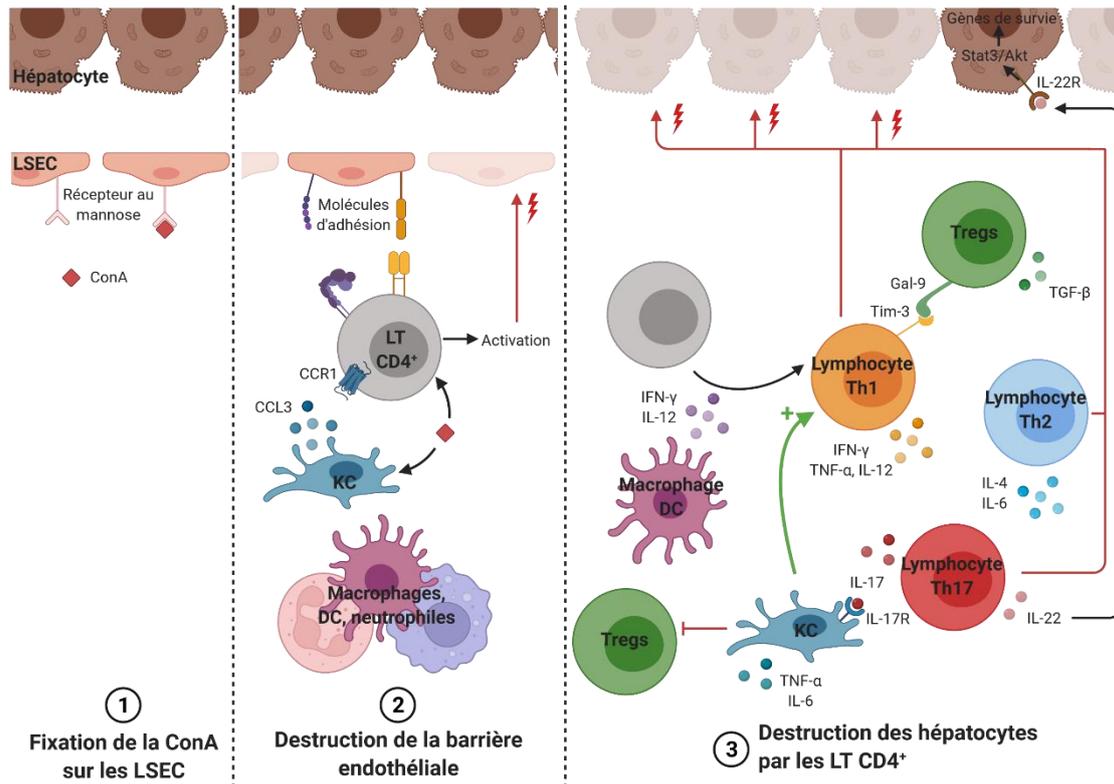
Le modèle ConA a été développé par Tiegs *et al.* en 1992 [211]. L'équipe a injecté de la ConA en intraveineuse à des souris Balb/c mâles et a observé une augmentation des transaminases ASAT/ALAT associée à des dommages hépatiques (lésions inflammatoires, apoptose des hépatocytes) conduisant à une insuffisance hépatique [211,212]. En outre,

l'équipe a pu observer une tempête cytokinique, marquée par l'augmentation des taux d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-2, et une infiltration lymphocytaire hépatique massive [211–213].

D'un point de vue mécanistique, la ConA se fixe rapidement sur les LSEC via des récepteurs au mannose, environ 15 minutes après son injection [214] (Figure 19). Elle entraîne l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des LSEC, telles que la P-sélectine, la E-sélectine, ICAM-1 ou encore VCAM-1, favorisant l'arrêt des LT CD4<sup>+</sup> dans le sinusoiide hépatique [215–217]. Ajuebor *et al.* ont montré que le recrutement des LT CD4<sup>+</sup> dépendait de la voie CCL3/CCR1 [218] et Okamoto *et al.* ont montré que les KC peuvent sécréter des chimiokines CCL3 en réponse à la ConA [219]. Huit heures après l'injection de la ConA, la barrière endothéliale des sinusoides hépatiques est détruite permettant un accès direct des LT, présents dans les sinusoides hépatiques, aux hépatocytes conduisant à la dégradation hépatocytaire [211,214] (Figure 19).

Comme chez les patients atteints d'HAI, les LT CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans le modèle ConA. Seule la déplétion des LT CD4<sup>+</sup>, et non celle des LT CD8<sup>+</sup>, empêche le développement d'une hépatite montrant ainsi que l'hépatite provoquée par la ConA passe par un mécanisme dépendant des LT CD4<sup>+</sup> [211,212]. De façon plus détaillée, différentes sous-populations de LT CD4<sup>+</sup> sont impliquées dans cette hépatite (Figure 19).

La ConA peut induire l'activation des LT indépendamment de la reconnaissance antigénique. Injectée en i.v., elle induit une tempête cytokinique marquée par l'augmentation des taux d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , or ces cytokines sont caractéristiques des lymphocytes Th1. Par ailleurs, le blocage de ces deux cytokines empêche la mise en place d'une hépatite [213,220]. De plus, l'IFN- $\gamma$  est une cytokine clé pour la différenciation Th1, tout comme l'IL-12. Cette dernière est produite par les monocytes, macrophages et DC et son blocage empêche le développement de l'hépatite provoquée par la ConA et neutralise la production de cytokines Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) et Th2 (IL-4, IL-6). À l'inverse, l'injection *in vivo* d'IL-12 exacerbe l'hépatite augmentant les dommages hépatiques et les taux plasmatiques de cytokines Th1 et Th2 [221,222]. De la même manière, l'injection *in vivo* d'IL-4 accroît l'hépatite alors que le blocage de cette cytokine l'inhibe [223].



**Figure 19 : Le modèle ConA.** Après son injection, la ConA se fixe rapidement aux récepteurs au mannose à la surface des LSEC. Ceci conduit à l'activation des LT CD4<sup>+</sup> naïfs et à la destruction de la barrière endothéliale, rendant les hépatocytes directement accessibles aux LT activés. Ces derniers se différencient en lymphocytes Th1, Th2 et Th17. Ils vont alors sécréter une variété de cytokines et induire la destruction du parenchyme hépatique. Toutefois, les Tregs vont inhiber l'activité de ces LT effecteurs et induire leur apoptose, participant ainsi à l'atténuation de l'hépatite.

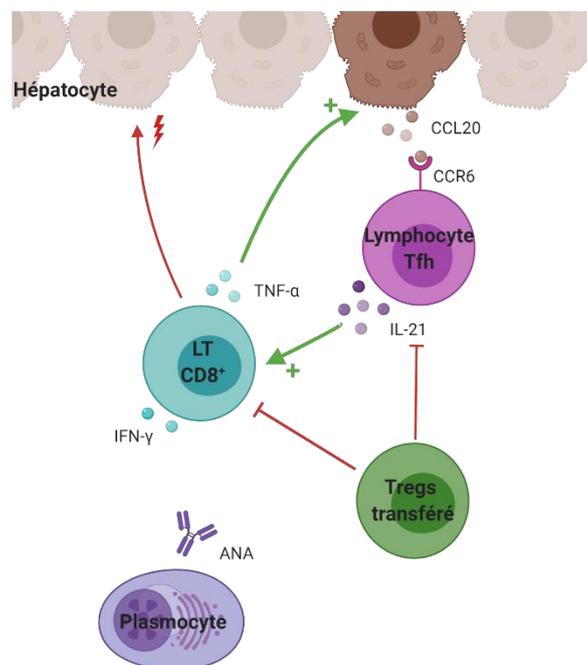
Associés aux lymphocytes Th1, les lymphocytes Th17 participent également à l'hépatite dans le modèle ConA. Après l'injection de ConA, la fréquence en lymphocytes Th17 s'accroît dans le foie, la production d'IL-17 par les LT CD4<sup>+</sup> est augmentée et les KC montrent une forte expression du récepteur à l'IL-17 (IL-17R) à leur surface [224]. Le blocage de l'IL-17 réduit les dommages causés par la ConA, avec une diminution du taux d'ASAT/ALAT, de TNF-α et d'IL-6, alors que l'administration d'IL-17 entraîne l'aggravation de l'hépatite [224]. De même, le blocage de Tim-3 dans le modèle ConA provoque une augmentation de la fréquence en lymphocytes Th17, suggérant un rôle de la voie Tim-3/Gal-9 dans la régulation de l'activation des lymphocytes Th17 [225]. Tout comme l'IL-17, les lymphocytes Th17 sécrètent également de l'IL-22. Contrairement à l'IL-17, l'IL-22 semble avoir un rôle protecteur vis-à-vis de l'hépatite. Zenewicz *et al.* ont montré que les souris déficientes en IL-22 étaient plus sensibles à l'hépatite provoquée par la ConA que des souris sauvages [226]. L'IL-22 active la voie STAT3/Akt dans les hépatocytes et conduit à l'induction de gènes de survie dans ces cellules [226].

Douze heures après l'injection de la ConA, la fréquence en Tregs est diminuée puis celle-ci augmente jusqu'à 24h avec un retour à un taux basal à 48h post-injection de la ConA [227]. Wei *et al.* ont par ailleurs montré que l'injection de Tregs avant l'injection de la ConA entraînait l'inhibition de l'hépatite via la sécrétion de TGF- $\beta$  [227]. Ju *et al.* ont observé l'augmentation de l'expression de Tim-3 à la surface des LT CD4<sup>+</sup> et de Gal-9 à la surface des Tregs dans le modèle ConA [228]. Le blocage de la voie Tim-3/Gal-9 inhibe l'action suppressive des Tregs, exacerbe l'hépatite et induit l'augmentation de sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes Th1 [228,229]. À l'inverse, l'injection de Gal-9 réduit la sévérité de l'hépatite, induit l'apoptose des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs et la diminution des taux d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 [229]. La voie Tim-3/Gal-9 participe donc à limiter l'activation des LT CD4<sup>+</sup> effecteurs en induisant leur apoptose dans le modèle ConA, sans pour autant inhiber totalement leur réactivité.

Finalement, les lymphocytes Th1 et Th17 sont essentiels au développement de l'hépatite provoquée par la ConA. Toutefois, le recrutement lymphocytaire dans le foie ne dépend pas d'une reconnaissance antigénique mais est le résultat de l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des LSEC et de molécules impliquées dans la migration cellulaire, telles que CCL3/CCR1. De plus, la ConA active les fonctions des LT, notamment la sécrétion de cytokines, de manière non-antigène-spécifique. Enfin, les Tregs semblent jouer un rôle important dans l'inhibition de la réponse immune dans ce modèle en induisant l'inhibition de l'activation et l'apoptose des lymphocytes Th1 via la voie Tim-3/Gal-9 (Figure 19). Ainsi, l'hépatite n'est que transitoire et non chronique comme dans l'HAI. Les mécanismes non-antigène-spécifiques et la non-chronicité de ce modèle en font un modèle d'HAI imparfait, relevant plutôt d'un modèle d'inflammation hépatique fulgurante s'avérant utile pour le développement de molécules thérapeutiques lors d'essais pré-cliniques.

Deux autres modèles murins d'HAI non basés sur la reconnaissance antigénique ont été développés. Ces modèles sont basés sur la déficience génétique affectant des voies de régulation de la réponse immune : le modèle NTxPD-1<sup>-/-</sup> et le modèle TAM<sup>-/-</sup>.

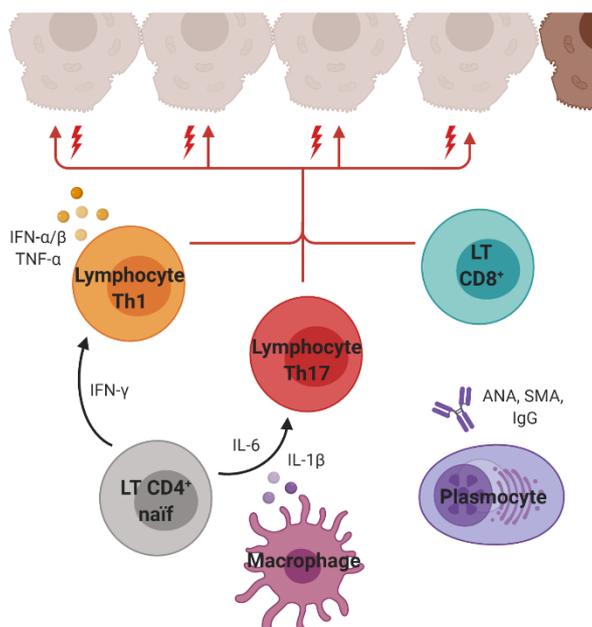
Le modèle NTxPD-1<sup>-/-</sup> a été développé par Kido *et al.* en 2008 [230]. Ce modèle consiste en une thymectomie néonatale chez des souris déficientes pour le gène codant pour PD-1. Il permet d'étudier d'une part le rôle des Tregs naturels et d'autre part le rôle de la voie de régulation PD-1/PD-L1 dans le développement de l'HAI. Après 2 semaines, l'équipe observe une hépatite fatale avec une augmentation des taux d'ASAT/ALAT, une infiltration hépatique massive par des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup>, une nécrose lobulaire importante et la présence d'ANA. Dans ce modèle, la thymectomie seule entraîne une diminution de la fréquence en Tregs dans la rate. En revanche, la thymectomie seule ou la déficience en PD-1 seule ne permettent pas l'induction d'une hépatite, il est nécessaire d'associer ces deux délétions afin d'induire une HAI chez les souris. Chez les souris NTxPD-1<sup>-/-</sup>, l'infiltrat hépatique est principalement composé de LT CD8<sup>+</sup> sécréteurs d'IFN-γ et de TNF-α, or ceci diffère de la pathologie humaine dans laquelle une prépondérance de LT CD4<sup>+</sup> dans l'infiltrat hépatique est observée. De manière étonnante, et à l'inverse du modèle ConA, le blocage de l'IFN-γ dans le modèle NTxPD-1<sup>-/-</sup> entraîne l'exacerbation de l'infiltration hépatique et une augmentation de la prolifération cellulaire [231]. Cet effet serait dû à la perte des effets anti-prolifératifs induits par l'IFN-γ sur les LT CD8<sup>+</sup> [232,233]. Bien que l'infiltrat dans ce modèle soit composé



**Figure 20 : Le modèle NTxPD-1<sup>-/-</sup>.** La thymectomie néonatale, induisant l'absence de Tregs, chez des souris déficientes pour PD-1 (NTxPD-1<sup>-/-</sup>) conduit à une hépatite fatale associée à une infiltration hépatique massive par des LT CD4<sup>+</sup> et des LT CD8<sup>+</sup> et à une production d'ANA. La voie CCR6/CCL20 induit un recrutement dérégulé de lymphocytes Tfh spléniques, exprimant CCR6, vers le foie, présentant des hépatocytes sur-exprimant CCL20. Cela conduit à l'activation de LT CD8<sup>+</sup> provoquant une destruction hépatocyttaire. Le transfert adoptif de Tregs permet d'inhiber l'activation des LT CD8<sup>+</sup>.

principalement de LT CD8<sup>+</sup>, la déplétion de ces cellules ne permet pas d'inhiber l'infiltration hépatique par les LT CD4<sup>+</sup>, alors que la déplétion des LT CD4<sup>+</sup> empêche l'infiltration hépatique par les LT CD8<sup>+</sup>, suggérant alors que l'infiltration des LT CD8<sup>+</sup> dans ce modèle est provoquée par les LT CD4<sup>+</sup> [234]. L'activation des LT CD8<sup>+</sup> est induite par l'IL-21 produite par les lymphocytes Tfh [234] (Figure 20). De ce fait, le déséquilibre en lymphocytes Tfh favorise la mise en place de l'hépatite dans ce modèle. La voie CCR6/CCL20, importante dans la migration cellulaire T, participe à la migration des lymphocytes Tfh spléniques, exprimant CCR6, vers le foie, dans lequel les hépatocytes sur-expriment CCL20, conduisant alors à l'activation des LT CD8<sup>+</sup> [234,235]. De plus, le TNF- $\alpha$  dans ce modèle induit une augmentation de l'expression de CCL20 par les hépatocytes, stimulant l'infiltration hépatique [235] (Figure 20). Enfin, le transfert adoptif de Tregs permet d'inhiber le développement de l'hépatite [230]. Finalement, le modèle NTxPD-1<sup>-/-</sup> met en évidence le rôle central des Tregs et de la voie PD-1/PD-L1 dans le contrôle de l'activation des lymphocytes auto-réactifs au niveau du foie (Figure 20).

Le modèle TAM<sup>-/-</sup> repose sur la déficience en Tyro3, Axl et MERTK, trois récepteurs tyrosine kinase. Ces récepteurs jouent un rôle dans la régulation de la réponse immune via l'élimination des débris apoptotiques, le contrôle des cascades de signalisation cytokiniques et l'inhibition des voies de signalisation TLR [236]. Tyro3 est exprimé à la surface des KC, Axl sur les KC, LSEC et hépatocytes et enfin Mer est exprimé sur les KC et LSEC [237]. Les souris TAM<sup>-/-</sup> montrent dans le foie une importante inflammation, nécrose et infiltration cellulaire, avec une augmentation des taux d'ASAT/ALAT et la présence d'ANA, SMA et de hauts taux d'IgG [237]. L'infiltration hépatique est composée principalement de LT CD4<sup>+</sup>, mais également de LT CD8<sup>+</sup> et de macrophages. En accord avec la capacité des récepteurs TAM à inhiber les réponses inflammatoires, les souris TAM<sup>-/-</sup> montrent une augmentation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ , suggérant un rôle des lymphocytes Th1 et Th17 dans l'initiation de l'HAI dans ce modèle [237] (Figure 21). Ainsi, il apparaît que les récepteurs TAM pourraient jouer un rôle dans l'inhibition du développement de l'HAI en inhibant les réponses Th1 et Th17.



**Figure 21 : Le modèle TAM<sup>-/-</sup>.** Les souris TAM<sup>-/-</sup> présentent un infiltrat hépatique composé de LT CD4<sup>+</sup>, de LT CD8<sup>+</sup> et de macrophages ainsi qu'un taux sérique important d'ANA, SMA et d'IgG. Dans ces souris, les LT CD4<sup>+</sup> naïfs se différencient en lymphocytes Th1 et Th17. Ces cellules sont impliquées dans la destruction du parenchyme hépatique soulignant le rôle des récepteurs TAM dans l'inhibition de leur réactivité.

Finalement, les modèles NTxPD-1<sup>-/-</sup> et TAM<sup>-/-</sup>, plutôt que des modèles d'HAI, sont des modèles intéressants pour l'étude des voies de régulation impliquées dans l'inhibition de l'hépatite.

### 3.2.2. Les modèles TCR transgéniques

L'un des premiers modèles murins TCR transgéniques de l'HAI a été développé par Schott et son équipe en 2007 dans le but d'étudier la présentation antigénique et l'activation des LT dans un contexte d'auto-immunité hépatique [238] (Figure 22). Pour cela, ils ont développé un modèle murin transgénique, exprimant l'antigène OVA de manière constitutive à la surface des hépatocytes (expression sous le contrôle du promoteur hépato-spécifique transferrine), chez lequel l'expression de OVA est tolérée. Dans ce modèle, ils ont réalisé un transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de OVA provenant respectivement de souris OT-I et OT-II exprimant un TCR transgénique spécifique d'un peptide OVA présenté dans un contexte de CMH-I ou CMH-II. Ils ont alors observé une accumulation et une prolifération dans le foie seulement des LT CD8<sup>+</sup>. Les LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques ne présentaient pas de tropisme hépatique mais leur activation était induite dans la rate et le ganglion lymphatique drainant le foie. Ces données concordent avec les modèles OVA présentés dans la partie 2, « 2.2.2. La

tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie », montrant que l'activation des LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques n'était pas possible dans le foie.

Seul le transfert adoptif des LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques a conduit au développement d'une hépatite sévère mais transitoire avec une augmentation des taux d'ASAT/ALAT sériques s'accompagnant d'une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$  et des réponses cytotoxiques. Afin d'étudier le rôle des CPA hépatiques dans la présentation antigénique et l'activation des LT CD8<sup>+</sup>, ils ont développé un modèle dans lequel seuls les hépatocytes et les LSEC, et non les CPA professionnelles, sont capables de présenter OVA. Ils ont alors constaté un taux sérique d'ASAT/ALAT plus faible, suggérant une lyse hépatocytaire réduite et démontrant le rôle des CPA professionnelles dans l'activation intra-hépatique des LT CD8<sup>+</sup>. Toutefois, l'hépatite provoquée par les LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques dans ce modèle transgénique n'est que transitoire, avec une résolution s'observant dans les deux semaines suivant le transfert adoptif.

Une étude ultérieure [239] a montré que l'injection des LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques s'accompagne d'une augmentation progressive du taux de Tregs endogènes. Ces Tregs sont capables de supprimer *in vitro* la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> et d'inhiber *in vivo* le développement de l'hépatite induite par les LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques. La déplétion des Tregs provoque une amplification de l'hépatite induite par les LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques avec une augmentation de leur infiltration hépatique, de la production d'IFN- $\gamma$  et de la cytotoxicité. Toutefois, cette déplétion n'empêche pas la résolution de l'hépatite, bien que celle-ci soit plus longue, suggérant donc que d'autres mécanismes de régulation interviennent dans ce modèle.

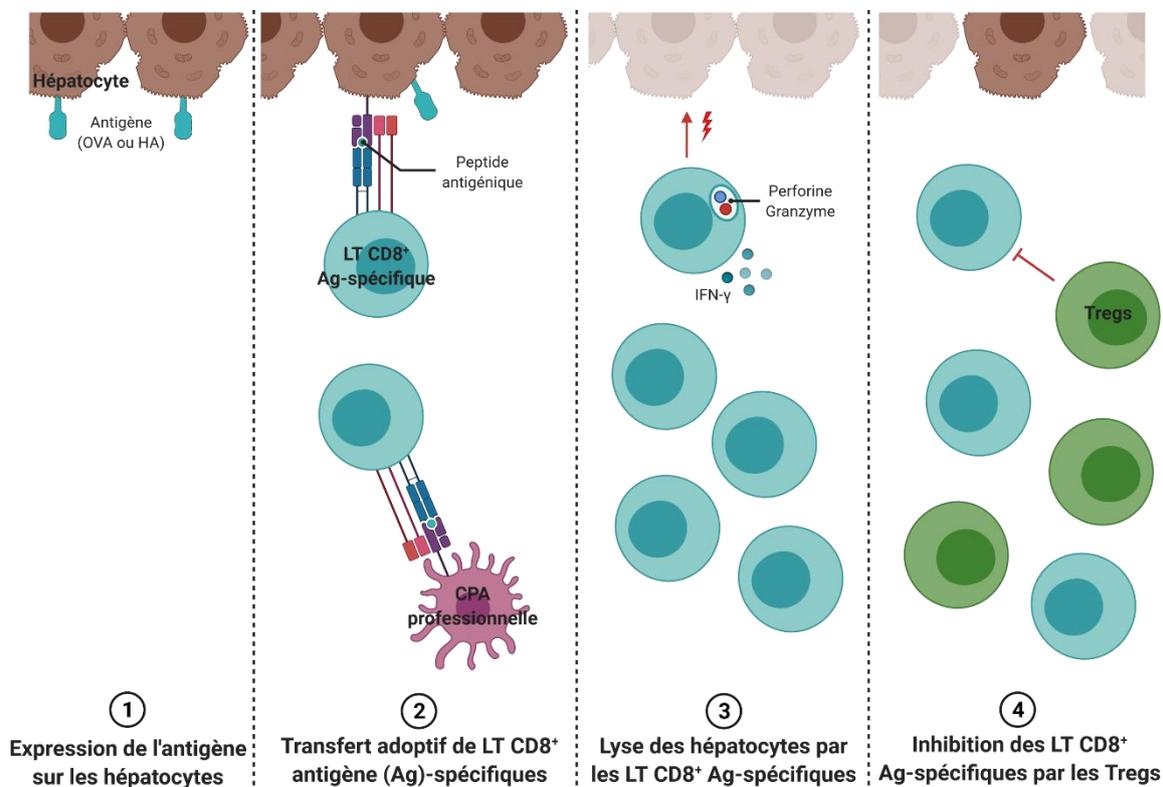
Des travaux similaires, menés par Peters et son équipe [240], ont confirmé le rôle prépondérant des LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques dans l'induction d'une hépatite chez des souris exprimant OVA à la surface des hépatocytes, avec seulement un rôle accessoire des LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques exacerbant l'hépatite causée par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques. Dans ce modèle, l'inflammation induite n'est également que transitoire, seules des injections répétées de cellules a permis la mise en place d'une hépatite chronique.

Finalement, ces modèles montrent que l'expression hépatique de l'antigène OVA permet l'activation intra-hépatique de LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques naïfs, grâce notamment aux CPA professionnelles. Cette activation conduit au développement d'une hépatite mais celle-ci n'est que transitoire, avec un rôle des Tregs et d'autres voies de régulation dans l'inhibition de la réactivité des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques.

De manière similaire au modèle OVA transgénique, un autre modèle d'hépatite induite par l'expression hépatique d'un antigène associée au transfert adoptif de cellules TCR transgéniques antigène-spécifiques a été développé, il s'agit du modèle Alb-HA [241] (Figure 22). Dans ce modèle, les souris Alb-HA expriment constitutivement l'antigène modèle hémagglutinine (HA), glycoprotéine dérivée du virus de l'Influenza, sous le contrôle du promoteur hépato-spécifique albumine. Comme pour le modèle OVA, cette expression constitutive de HA par les hépatocytes est tolérée. Le transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques, provenant de souris TCR transgéniques spécifiques de HA (souris CL4-TCR), conduit à une hépatite transitoire marquée par l'augmentation des taux sériques d'ASAT/ALAT, une infiltration hépatique contenant une majorité de LT CD8<sup>+</sup> et une nécrose, se résolvant toutefois en 2 à 3 semaines. Afin d'établir un environnement prédisposé à l'auto-immunité, ils ont croisé des souris Alb-HA avec des souris CL4-TCR et observé que les mâles développaient spontanément une hépatite chronique marquée par une inflammation, une infiltration principalement par des LT CD8<sup>+</sup> et une augmentation des taux d'ASAT/ALAT. Toutefois, dans ce modèle, les LT CD8<sup>+</sup> montrent des capacités prolifératives réduites, des fonctions effectrices altérées et une faible activité cytotoxique HA-spécifique suggérant que la majorité des LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques subissent des mécanismes de régulation amenant à un phénotype de type dysfonctionnel. De plus, ils ont observé une augmentation de la proportion de Tregs totaux chez ces souris, capables d'inhiber *in vitro* les réponses T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques. Ainsi, ce modèle souligne encore une fois l'importance des Tregs dans la régulation des réponses immunes hépatiques.

Dywicki *et al.* ont développé un modèle similaire d'induction de l'expression hépatique de l'antigène modèle HA [242] (Figure 22). Ils ont utilisé un modèle de souris transgénique présentant au locus Rosa26 (largement décrit dans la littérature pour sa capacité à induire l'expression ubiquitaire ou conditionnel d'un gène [243,244]) la séquence codante de HA précédée d'un codon stop entouré par des séquences LoxP, empêchant ainsi l'expression de HA à la surface des cellules (Rosa26-HA). L'injection i.v. d'un vecteur adénoviral, à tropisme hépatocytaire, codant pour une recombinaise Cre (Ad-Cre) permet de débloquent l'expression de HA à la surface des hépatocytes. L'infection par l'Ad-Cre a alors conduit à une hépatite mais celle-ci n'est que transitoire. Le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> (provenant de souris TCR transgéniques 6.5-TCR) et/ou CD8<sup>+</sup> (provenant de souris TCR transgéniques CL4-TCR)

HA-spécifiques associé à l'infection par l'Ad-Cre n'a pas permis d'induire une hépatite chronique. De même, et contrairement au modèle de Zierden *et al.* précédemment présenté [241], le croisement des souris Rosa26-HA avec les souris TCR transgéniques spécifiques de HA (soit 6.5-TCR, soit CL4-TCR) associé à l'injection avec l'Ad-Cre n'a pas permis non plus le développement d'une hépatite chronique. Dans ce dernier modèle, l'équipe a observé une activation et une prolifération intra-hépatique transitoire seulement des LT CD8<sup>+</sup> mais cette prolifération semble être induite par la réponse anti-adévirale et non par une réponse HA-spécifique. De plus, malgré la présence de l'antigène dans le foie, un faible taux de prolifération des LT CD8<sup>+</sup> est observé, suggérant un profil dysfonctionnel de ces cellules.



**Figure 22 : Les modèles TCR transgéniques.** L'induction de l'expression d'un antigène sur les hépatocytes est tolérée. Le transfert adoptif de LT CD8<sup>+</sup> antigène (Ag)-spécifiques provoque la reconnaissance des complexes CMH/peptide à la surface des CPA professionnelles (cellules dendritiques, macrophages, LB) et non-professionnelles telles que les hépatocytes ou les LSEC. Les LT CD8<sup>+</sup> Ag-spécifiques s'activent, prolifèrent et induisent une réponse cytotoxique provoquant une inflammation hépatique et une lyse des hépatocytes. Cette réponse s'accompagne d'une expansion de Tregs inhibant la réponse T CD8<sup>+</sup> Ag-spécifique permettant la résolution de l'inflammation hépatique.

Cette divergence de résultats entre Zierden *et al.* et Dywicki *et al.* pourrait provenir de la différence de techniques utilisées pour permettre l'expression de HA par les hépatocytes, le premier utilisant une expression constitutive de HA, le second utilisant un modèle inductible

de cette expression via l'utilisation d'un adénovirus, pouvant donc mettre en jeu des réponses immunes intra-hépatiques différentes.

Finalement, ces modèles TCR transgéniques, associant expression hépatique d'un antigène et transfert de LT CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> naïfs spécifiques de cet antigène, ont principalement permis d'étudier le rôle cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques. Ce système de reconnaissance antigénique forcé montre un rôle majeur des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans la lyse hépatocytaire. Les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques semblent apporter un rôle accessoire amplifiant la cytotoxicité causée par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques. Toutefois l'hépatite provoquée par les LT CD8<sup>+</sup> spécifiques n'est que transitoire et non chronique suggérant la mise en place d'importants mécanismes de régulation de cette réponse. La chronicité dans ces modèles murins ne s'observe que lorsque le système est surchargé en LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques (croisement avec des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique de l'antigène présenté dans un contexte CMH-I ou injections répétées de LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques). De plus, les LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques montrent une altération de leur profil au cours du temps jusqu'à devenir dysfonctionnels. Ces modèles TCR transgéniques sont donc des modèles imparfaits pour l'étude de l'HAI mais permettent d'étudier l'impact du foie sur les réponses T antigène-spécifiques. Ils soulignent encore une fois le rôle important, mais non unique, des Tregs dans l'inhibition de l'inflammation hépatique et l'inhibition de la réactivité des LT (Figure 22).

### 3.2.3. Les modèles d'immunisation ciblant des auto-antigènes hépatiques

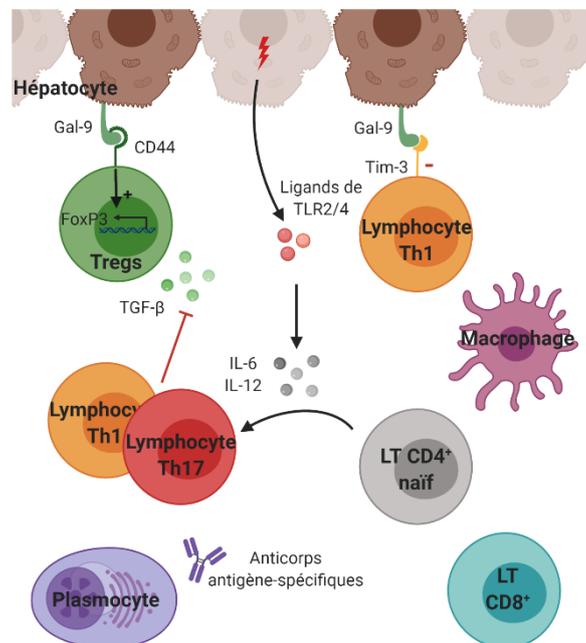
La découverte des auto-antigènes cibles dans l'HAI-2, CYP2D6 et FTCD, a permis l'avènement de nouveaux modèles murins d'HAI, basés sur l'immunisation et la reconnaissance antigène-spécifique. Ces protéines présentent l'avantage d'avoir des structures très conservées entre l'Homme et la souris [245–247].

En 2004, Lapierre *et al.* [248] ont immunisé des souris C57BL/6 en injectant en intramusculaire (i.m.) un plasmide codant pour une protéine chimérique, constituée de la protéine CYP2D6 humaine (hCYP2D6) et de la protéine FTCD humaine (hFTCD) (3 injections avec 2 semaines d'intervalle entre chaque injection). Cette immunisation conduit à

l'augmentation des transaminases ASAT/ALAT chez les souris à partir de 4 mois après la dernière injection ainsi qu'à une infiltration lymphocytaire hépatique (principalement composée de LT CD4<sup>+</sup> mais également de LT CD8<sup>+</sup> et de LB) et à une inflammation et nécrose hépatiques observées 9 mois après la dernière injection. Les souris présentent également des anticorps anti-LKM-1 (ciblant CYP2D6) et des anticorps anti-LC-1 (ciblant FTCD) avec une prédominance d'IgG2a, représentatif d'une réponse Th1 [249]. Afin de mesurer indirectement l'activité cytotoxique des LT spécifiques de CYP2D6 ou FTCD, des cellules tumorales ont été incubées avec la protéine de fusion hCYP2D6-hFTCD puis mises en contact avec des splénocytes ou des NPC provenant de souris immunisées contre hCYP2D6-hFTCD avant de mesurer le relargage du lactate déshydrogénase (induit lors de dommages tissulaires). Ils ont alors constaté que les lymphocytes infiltrant le foie présentent une activité cytotoxique. Ainsi, ce modèle illustre la possibilité d'un rôle du mimétisme moléculaire dans le développement de l'HAI murine grâce à l'immunisation de souris à l'aide de protéines humaines.

Dans des expériences similaires, Hardtke-Wolenski *et al.* ont immunisé des souris avec un vecteur adénoviral codant pour hFTCD, appelé Ad-hFTCD [245]. Cette immunisation provoque, chez des souris NOD et non chez des souris FVB/N ou C57BL/6, le développement d'une hépatite transitoire, induite par l'adénovirus lui-même, associée à une infiltration hépatique massive (principalement par des LT CD4<sup>+</sup>, mais aussi des LT CD8<sup>+</sup>, des cellules NK et des LB) et une fibrose hépatique. Ils ont observé la génération d'anticorps anti-LC-1 et chez 13% des souris des ANA. La divergence de réponse entre les différentes souches de souris suggère un rôle de la prédisposition génétique dans le développement de l'HAI murine, en cohérence avec la pathologie humaine. Les souris NOD ont une susceptibilité accrue au développement de diverses MAI (diabète de type 1, thyroïdite auto-immune, syndrome de Sjögren, etc.) et présentent un CMH murin particulier n'exprimant pas de molécules I-E et exprimant une unique molécule I-A mutée (I-A<sup>g7</sup>) modifiant le répertoire de peptides pouvant se lier à cette molécule [250,251]. Ainsi, le développement d'une hépatite chez ces souris présentant des allèles particuliers associés aux CMH-II concorde avec les données observées chez les patients (voir partie « 1.3 Les prédispositions génétiques et facteurs environnementaux »). Grâce à des expériences de transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> provenant de souris immunisées par l'Ad-hFTCD chez des souris NODscid

immunodéficientes, l'équipe a observé le développement d'une hépatite seulement chez les souris recevant les LT CD4<sup>+</sup> montrant que l'hépatite est induite par les LT CD4<sup>+</sup>. De plus, lorsque les LT sont stimulés *in vitro* avec une protéine FTCD murine, les LT des souris immunisées par l'Ad-hFTCD produisent plus d'IFN- $\gamma$ , d'IL-12 et d'IL-17 que les LT provenant de souris contrôles. Or ces cytokines sont caractéristiques de réponses Th1 et Th17. Enfin, l'immunisation des souris contre la protéine FTCD murine donne des résultats similaires à celle contre la protéine hFTCD. Ainsi, ce modèle souligne non seulement le rôle central des lymphocytes Th1 et Th17 dans sa pathogenèse mais également celui du mimétisme moléculaire dans l'induction de l'HAI (Figure 23).



**Figure 23 : Les modèles d'immunisation antigène-spécifiques ciblant des auto-antigènes hépatiques.** L'immunisation conduit à une importante infiltration hépatique par des LT CD4<sup>+</sup>, des LT CD8<sup>+</sup> et des macrophages et à la production par les plasmocytes d'anticorps spécifiques de l'antigène. Les LT CD4<sup>+</sup> naïfs s'activent et se différencient en lymphocytes Th1 et Th17 antigène-spécifiques capables d'inhiber l'activité suppressive des Tregs et d'exercer une activité hépatotoxique.

De même que pour le modèle Ad-hFTCD, un modèle d'immunisation via l'utilisation d'un vecteur adénoviral codant pour hCYP2D6 a été généré par Holdener *et al.* en 2008 [246]. L'équipe a infecté des souris FVB/N non-transgéniques ou des souris transgéniques exprimant hCYP2D6 dans le foie, sous le contrôle de son propre promoteur, avec un adénovirus codant pour hCYP2D6, appelé Ad-2D6. Toutes les souris ont alors montré une hépatite transitoire, provoquée par le vecteur adénoviral lui-même, des dommages hépatiques sévères et persistants, une infiltration hépatique massive (principalement par des LT CD4<sup>+</sup>, mais aussi

des LB, macrophages et quelques LT CD8<sup>+</sup>) et de la fibrose. Toutefois, ces effets étaient moindres chez les souris transgéniques hCYP2D6 par rapport aux souris non-transgéniques et apparaissaient d'une manière retardée. De plus, les chercheurs ont observé la génération d'anticorps anti-LKM-1 chez les deux types de souris mais la génération d'une réponse T hCYP2D6-spécifique effective uniquement chez les souris non-transgéniques FVB/N [246,247]. Ces résultats suggèrent un rôle tolérogène de l'expression hépatique de l'antigène hCYP2D6 sur l'induction d'une réponse antigène-spécifique cellulaire. Ils ont alors identifié un épitope CD4<sup>+</sup> et trois épitopes CD8<sup>+</sup> reconnus dans ce modèle. Ces épitopes présentent une homologie intermédiaire entre hCYP2D6 et les homologues CYP murins démontrant que les LT hCYP2D6-spécifiques reconnaissent principalement des épitopes d'homologie intermédiaire [247]. Enfin, l'immunisation via l'injection i.v. d'un vecteur viral semble être nécessaire pour provoquer l'HAI puisque l'immunisation par utilisation d'adjuvant de Freund ne permet pas d'induire une réaction auto-immune [247]. Ainsi, dans ce modèle, il semblerait que l'immunisation via l'induction de l'expression hépatique de l'antigène par un vecteur viral ainsi que le mimétisme moléculaire, plutôt que l'homologie moléculaire, soient nécessaires pour induire une HAI murine. Toutefois, l'induction de l'expression de l'antigène dans le foie semble perturber sa mise en place.

Dans un modèle similaire, dans lequel l'immunisation anti-hCYP2D6 est induite par l'injection i.v. simultanée d'un plasmide codant pour hCYP2D6 associée à l'injection d'un adénovirus, il a été montré que la voie Tim-3/Gal-9 inhibe les réponses Th1 et promeut l'activité des Tregs via l'expression de Gal-9 par les hépatocytes [252] (Figure 23). Toutefois, cet effet est atténué par la production de ligands de TLR2/TLR4, induite par la destruction hépatocytaire. Ceci provoque la sécrétion d'IL-6 et d'IL-12, cytokines de différenciation clés pour les lymphocytes Th1 et Th17, et entraîne l'inhibition de l'activité suppressive des Tregs, en inhibant notamment l'expression de FoxP3 dans les Tregs [252,253] (Figure 23).

Grâce à la similitude des séquences CYP2D6 et FTCD humaines avec leurs homologues murins, ces modèles d'immunisation antigène-spécifiques ciblant ces auto-antigènes mettent en évidence que le mimétisme moléculaire associé à un vecteur viral et la susceptibilité génétique seraient impliqués dans l'initiation de l'HAI, et plus spécifiquement dans l'HAI-2. Les LT CD4<sup>+</sup> dans ces modèles sont des cellules primordiales pour le développement de l'hépatite,

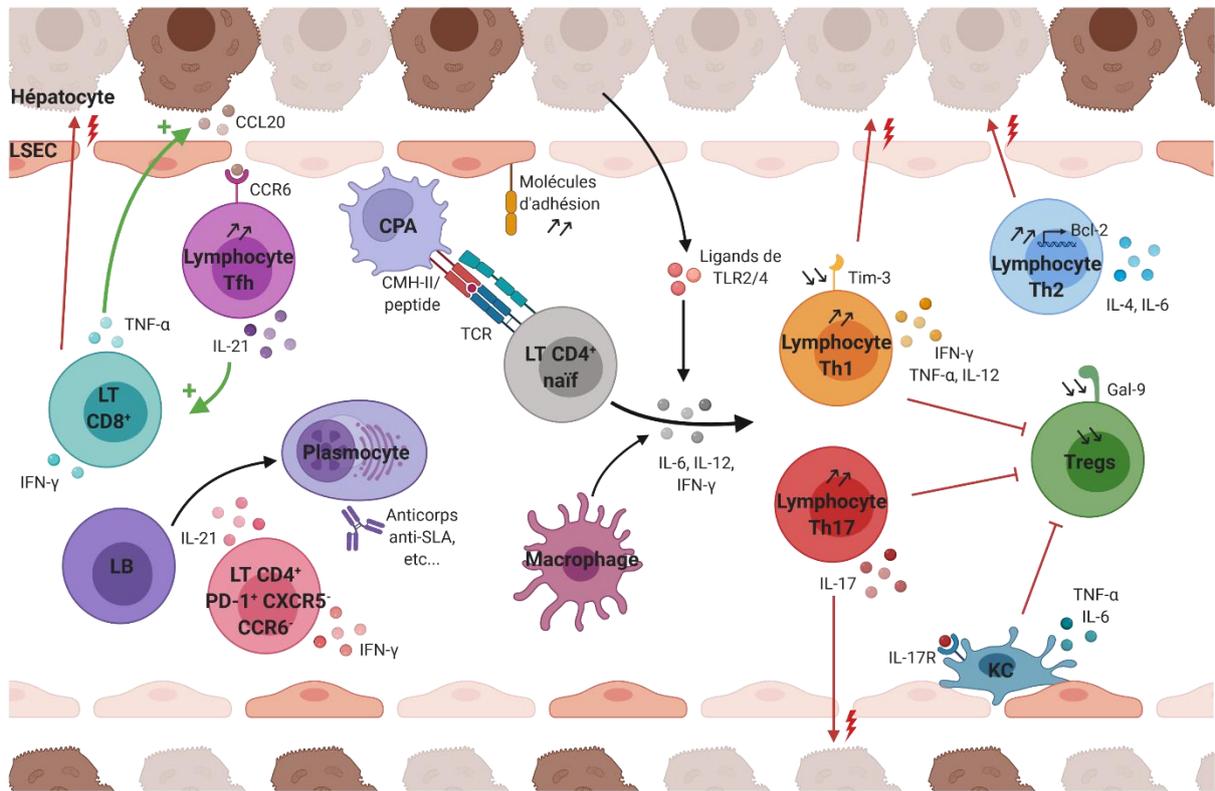
et plus particulièrement les lymphocytes Th1 et Th17, en accord avec ce qui est observé chez les patients (Figure 23). Enfin, l'activité des Tregs semble altérée avec une inhibition de leur capacité de suppression (Figure 23).

Finalement, d'après les données obtenues tant chez les patients que dans les modèles murins, la prédisposition génétique et le mimétisme moléculaire semblent être les déclencheurs privilégiés de l'HAI, notamment de l'HAI-2. Cela provoque la différenciation de LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs naïfs en lymphocytes pro-inflammatoires de type Th1 et Th17 ainsi qu'en lymphocytes de type pro-B (lymphocytes Tfh, lymphocytes CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques auto-réactifs), stimulateurs de la production d'auto-anticorps (Tableau 5 et Figure 24). En parallèle, une altération des voies de régulation de la réponse immune s'opère avec notamment un défaut quantitatif et/ou qualitatif des Tregs (Tableau 5 et Figure 24).

**Tableau 5 : Le rôle des LT CD4<sup>+</sup> dans la pathogenèse de l'HAI.**

Sous-type cellulaire	Modèle	Détail	Localisation	Références
<i>Lymphocytes Th1</i>	Patients	Augmentation de leur fréquence	Foie, périphérie	[186,187]
	Patients, souris	Augmentation du taux d'IFN- $\gamma$ et de TNF- $\alpha$	Foie, périphérie	[178,179,203,204,226,232]
	Patients	Apoptose réduite : augmentation de l'expression de Bcl-2	Foie, périphérie	[206]
	Patients	Résistance à l'immunosuppression : diminution de l'expression de Tim-3	Périphérie	[207]
	Souris	Augmentation du taux de cytokine de différenciation IL-12	Périphérie	[245,252,253]
<i>Lymphocytes Th17</i>	Patients, souris	Augmentation de leur fréquence	Foie, périphérie	[185,187,224]
	Patients, souris	Augmentation du taux d'IL-17	Foie, périphérie	[177,179,215,226,232]
	Patients	Boucle de rétrocontrôle positive : prolifération stimulée par la sécrétion d'IL-6 par les hépatocytes grâce à l'IL-17	<i>In vitro</i> (cellules HepG2)	[188]
	Souris	Augmentation du taux de cytokine de différenciation IL-6	Foie	[180,226,239,240]
<i>Lymphocytes Tfh</i>	Patients, souris	Augmentation de la fréquence en Tfh	Périphérie	[181–183,223,224]
	Patients	Pro-B : stimulation de la différenciation B via l'IL-21, stimulation indirecte de la production d'anticorps	Périphérie	[189–191]
	Souris	Activation des LT CD8 <sup>+</sup> via la production d'IL-21	Périphérie	[234]
	Souris	Augmentation du recrutement hépatique via la surexpression de CCR6	Foie, périphérie	[234,235]
<i>Lymphocytes Tfr</i>	Patients	Diminution de la fréquence en Tfr	Périphérie	[190]
<i>Lymphocytes CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques</i>	Patients	Réservoir principal des LT CD4 <sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients SLA positifs	Périphérie	[175]
	Patients	Pro-B : stimulation de la différenciation B via l'IL-21	Périphérie	[175]
	Patients	Pro-inflammatoires : sécrétion d'IFN- $\gamma$	Périphérie	[175]
<i>Tregs</i>	Patients	Altération de leur fréquence	Foie, périphérie	[187,198,227]
	Patients	Capacité d'expansion altérée	Périphérie	[198]
	Patients, souris	Altération de l'expression de FoxP3	Foie, périphérie	[163,203–205,252,253]
	Patients	Diminution de l'expression de Gal-9	Périphérie	[207]
	Patients	Diminution de la sécrétion d'IL-10	Périphérie	[201]
	Patients	Altération de la voie de signalisation AHR	Périphérie	[210]

Localisation : Périphérie = sang (Homme) ou rate (souris)



**Figure 24 : Les LT CD4<sup>+</sup> dans l'HA.** Par un mécanisme de mimétisme moléculaire, des peptides homologues sont présentés dans des complexes CMH-II/peptides par les CPA aux LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs naïfs. Ces derniers s'activent et se différencient en lymphocytes Th1 ou Th17 grâce à la production d'IL-6, d'IL-12 et d'IFN-γ via un mécanisme dépendant des TLR ou par les macrophages. Ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et sont capables d'inhiber l'activité suppressive des Tregs. L'expression du récepteur inhibiteur Tim-3 est réduite à la surface des lymphocytes Th1 ainsi que l'expression de Gal-9 sur les Tregs, réduisant leur inhibition par les Tregs, et l'expression du gène anti-apoptotique Bcl-2 est augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup>. L'IL-17 produit par les lymphocytes Th17 est captée par les KC, via l'IL-17R, ces cellules pouvant inhiber l'activité des Tregs. Les lymphocytes Th1, Th17 et Th2 induisent l'apoptose des hépatocytes, exacerbant le relargage de ligands TLR, conduisant à des dommages hépatiques massifs. Le recrutement dérégulé de lymphocytes Tfh dans le foie favorise l'activation de LT CD8<sup>+</sup> via la production d'IL-21. De même, les lymphocytes Tfh ainsi que les LT CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup> auto-réactifs, via la production d'IL-21, promeuvent la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'auto-anticorps.

## PARTIE 4

### Synthèse du projet

Alors que les LT CD4<sup>+</sup> semblent être primordiaux dans la physiopathologie de l'HAI, les réponses antigène-spécifiques impliquées dans l'initiation puis dans le développement de l'HAI ont été peu caractérisées (biologie initiale, évolution, impact de l'environnement hépatique). Ces études sont difficilement réalisables chez l'Homme, notamment car le diagnostic de la pathologie est établi après son initiation et souvent tardivement. Concernant les modèles murins, les modèles TCR transgéniques sont intéressants d'un point de vue spécificité antigénique mais permettent principalement l'étude du rôle cytotoxique des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques et de l'impact de l'expression d'un antigène dans le foie sur la réponse T antigène-spécifique. En outre, ils ne permettent pas d'étudier l'émergence de cette réponse. Les modèles murins d'HAI-2 (CYP2D6, FTCD), bien que pertinents grâce à l'homologie entre protéines humaines et murines, manquent d'outils de caractérisation des réponses antigène-spécifiques, tels que des tétramères.

Or, une caractérisation et un suivi approfondis des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques auto-réactifs, de leur phénotype et de leur fonction, pourraient permettre d'améliorer notre compréhension des mécanismes d'initiation de l'HAI, voire de les contrôler. Ceci pourrait conduire au développement de nouveaux traitements de l'HAI, plus spécifiques, palliant l'utilisation des immunosuppresseurs actuellement utilisés, à l'origine d'importants effets secondaires et ne permettant pas l'établissement d'une rémission stable.

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit mon projet de thèse. Il s'organise autour de l'étude des réponses antigène-spécifiques, plus particulièrement des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques, dans un contexte d'auto-réactivité hépatique. L'objectif est d'une part d'étudier l'influence du foie et de son environnement sur l'induction d'une réponse T CD4<sup>+</sup> antigène-spécifique, et d'autre part de caractériser et suivre l'évolution de cette réponse. Ce projet s'articule autour de plusieurs problématiques :

1. Quelles conditions sont favorables au développement d'une réponse auto-réactive dans le foie ?
2. Quel est l'impact de l'expression d'un antigène dans le foie sur la réponse antigène-spécifique mémoire ?
3. Comment l'environnement hépatique module la réponse antigène-spécifique ?

Pour répondre à ces questions, nous avons développé un nouveau modèle murin reproduisant une auto-réactivité hépatique via l'induction de l'expression hépatique de l'antigène modèle HA (hémagglutinine). Ce modèle nous permet d'étudier l'effet de l'environnement hépatique sur la réponse antigène-spécifique grâce à différentes conditions d'expression antigénique (non-inflammatoire, inflammatoire, pré-conditionnée). Grâce à l'utilisation de tétramères de classe II mais également de classe I, il nous permet de suivre le développement de réponses T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques. L'ensemble des données obtenues nous a finalement conduit à la caractérisation du profil de LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs antigène-spécifiques, influencé par l'environnement hépatique.

# RÉSULTATS

# Impact of antigen expression in the liver on the molecular profile of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells

Anaïs Cardon<sup>1</sup>, Jean-Paul Judor<sup>1</sup>, Thomas Guinebretière<sup>1</sup>, Richard Danger<sup>1</sup>,  
Arnaud Nicot<sup>1</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup>, Sophie Conchon<sup>1†</sup> and Amédée Renand<sup>1†\*</sup>

<sup>1</sup> Nantes Université, INSERM, CHU Nantes, Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, UMR 1064, ITUN5, F-44000 Nantes,

† Equal contribution

\* Corresponding author : Dr Amédée Renand, INSERM UMR1064 – Center for Research in Transplantation and Translational Immunology, CHU Nantes – Hôtel Dieu, 30 boulevard Jean Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone: (+33)240087410. E-mail address: [amedee.renand@univ-nantes.fr](mailto:amedee.renand@univ-nantes.fr)

## Abstract :

The liver displays a strong capacity to induce tolerance toward hepatic antigens. However, hepatic tolerance can be overcome with the development of local autoimmune diseases such as autoimmune hepatitis (AIH). This chronic inflammatory disorder leads to a progressive destruction of liver parenchyma if non-treated. Although the CD4<sup>+</sup> T cell response seems a key player of this immune disorder, the dynamics and biology of emerging liver antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells are poorly described. Here, we developed a new murine model which mimics hepatic autoreactivity allowing the study and monitoring of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells from their emergence to local immune response. We show that the induction of the expression of an antigen in the liver in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance. In inflammatory condition, using viral vector transduction, we observe the development of a complete adaptive immune response concomitant with the antigen expression in the liver. Infiltrating antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells display a pro-inflammatory signature linked to hepatic damage. Interestingly, the simple neo-antigen expression by hepatocytes post-peripheral immunisation induces the recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells and hepatic damages; these CD4<sup>+</sup> T cells have also a transcriptomic pro-inflammatory profile. These data demonstrate that the recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver is conditioned by an immune

coordination between surface antigen expression by hepatocytes and peripheral immune response and mimics the first step of a local autoreactive process. In the long-term, we observe that the hepatic environment has the capacity to control the local, but not peripheral, antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. The up-regulation of check point inhibitors by local antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells can explain this liver clearance. We believe additional immune events may be involved in the long-term chronic immune reactivity in the liver after the first step we described in this study.

**Keywords :**

Autoimmune hepatitis, autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells, liver, tolerance

**Key points :**

- Antigen expression in the liver in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance
- Antigen expression in the liver in immunization condition (concomitant or pre-existing) is sufficient to induce liver recruitment of pro-inflammatory antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells and hepatic damages
- This model mimics the first step of an autoreactive process against a liver antigen
- In the long-term, the hepatic environment induces the up-regulation of immune checkpoint molecules and the clearance of liver-infiltrating, but not peripheral, antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells
- Analysis of immunomodulatory pathways implicated in liver tolerization of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells and identification of potential extrinsic factors implicated in an acute-to-chronic transition could provide new therapeutical targets for AIH treatment

## Introduction

The liver displays strong tolerogenic properties mediated by both parenchymal hepatocytes and non-parenchymal cells (NPCs). These cells, particularly liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells and hepatocytes, are able to act as antigen presenting cells to promote activation of T cells<sup>1</sup>. However, in normal condition, this activation leads to an anergic phenotype<sup>2,3</sup>, differentiation into regulatory T cells (Tregs)<sup>4,5</sup> or even apoptosis<sup>6,7</sup>.

However, the robust liver capacity to induce tolerance can be overcome and lead to the development of autoimmunity. Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disorder causing a progressive destruction of liver parenchyma<sup>8</sup>. It is a rare worldwide disease with a prevalence of 16.9 per 100,000 in Europe and North America and an incidence of 0.1 to 1.9 per 100,000 per year<sup>9</sup>. This pathology is characterized by the presence of autoantibodies and elevated immunoglobulin G (IgG) levels in the sera of patients, and a typical histological feature in the liver, the interface hepatitis. This important lymphocytic infiltration in the liver is composed mainly of CD4<sup>+</sup> T cells but also of CD8<sup>+</sup> T cells and B cells<sup>8</sup>. AIH is divided into two types, depending on autoantibodies present in patients' blood : type 1 AIH (anti-nuclear antibodies, anti-smooth muscle antibodies and anti-soluble liver antigen – SLA – antibodies) and type 2 AIH (anti-liver kidney microsomal type 1 – LKM-1 – antibodies and anti-liver cytosol – LC-1 – antibodies). AIH is a multifactorial disease associating genetic predispositions, affecting genes coding for class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC-II), and environmental factors, such as drug exposure and molecular mimicry<sup>8</sup>. Patients are treated with immunosuppressive drugs (prednisolone associated or not with azathioprine) but struggle to reach a long-term remission<sup>10,11</sup>.

Preponderance of CD4<sup>+</sup> T cells in the hepatic infiltrate, genetic predisposition affecting genes coding for MHC-II molecules involved in antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells and accumulation of autoantibodies generated after interaction between B cells and CD4<sup>+</sup> T cells point toward a major role of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in the immunopathogenesis of AIH. Data obtained in AIH patients show an enrichment of pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells in liver and blood and defective regulatory mechanisms<sup>8,12</sup>. Particularly, frequencies of pro-inflammatory Th1 and Th17 cells and their related cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) are increased in patients<sup>13-15</sup>. Whether patients present quantitative and/or qualitative CD4<sup>+</sup> Tregs defects is

still debated<sup>15-18</sup>. Recently, our team observed that, despite immunosuppressive treatment, AIH patients display a persistent immune dysregulation in their blood with a residual CD4<sup>+</sup> T cell infiltrate in the liver<sup>12</sup>. By tracking SepSecs-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients with anti-SLA antibodies, we identified and provided a deep characterization of a unique autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell population with a pro-inflammatory/B-helper profile (PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup>) which is enriched in the blood of AIH patients independently of the presence of the anti-SLA antibodies<sup>19</sup>. This rare circulating population represent the major reservoir of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in patients. Therefore, the tracking of these cells associated to the analysis of the mechanisms involved in their emergence could provide new therapeutical target for AIH treatment.

As diagnosis generally occurs quite late after disease onset, and because AIH is a chronic disease with long-term evolution, the study of the early events implicated in the autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells generation cannot be performed in patients, thus murine models represent valuable tools for this purpose. Murine models of AIH, based on immunisation using viral vectors encoding for human CYP2D6 or FTCD proteins<sup>20,21</sup>, have underlined the importance of molecular mimicry and genetic susceptibility for the development of murine AIH. However, emergence and biology of antigen-specific autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells involved in the first steps of the adaptive immune response against the autoantigen hepatic expression have not been studied. In this study, we propose a new murine model which mimics hepatic autoreactivity in which we can induce hepatic expression of a model antigen, hemagglutinin (HA), in different conditions and follow the emergence of antigen-specific responses, especially antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.

## Methods

### Viral vectors

Adenoviral CAG Cre vectors (Ad Cre) were produced with a vector plasmid containing the Cre recombinase coding sequence inserted behind the CAG promoter and followed by a poly-A signal. Control adenoviral CMV GFP vectors (Ad Ct) consisted of the GFP coding sequence inserted between the CMV promoter and a poly-A signal.

Ad Cre and Ad Ct productions were performed by the INSERM UMR 1089 Centre de Production de Vecteurs (Nantes, France).

### Mice

Heterozygous TTR-Cre inducible mice ( $Cre^{ind/+}$ )<sup>22</sup> were back-crossed on a Balb/c background for at least 10 generations (TAAM, CDTA CNRS Orléans). They were cross-bred with homozygous Rosa26 HA floxed mice ( $HA^{fl}$ )<sup>23</sup> resulting in  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice. Male and female eight to twelve-week-old mice were used for each experiment. All mice were housed at the UTE IRS-UN animal facilities (Nantes, France) where they were fed *ad libitum* and allowed continuous access to tap water. Procedures were approved by the regional ethical committee for animal care and use and by the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (agreements APAFIS #2054 and #28582). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

For the induction of HA expression in hepatocytes in non-inflammatory condition, normal diet of  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice (control) and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice were substituted by tamoxifen dry food (0.5g/kg tamoxifen + 5% saccharose; Safe, France) for 14 days in free access.

For the induction of HA expression in hepatocytes in inflammatory condition,  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice were injected intravenously with  $3 \times 10^9$  ip (infectious particle) per mice of the Ad Cre vector or of the Ad Ct vector for the control group.

For the peripheral immunization against HA, mice  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice were injected intramuscularly with  $1.5 \times 10^9$  ip per mice of the Ad Cre vector or of the Ad Ct vector for the control group.

## Genotyping

Small tail biopsies were taken from 3 week-old mice to perform Cre genotyping. Briefly, samples were digested overnight at 56°C in 100µL of TNT-PK buffer (TNT : Tris HCl pH 8.5 50mM ; NaCl 100mM ; Tween 20 0.5% / proteinase K 0.2mg/mL). PK were inactivated at 95°C during 15min. 60ng of DNA was used for PCR mix reaction prepared according to the manufacturer protocol (Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent). The following Cre primers were used to carry out the PCR amplification: forward primer 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3', reverse primer 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3'. Amplification program was run on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems; Foster City, USA) and consist of 1 cycle at 95°C for 2min, 35 cycles of 95°C for 20sec, 60°C for 20sec and 72°C for 30sec, followed by 1 cycle at 72°C for 3min. Finally, PCR products are visualized on Caliper LabChip (PerkinElmer).

## RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR

Total RNA was extracted from organ tissue using TRIzol™ reagent (ThermoFisher Scientific #15596026) and purified with the QiagenRNeasy Mini Kit (Qiagen #74106) according to the manufacturer's protocol.

Reverse transcription was performed using 2µg of total RNA mixing with poly-dT24 20µg/mL (Eurofins Genomics), DTT 8mM (ThermoFisher Scientific #18057018) and dNTP 20mM (ThermoFisher Scientific #10297018) and incubated at 70°C during 10min followed by 4°C for 5min. Then, first strand buffer 1X (ThermoFisher Scientific #18057018), M-MLV reverse transcriptase 200U (ThermoFisher Scientific #18057018) and RNase OUT inhibitor 40U (ThermoFisher Scientific #10777019) were added and incubated at 37°C for 1h, followed by 15min at 70°C.

Real-time RT-PCR was performed using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System and Power SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific #4368708). Primers for HA (forward 5'-AAACTCTTCGCGGTCTTTCCA-3'; reverse 5'-GATAAGGTAGCTTGGGCTGC-3') and β-actin (forward 5'-TACCACAGGCATTGTGATGG-3'; reverse 5'-AATAGTGATGACCTGGCCGT-3') were used for detection. Relative gene expressions were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

## Western blot

Total proteins were extracted from liver samples via RIPA buffer treatment. 25µg of protein were denatured at 95°C for 5min in Laemmli Sample Buffer (BIORAD #1610747) with DTT 0.1M. Preparation was separated by SDS-PAGE on Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels (BIORAD #4561036) in migration buffer (Tris base 15g/l, glycine 72g/l, SDS 10g/l) and transferred onto a PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo Transfer System (BIORAD). The membrane was blocked using a blocking solution (TBS; Tween 20 0.1%; skim milk 5%) for 2h then incubated with primary antibodies (1:5000) overnight : anti-HA antibody (rabbit polyclonal antibody; Sino Biological #11684-T62) and anti-β-actin antibody (mouse monoclonal antibody; Cell Signaling #3700). The membrane was washed with TBS – Tween 20 0.1%. HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L) (1:5000; Cliniscience #E-AB-1080-120) and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM (H+L) (1:10000; Jackson ImmunoResearch #115-036-068) were used to detect rabbit and mouse antibodies respectively during 1h. Secondary antibodies were detected using electrochemiluminescence super signal West Pico (ThermoFisher Scientific #34577) according to the manufacturer instructions. Imaging and analysis of western blots were performed on the ChemiDoc MP Imaging System (BIORAD).

## Cell preparation

Splenocytes were isolated by a mechanical dissociation of spleen in red blood cell lysis buffer (NH<sub>4</sub>Cl 155mM; KHCO<sub>3</sub> 10mM; EDTA 1mM; Tris 17mM per 1L of sterilized water) before centrifugation.

Liver non-parenchymal cells (NPCs) were isolated as previously described<sup>24</sup>. Briefly, after perfusion with HBSS 1X buffer (ThermoFisher Scientific #14175129), livers were digested with collagenase IV (Sigma-Aldrich #C5138) and NPCs enriched by Percoll (Sigma-Aldrich #GE17-0891-01) density gradient centrifugation and red blood cells lysis.

## Tetramer enrichment and staining

20.10<sup>6</sup> splenocytes and 3.10<sup>6</sup> NPCs were stained with both I-A<sup>d</sup>-HA peptide (HNTNGVTAACSHE) and I-E<sup>d</sup>-HA peptide (SFERFEIFPKE) PE-labelled tetramers (NIH Tetramer Core Facility; Atlanta, USA) at room temperature during 1h. Then, cells were washed

using PBE buffer (PBS 1X; BSA 0.1%; EDTA 2mM) and stained with magnetic anti-PE microbeads (Miltenyi #130-048-801) at 4°C during 15min. Cells were washed and enriched using magnetic MS columns (Miltenyi #130-042-201). A viability staining was then performed on the positive fraction containing tetramer-enriched cells by incubating cells with 100µL of LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain kit (ThermoFisher Scientific #L34957) for 15min at 4°C, protected from light. Cells were washed and an extracellular staining were performed using 100µL of fluorescent antibodies for 20min at 4°C, protected from light. For FoxP3 intracellular staining, cells were next permeabilized and fixed for 30min according to the eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific #00-5523-00). Fluorescent antibodies targeting the FoxP3 marker were diluted in the permeabilization buffer and incubated with the fixed cells for 1h, protected from light.

The following antibodies were used to perform an extracellular staining: CD4/PerCP-Cy5.5 (clone RM4-5; BD #550954), CD44/APC (clone IM7; BD #559250), PD-1/BV421 (clone J43; BD #562584), CD25/PE-Cy7 (clone PC61; BD #552880) and CD19/BV510 (clone ID3; BD #562956). For the intracellular staining, the FoxP3/AF488 (clone FJK16S, eBioscience #53-5773-82) antibody was used. HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells were defined as : LIVE/DEAD<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> tetramers<sup>+</sup> cells.

For cell phenotyping, fluorescence was measured with a BD FACS Canto II (BD Biosciences; Mountain View, USA). FlowJo software was used to analyze data after eliminating doublets and viability<sup>+</sup> dead cells. For cell sorting, a BD FACS Aria (BD Biosciences; Mountain View, USA) were used.

## **ELISA test**

For the detection of anti-HA antibodies, wells were coated with HA protein 1µg/mL (Sino Biological #11684-V08H) diluted in coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M; NaHCO<sub>3</sub> 0.05M; pH 9.2) and incubated at 4°C overnight. Wells were then washed with washing buffer (PBS 1X; Tween 20 0.05%; in distilled water) and saturated with dilution buffer (PBS 1X; Tween 20 0.05%; BSA 1%; in distilled water) for 2h at 37°C. After washing, diluted sera samples (1:500) were added and incubated at 37°C during 2h. Wells were washed and diluted peroxidase goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) detection antibody (1:2000; Jackson ImmunoResearch #115-036-068) was added before incubating at 37°C for 1h. Finally, wells were incubated with TMB Substrate

Reagent (BD #555214) and reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M. The absorbance at 450nm was determined using a Spark® 10M Infinite M200 Pro plate reader (TECAN).

### **Transaminase dosage and histology**

Dosage of plasma levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) was performed by the Centre Hospitalier Universitaire of Nantes (France).

Histological analyses were performed on paraformaldehyde (PFA)-fixed/paraffin-embedded liver samples. Liver lobes were fixed in PFA 4% for 24h at room temperature. Samples were then dehydrated in absolute ethanol then cleared in isopropanol and finally included paraffin. Paraffin-embedded sections (3µm) were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS). Paraffin-embedding and HPS staining were performed by the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest; Nantes, France). Slides were observed using NanoZoomer (HAMAMATSU) and NDP Scan software.

### **3'-end bulk RNA sequencing**

50 up to 200 HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells (LIVE/DEAD<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> tetramers<sup>+</sup>) were FACS sorted. RNA extraction, reverse transcription and PCR steps were directly performed after sorting according to the SMART-Seq® v4 Ultra® Low Input RNA Kit protocol (Takara Bio, USA). Amplified complementary DNA were transferred to the Benaroya Research Institute (Seattle, USA) to perform a 3'-end bulk RNA sequencing.

In order to do normalization, trimmed-mean of M values (TMM) normalization on the raw gene counts was performed. Additionally, because many genes are not expressed in any of the samples and are therefore uninformative, a filtering step was performed requiring that genes are expressed with at least 1 count per million total reads in at least 10% of the total number of libraries.

For the differential gene expression analysis, we used the following threshold: fold change (FC) > 2 and adjusted p value < 0.1.

## **Statistical analysis**

Prism (GraphPad version 6.01 Software, Inc.) was used for statistical analyses. Group comparison analyses were assessed using non-parametric Kruskal-Wallis tests or one-way ANOVA statistical test. p values < 0.05 were considered statistically significant between two groups (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

## Results

### **Concomitant inflammation and antigen expression in the liver induce a local recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with increased hepatic damages.**

In order to analyse the dynamics of the emergence of liver antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells, we used a liver-restricted HA expression model and tracked HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells thanks to the MHC class II tetramer technology.

We developed two strategies of induction of the expression of the HA antigen in the liver, based on the Cre/LoxP system. Homozygous Rosa26 HA floxed (HA<sup>fl</sup>) mice were crossed with heterozygous TTR-Cre inducible (Cre<sup>ind</sup>) mice, expressing an inducible Cre recombinase under the control of the hepatocyte-specific promotor (transthyretin, TTR). Both strains were on Balb/c (H-2<sup>d</sup>) background. The feeding of the HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> offspring with tamoxifen-mixed dry food leads to the expression of HA at the surface of the hepatocytes under non-inflammatory condition. The second strategy consists in the intravenous (i.v.) injection to all offspring (HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup>) of an adenoviral vector encoding for the Cre recombinase (Ad Cre), which transduces preferentially hepatocytes due to its strong hepatic tropism. This results in the expression of HA at the surface of hepatocytes under inflammatory condition, bypassing the endogenous expression of the inducible Cre in mice. As control, a peripheral model of immunization by intramuscular (i.m.) injection of Ad Cre which only induces local HA expression in the muscle was used (Figure 1A).

After two weeks, the HA expression restricted to the liver can be detected both in tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice and in Ad Cre i.v.-injected HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (termed as HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice) (Figure 1B, Supplementary figure 1, Supplementary figure 2). Expression of HA in Ad Cre i.m. mice was restricted to the muscle. In control tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and Ad Ct i.v. or i.m. groups, no expression of HA was observed in the liver and in any other organs (Figure 1B, Supplementary figure 1, Supplementary figure 2).

As expected, when mice are immunized by i.m. injection of Ad Cre, the induction of HA expression in the muscle in this inflammatory condition leads to the generation of a HA-specific humoral response, as demonstrated by the presence of anti-HA IgG and IgM (81.65 ± 5.72 arbitrary units, a.u.) (Figure 1C, Supplementary figure 2). In Ad Cre i.v. mice, the hepatic expression of HA is associated with a comparable HA-specific humoral response (89.00 ±

4.95 a.u.). On the contrary, HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, despite tamoxifen-induced hepatic expression of HA, did not develop humoral HA-specific response. No anti-HA specific antibodies were detected in control mice (tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and Ad Ct i.v. or i.m. mice) (Figure 1C, Supplementary figure 2).

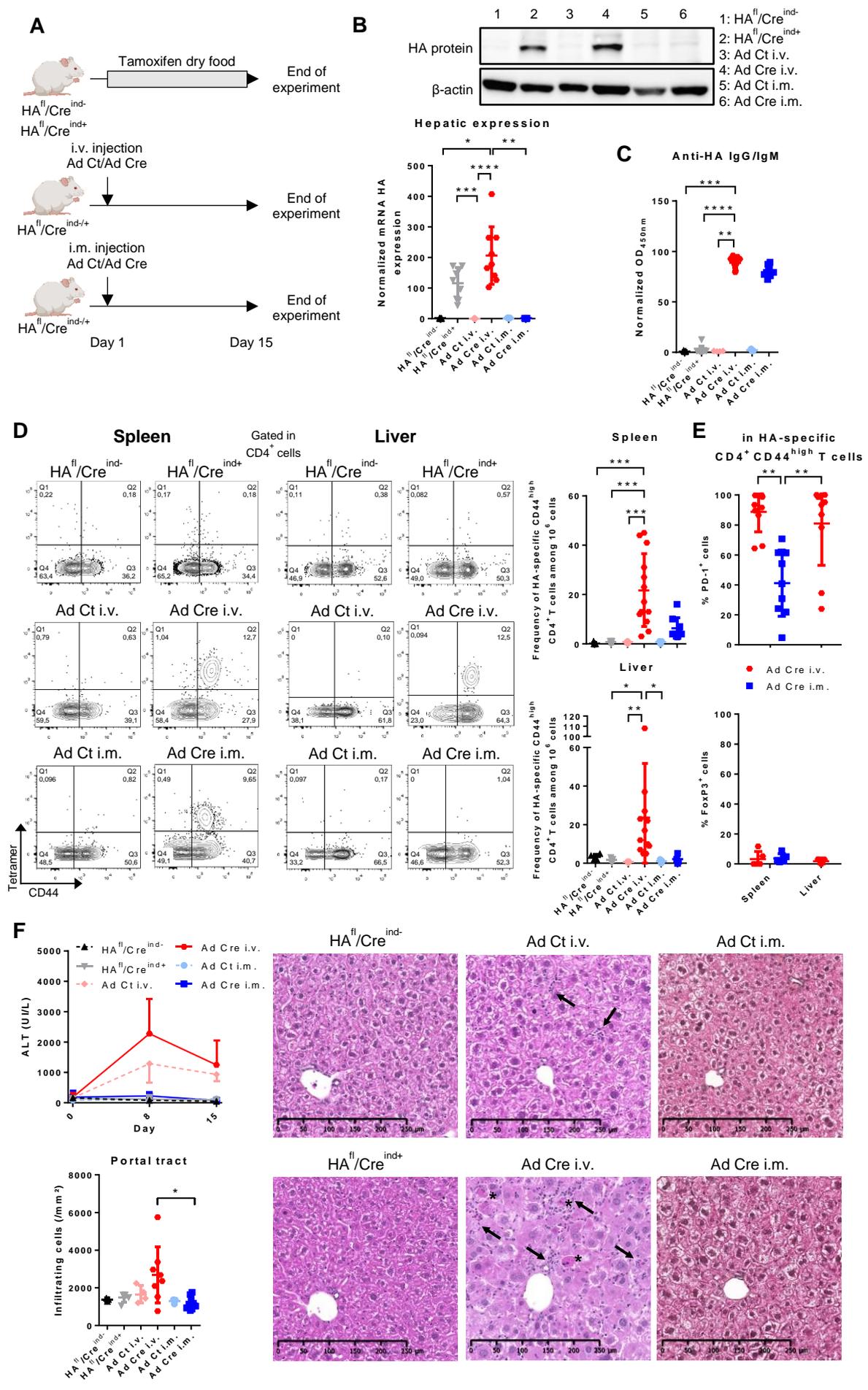
The HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell response was tracked with MHC class II tetramer loaded with HA peptides. HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were detected in the spleen of both Ad Cre i.m. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells: 6.33 ± 4.27) and Ad Cre i.v. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells: 21.77 ± 14.68), while none were detected in their respective control (Ad Ct) (Figure 1D, Supplementary figure 2). Liver HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were detected only in Ad Cre i.v. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells: 23.50 ± 28.38) (Figure 1D, Supplementary figure 2). HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells were detected neither in the spleen nor in the liver of tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (Figure 1D). This data demonstrates a complete adaptive immune response against a neo-liver antigen under inflammatory condition with local recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.

The liver has strong tolerogenic properties, which have been shown to involve the induction of regulatory T cells. Therefore, we performed a comparison of the immune phenotype of the HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells isolated from Ad Cre i.v. vs Ad Cre i.m. mice. This analysis revealed that they are CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup> in both groups, but that those from Ad Cre i.v. mice contain a higher proportion of PD-1<sup>+</sup> (CD279) cells (spleen: 88.98 ± 13.41%; liver: 81.11 ± 28.29%) than those isolated from Ad Cre i.m. mice (spleen: 41.12 ± 22.21%) (Figure 1E, Supplementary figure 3). PD-1<sup>+</sup> cells were enriched in HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells compared to total memory CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells from the same condition (Supplementary figure 4). This PD-1 up-regulation could reflect a high antigen reactivity.

Plasma levels of aminotransferases (AST/ALT) were used to monitor liver damage. In tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice and Ad Ct/Ad Cre i.m. groups, AST/ALT levels remained stable for 14 days and histological analysis of the liver did not show any sign of lymphocytic infiltration (Figure 1F). When adenoviral vectors (Cre or Ct) are injected intravenously, plasma AST/ALT levels were increased, with a peak after 7 days reflecting liver inflammation due to viral infection (Figure 1F). Interestingly, the histological analysis of the liver showed that portal infiltrations and liver damages were much more severe in the liver of Ad Cre i.v. mice than in Ad Ct i.v. mice. Liver of Ad Cre i.v. mice showed many events of

hepatocyte necrosis and an important necroinflammatory activity (Figure 1F). Therefore, although the adenoviral vector itself induces a hepatic inflammation, the presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells associated with HA expression in the liver of Ad Cre i.v. mice could explain the exacerbated liver damages compared to Ad Ct i.v. mice.

Thus, the induction of the hepatic expression of the antigen HA in association with a concomitant adenoviral-mediated hepatic inflammation leads to the development of an antigen-specific response, marked by the generation of anti-HA antibodies and HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells in the spleen and the liver. The presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells in the liver is associated with increased hepatic inflammation and liver damages, which could be explained by an immune attack against the HA antigen at the surface of hepatocytes, mimicking the early events of an autoreactive response.



**Figure 1 : Antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell response is modulated not only by the localisation of antigen expression but also by the environment.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 5) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 9) are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg) for 14 days. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice receive a single i.v. injection (3.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 7) or Ad Cre (n = 13). HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice receive a single i.m. injection (1,5.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 3) or Ad Cre (n = 9). Mice are sacrificed at day 15. (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression.  $\beta$ -actin was used as loading control. (C) At the end of experiment, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. (D) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, FoxP3, CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated among 10<sup>6</sup> total cells. (E) Percentage of PD-1<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. (F) Plasma samples were collected before the start of the experiment and at day 8 and day 15 for dosage of ALT. At the end of the experiment, paraffin-embedded liver sections are stained with HPS coloration to analyse liver infiltration (count of infiltrating cells around portal tracts) and morphology (x10 ; arrows point lymphocytic infiltration ; stars point necroinflammatory activities). All results are normalized and represent the mean (+ SD). p values were calculated using non-parametric Kruskal-Wallis test, \* = p <0.05, \*\* = p <0.01, \*\*\* = p <0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001.

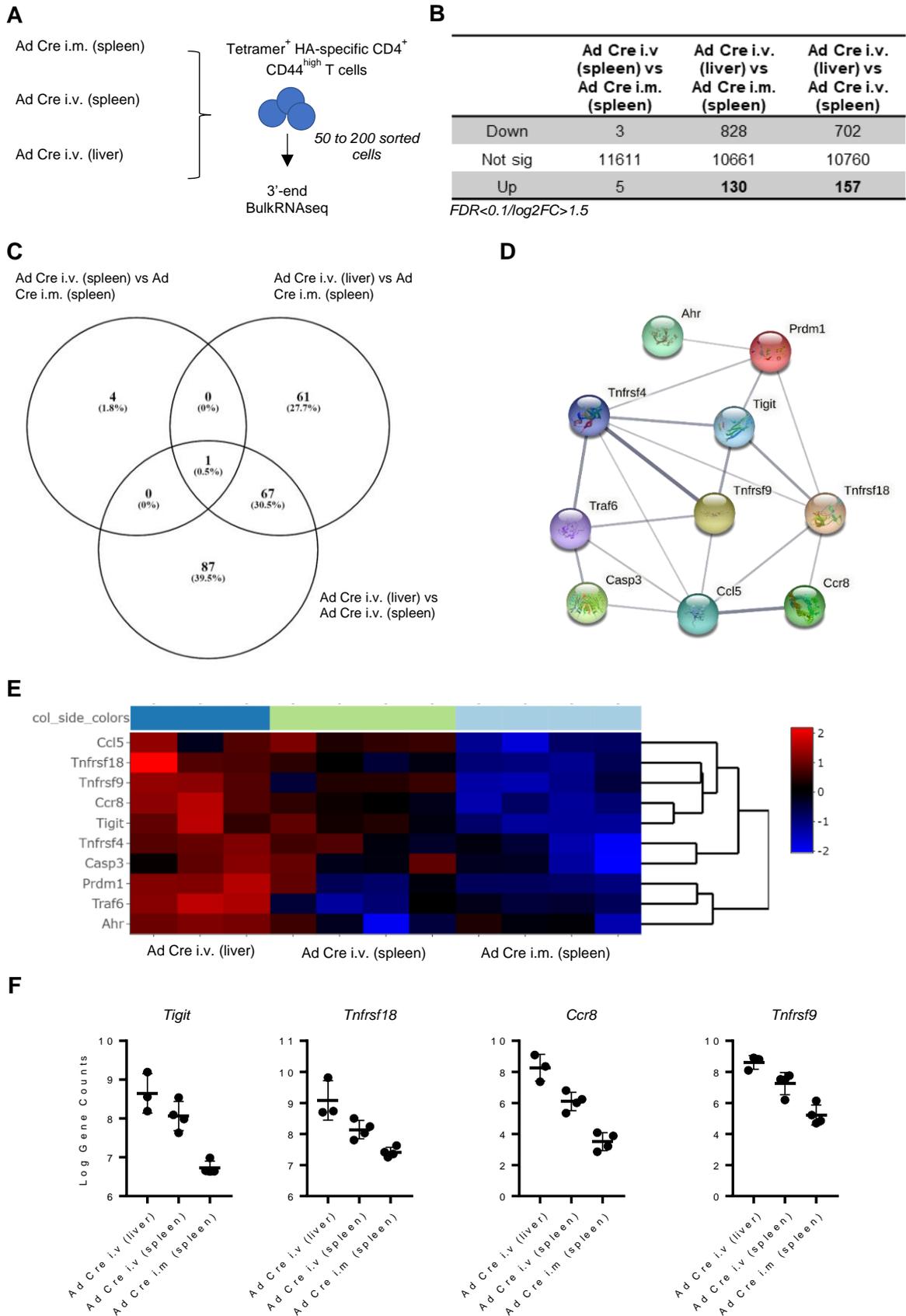
## Liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in Ad Cre i.v. mice display a pro-inflammatory transcriptomic profile

Since the presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the HA-expressing liver of Ad Cre i.v. mice is associated with exacerbated hepatic inflammation and liver damages, we decided to characterize these cells at the transcriptional level.

A 3'-end bulk RNA sequencing was performed on HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells (50 to 200 sorted cells) isolated from the spleen of Ad Cre i.m. mice and from the spleen and the liver of Ad Cre i.v. mice (Figure 2A). The differential analysis performed after classical QC check and primary analysis showed that HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the liver of Ad Cre i.v. mice display a different transcriptomic profile compared to the HA-specific cells from the spleen of both Ad Cre i.v. and i.m. groups (Figure 2B).

Focusing on up-regulated genes in HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from the liver of Ad Cre i.v. revealed that these cells up-regulate the expression of 130 and 157 genes compared to their splenic counterparts from Ad Cre i.m. mice and Ad Cre i.v. mice respectively, with 67 shared genes (Figure 2B-C, Supplementary figure 9). Interestingly, among these 67 genes, we identify a specific immune cluster (Figure 2D-E-F). HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver of Ad Cre i.v. mice display transcriptomic up-regulation of the pro-inflammatory chemokine *Ccl5*, and several receptors from the TNFR family which are up-regulated on activated T cells like *Tnfrsf18* (GITR), *Tnfrsf9* (4-1BB) and *Tnfrsf4* (OX40) (Figure 2D-E-F). These cells also display a significant up-regulation of regulatory markers, like *Tigit*, *Prdm1* (BLIMP-1), *Traf6* and *Ahr*, and of the chemokine receptor *Ccr8* (Figure 2D-E-F).

Taken together, these data suggest that liver-infiltrating HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in Ad Cre i.v. mice are highly activated T cells and could be linked to the immune reactivity against HA and liver damages. The up-regulation of immune regulatory genes are probably due to the chronic antigen presentation and the environment of the liver.



**Figure 2 : HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from the liver of Ad Cre i.v. mice have a distinct transcriptomic profile.**

(A) Design of the three groups of sorted splenic and liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from immunized mice with Ad Cre i.m or Ad Cre i.v. (B) Table representation of down- and up-regulated genes with a FDR < 0.1 and a

log<sub>2</sub>FC > 1.5. (C) Graphic representation of shared differential up-regulated genes by liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells. (D) Representation of a cluster of genes based on up-regulated genes observed in liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells. (E) Heat map representation of a selection of major genes related to the T cell biology up-regulated in liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells. (F) Graph representation of the expression level of selected genes by HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells (logarithmic normalized gene counts).

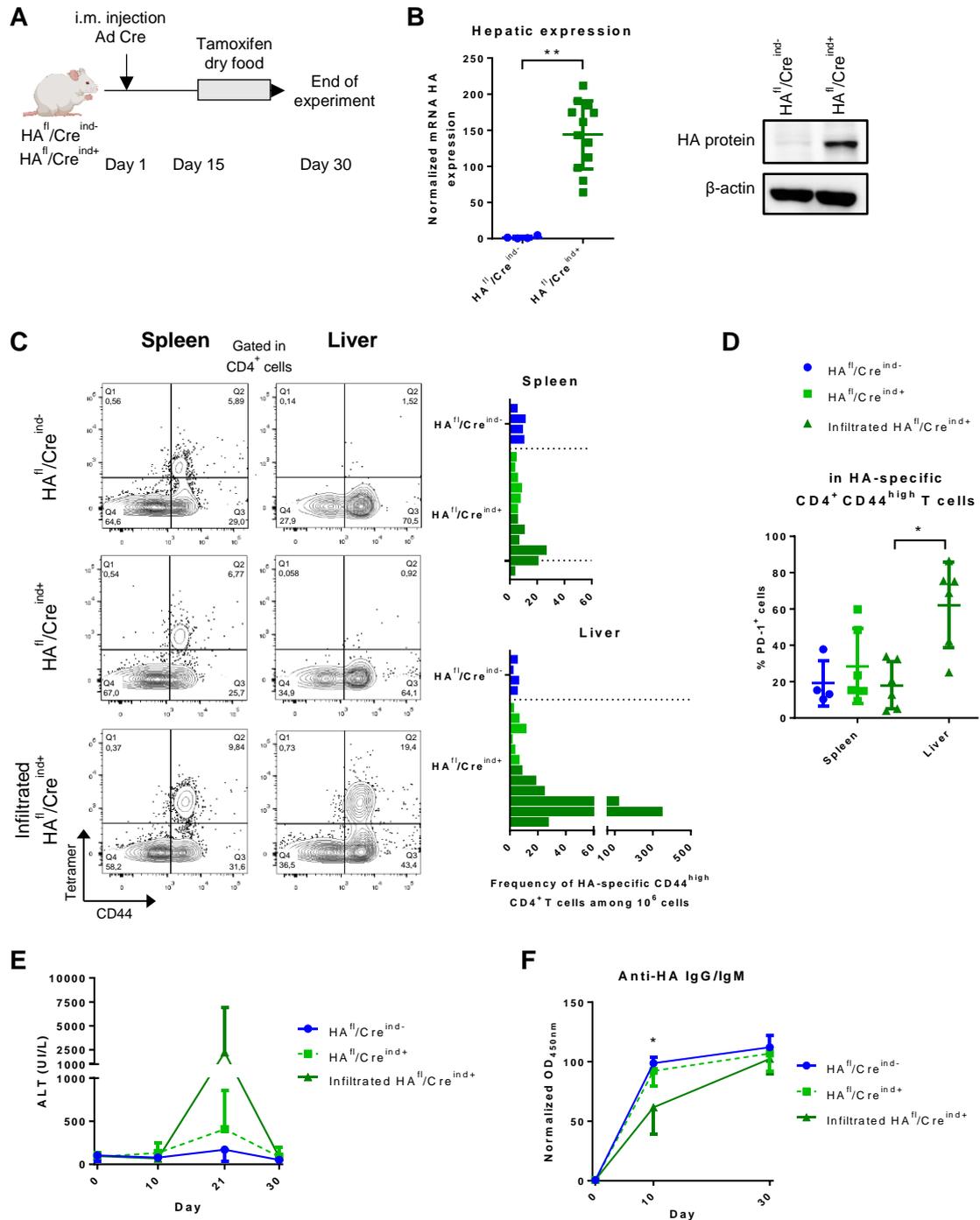
## Antigen expression in the liver post-peripheral immunization leads to intra-hepatic recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells

HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells are observed in the liver of mice only after Ad Cre i.v. injection, but it is not clear if these cells are generated within the liver or recruited from the periphery. We hypothesized that peripherally activated HA-specific memory T cells were recruited to the liver following local HA expression. For this, we analysed the consequences of a tamoxifen-induced hepatic expression of the antigen HA in peripherally pre-immunized mice. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice were immunized by a single i.m. injection of Ad Cre. After 14 days, mice were fed with tamoxifen dry food for 14 days (Figure 3A).

As expected, tamoxifen induced HA expression only in the liver of HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (Figure 3B). HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were detected in spleen of all groups of mice at similar frequencies (per 10<sup>6</sup> cells: 8.75 ± 2.63 in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice; 8.50 ± 7.18 in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice), which confirms that all mice were indeed pre-immunized (Figure 3C). Tamoxifen induction of HA hepatic expression in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice leads to a massive hepatic infiltration of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in 50% of these mice (per 10<sup>6</sup> cells: 4.50 ± 1.73 in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice; 4.83 ± 3.66 in non-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice; 89.67 ± 131.10 in liver-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice) (Figure 3C). In the infiltrated liver of HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells were enriched compared to their splenic counterpart (spleen: 18.06 ± 13.11%; liver: 62.13 ± 23.49%) (Figure 3D), while frequency of splenic and hepatic total memory CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells were still low (Supplementary figure 5). A hepatitis was associated with this antigen-specific immune response in liver-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, as shown by the increase in AST/ALT levels after HA hepatic expression induction (Figure 3E) and a residual diffuse infiltrate in the liver at the end of experiment (Supplementary figure 6). The humoral response, as measured by serum levels of anti HA IgG/IgM was comparable in mice of all groups at the end of the experiment. However, it is noteworthy that the mice that developed hepatitis associated with presence of liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells after tamoxifen diet are those in which the pre-immunisation had led to the weakest humoral immune response (HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice: 92.25 ± 12.87 a.u. in non-infiltrated; 61.60 ± 22.32 a.u. in liver-infiltrated) (Figure 3F).

Thus, the expression of an antigen in the liver under pre-immunization condition is a factor to induce a local HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells recruitment associated to hepatitis, explaining the

presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver after i.v. Ad Cre infection as shown in Figure 1. These data also suggest that a weak pre-immunisation may be necessary to induce this local recruitment.



**Figure 3 : Induction of antigen expression in the liver of pre-immunized mice leads to intra-hepatic recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 4) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 12) receive a single i.m. injection of Ad Cre (1,5.10<sup>9</sup> ip). From day 15 to day 30, mice are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg). Mice are sacrificed at day 30. (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression. β-actin was used as loading control. (C) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated

among  $10^6$  total cells (grey and black bars respectively represent HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice without or with antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells infiltration in the liver). (D) Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. (E) Plasma samples were collected before the start of the experiment and at days 10, 21 and 30 for dosage of ALT. (F) Before the start of experiment, at day 10 and at the end of experiment, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. All results are normalized and represent the mean (+ SD). p values were calculated using non-parametric Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA, ns = no significance, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01.

## The hepatic environment impacts the transcriptomic profile of infiltrating HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells

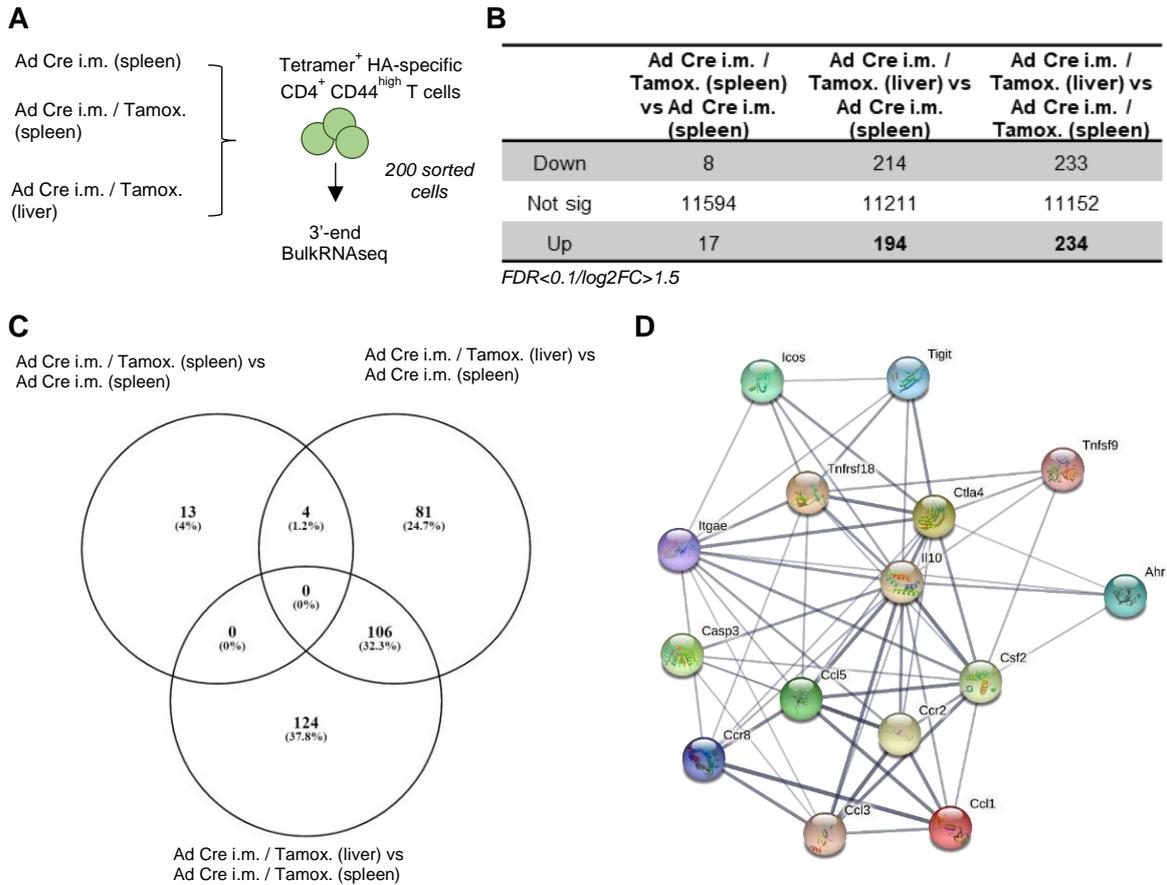
HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells, generated by the i.m. injection of Ad Cre, are recruited in the liver after HA hepatic expression induction, suggesting that they mediate local reactivity and should present a pro-inflammatory transcriptomic profile. Thus, their transcriptomic profile was analysed by using 3'-end bulk RNA sequencing. We compared the transcriptomic profile of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells isolated from the spleen of mice that were only immunized (Ad Cre i.m.) and from the spleen and liver of pre-immunized HA-expressing mice (Ad Cre i.m. + Tamoxifen) (Figure 4A).

As observed before (Figure 2), liver specific cells have a distinct transcriptomic profile compared to cells isolated from the spleen (Figure 4B-C). Liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells up-regulate the expression of 234 genes compared with their splenic counterpart and 194 genes compared to splenic cells isolated from immunized Ad Cre i.m. mice, with 106 common up-regulated genes (Figure 4B-C). Within the total 311 up-regulated genes, an immune cluster was identified (Supplementary figure 10). When focusing only on the 106 common up-regulated genes, clustering analysis reveals that liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells display up-regulation of chemokines-associated genes and of genes implicated in cell migration (*Ccr8*, *Ccl1*, *Ccl5*, *Ccr2*, *Ccl3*, *Csf2*, *Itgae*) (Figure 4D). These cells also up-regulate the expression of activation and regulatory genes like *Tigit*, *Ctla4*, *Tnfrsf18* (GITR), *Tnfrsf9* (4-1BB) and *Ahr* and up-regulate the expression of the *Il10* gene.

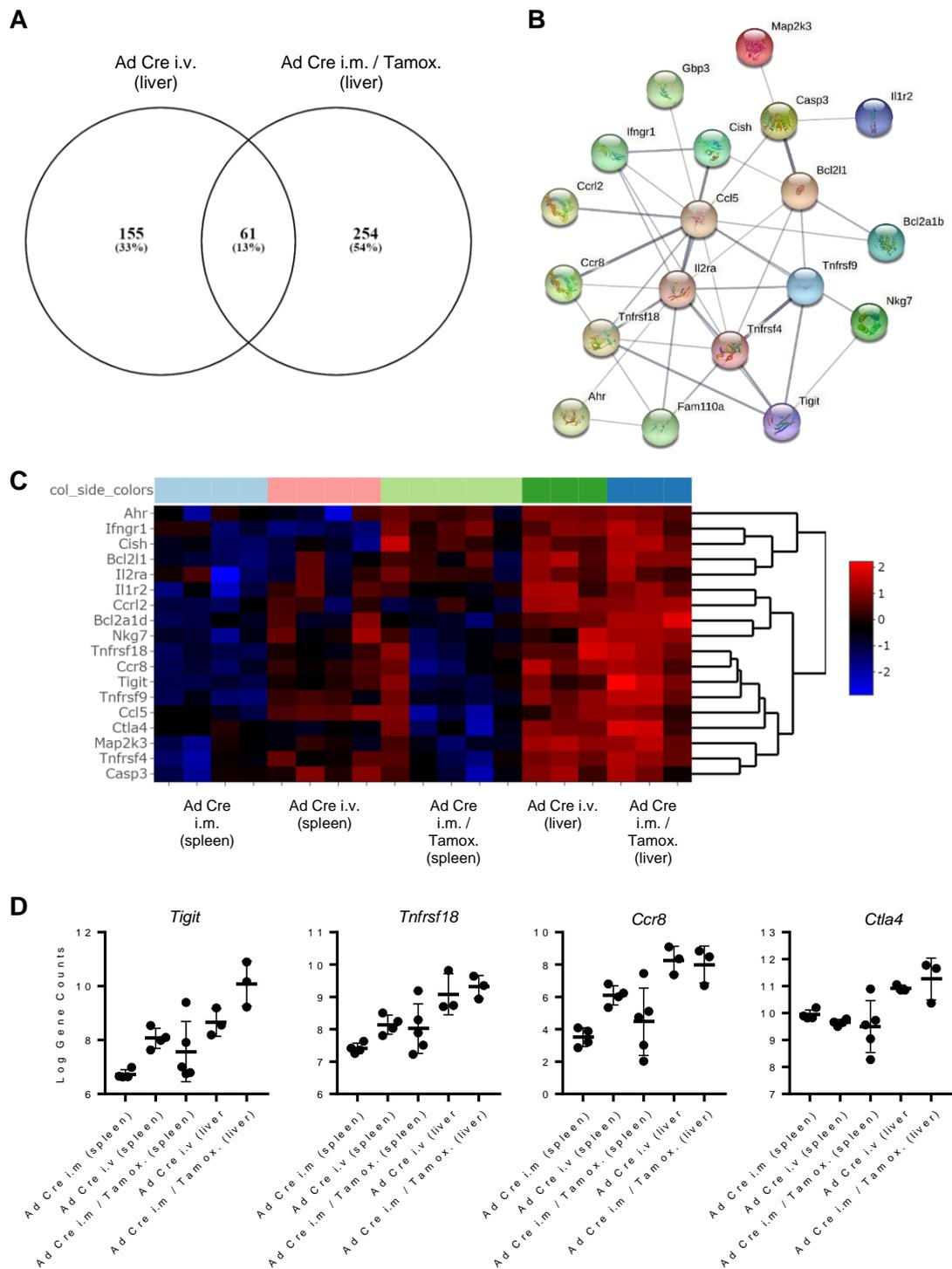
Interestingly, the specific up-regulated genes from our two models of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells recruitment in the liver (Ad Cre i.v. and Ad Cre i.m. + Tamoxifen) share a similar immune signature (Figure 5, Supplementary figure 12). The analysis of the 61 shared genes shows a common specific signature of liver-infiltrating HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells which is characterized by the expression of *Tigit*, *Tnfrsf18* (GITR), *Tnfrsf9* (4-1BB), *Ccr8* and *Ctla4* (Figure 5B-C-D, Supplementary figure 13).

These data comfort the idea that HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells infiltrating the liver are highly activated and up-regulate immune regulatory molecules like *Tigit* and *Ctla4* which reflect a chronic antigen activity but also a pathway of exhaustion. Interestingly, cytokine and chemokine receptor transcriptomic profile of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver share the same pro-inflammatory signature with the splenic HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells, independently of

HA expression in the liver (Supplementary figure 11). This transcriptomic signature is characterized by high expression of *Ifng*, *Tnf*, *Cxcr3* and *Cxcr6* genes and reflects a functional effector Th1 profile.



**Figure 4 : HA expression by hepatocytes after immunization induce a distinct transcriptomic profile of liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells.** (A) Design of the three groups of sorted splenic and liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from immunized mice with Ad Cre i.m and receiving tamoxifen or not after 2 weeks (B) Table representation of down- and up-regulated genes with a *FDR* < 0.1 and a *log*<sub>2</sub>*FC* > 1.5. (C) Graphic representation of shared differential up-regulated genes by liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells. (D) Representation of a cluster of genes based on up-regulated genes observed in liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells.



**Figure 5 : Shared immune profile of liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from both mouse models associated with HA expression in the liver. (A) Graphic representation of shared differential up-regulated genes by liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells. (B) Representation of a cluster of genes based significantly up-regulated by both liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from Ad Cre i.v. mice and Ad Cre i.m. + Tamoxifen mice. (C) Heat map representation of a selection of major genes related to the T cell biology from the cluster in (B) and CTLA4. (D) Graph representation of the expression level of selected genes by HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells (logarithmic normalized gene counts).**

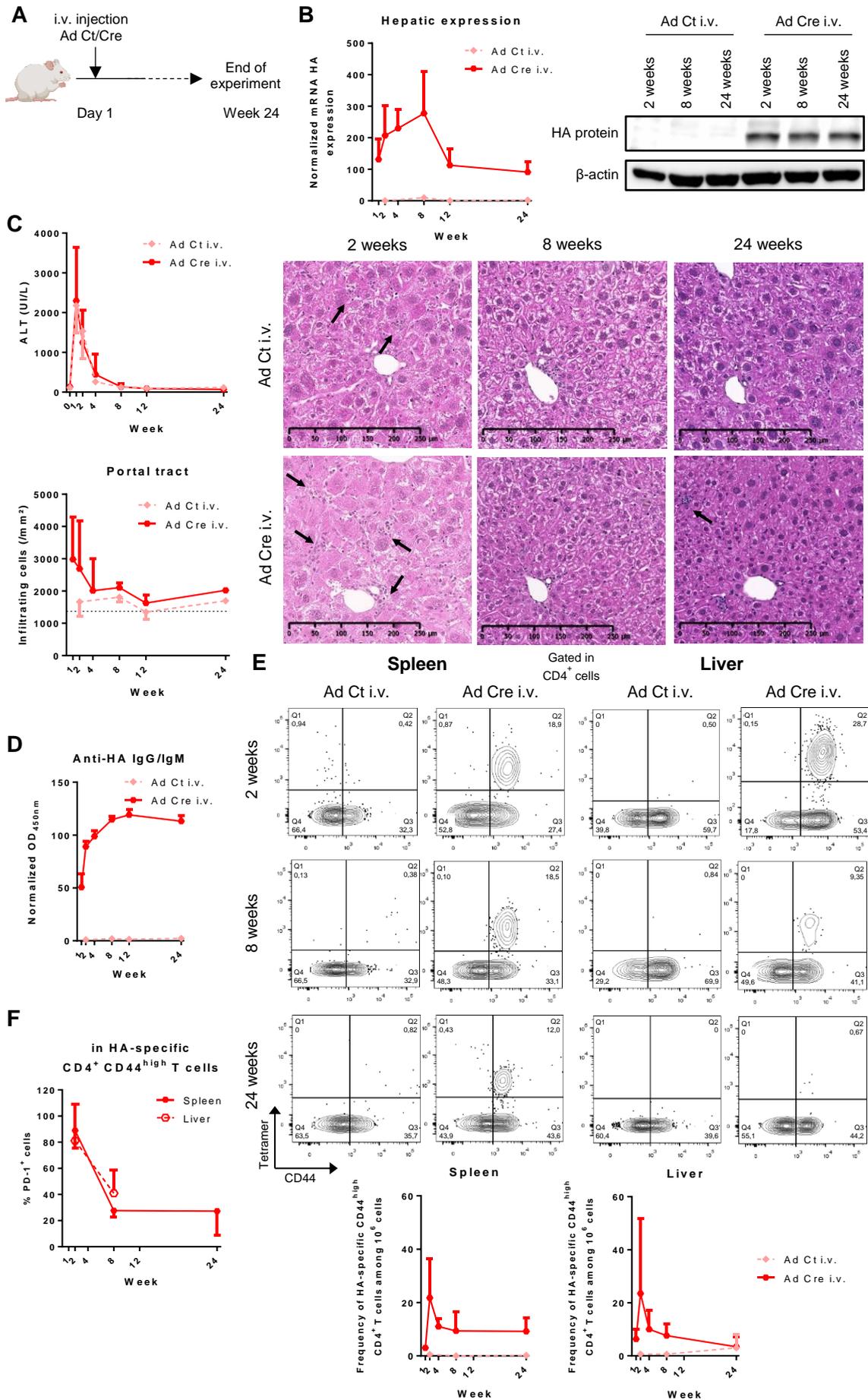
## **Hepatic antigen expression induced by an adenovirus leads to a long-term peripheral antigen-specific response but local liver tolerance**

In the first part of this work, we studied the first event involved in the generation and recruitment of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell in the liver. However, liver autoimmunity is a long-term chronic disease in human. Thus, HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice received either a unique i.v. injection of Ad Cre or of Ad Ct and were monitored for 24 weeks (Figure 6A).

24 weeks after i.v. injection of Ad Cre, expression of HA was still detectable in the liver (Figure 6B). Rapidly the hepatic damages are controlled in our mouse models. The peak of AST/ALT transaminases plasma levels observed at 1 week decreased to return to a basal level after 8 weeks (Figure 6C). Likewise, liver infiltration and damages in Ad Cre i.v. mice decreased and were resolved after 4 weeks (Figure 6C). This is also associated with a decrease of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver which suggest a local clearance over time (Figure 6E).

Interestingly, the global peripheral HA-specific adaptive immune response was only mildly impacted by the persistent HA expression in the liver. Anti-HA IgG and IgM were still detectable 24 weeks after injection, with a plateau reached after 8 weeks (Figure 6D). HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in Ad Cre i.v. mice were still detectable in the spleen at 24 weeks (Figure 6E). Long-lasting HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were still CD25<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup>, although frequency of PD-1<sup>+</sup> cells decreased 2 weeks after Ad Cre injection (Figure 6F, Supplementary figure 7, Supplementary figure 8). Finally, long-lasting peripheral HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells maintain their transcriptomic profile over time (Supplementary figure 14, Supplementary figure 15).

These data demonstrate a local HA-tolerance over time, but a limited impact on the peripheral pool of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. The persistence of a peripheral pool of reactive CD4<sup>+</sup> T cells could be involved in the chronic inflammatory events with the implication of other additional immune events.



**Figure 6 : Induction of an antigen expression in the liver with concomitant inflammation using an adenoviral vector induces a chronic antigen-specific response.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice receive a single i.v. injection ( $3.10^9$  ip) of Ad Ct or Ad Cre. Mice are sacrificed at week 1 (Ad Cre n = 3), 2 (Ad Ct n = 7 ; Ad Cre n = 13), 4 (Ad Cre n = 3), 8 (Ad Ct n = 8 ; Ad Cre n = 12), 12 (Ad Ct n = 3 ; Ad Cre n = 6) and 24 (Ad Ct n = 5 ; Ad Cre n = 9). (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression.  $\beta$ -actin was used as loading control. (C) Plasma samples were collected before the start of the experiment and for each time point for dosage of ALT. For each time point, paraffin-embedded liver sections are stained with HPS coloration to analyse liver infiltration (count of infiltrating cells around portal tracts ; dotted line represent a basal infiltration in a naïve HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice) and morphology (x10 ; arrows point lymphocytic infiltration). (D) For each time point, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. (E) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25 CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated among  $10^6$  total cells. (F) Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. All results are normalized and represent the mean (+ SD).

## Discussion

In this study, we report that the induction of the expression of a model neo-antigen by hepatocytes in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance. The addition of an inflammatory cue, with an adenoviral vector, is sufficient to overcome immune tolerance and provoke hepatic local antigen reactivity. This leads to the generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen and in the liver and is associated with liver damages which mimics a possible first step of local autoreactivity. Liver-infiltrating CD4<sup>+</sup> T cells display a specific transcriptomic profile showing a highly activated pro-inflammatory signature and up-regulating immune checkpoint molecules. Transcriptomic analysis of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells reveals that these cells are characterized by the up-regulation of *Ifng*, *Tnf*, *Cxcr3* and *Cxcr6* genes and low or no expression of the *Ccr6* gene, which is analogous to a Th1 phenotype (CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>)<sup>25</sup>. Moreover, CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are strongly associated with systemic inflammation in co-infected pulmonary tuberculosis and HIV patients<sup>25</sup> and CXCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells are the major source of pro-inflammatory cytokines in the inflamed tissue of an inflammatory bowel disease murine model<sup>26</sup>, suggesting a pathogenic pro-inflammatory role of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in our models, consistent with the hepatic inflammation and damages observed in the liver of HA-expressing mice. Nonetheless, HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells infiltrating the liver display a specific transcriptomic profile, distinct from their splenic counterparts, characterized by the up-regulation of the activation-associated genes *Tigit*, *Tnfrsf18* (GITR), *Tnfrsf9* (4-1BB), *Ccr8* and *Ctla4*. Interestingly, this transcriptomic signature is similar to the one observed in autoreactive SLA-specific CD4<sup>+</sup> T cells we recently identified in AIH patients with anti-SLA antibodies<sup>19</sup> and share similarities with tissue resident CD4<sup>+</sup> T cells in pathological situation<sup>27</sup>. The autoreactive cells identified in AIH are characterized by a CD4<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> phenotype and an important expression of *IFNG*, *TNF*, *TIGIT* and *CTLA4* genes. These similarities between human and murine antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells suggest an autoreactive profile of these cells in mice and confirm that our murine models are accurate tools to further study the early events implicated in the generation of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in AIH.

The different murine models of type 2 AIH directly target autoantigen expression in the liver using i.v. injection of an adenoviral vector encoding human FTCD or human CYP2D6. This leads to induction of an autoreactive response characterized by an antibody production and

an important hepatitis mediated by Th1 and Th17 cells<sup>20,21</sup>. While these models directly target the autoantigen via a mechanism of molecular mimicry, they lack in depth characterization of the antigen-specific T cell responses. Here, using an indirect antigen induction method (Ad Cre leading to HA expression), first we demonstrate that the expression of a neo-antigen in the liver in an immune-enhanced environment caused by an adenoviral vector is sufficient to generate an antigen-specific response, and second this response is marked by the generation of specific antibodies and antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen and in the liver. As for FTCD and CYP2D6 murine models, the presence of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the antigen-expressing liver in our model is associated with an important hepatic inflammation and major hepatic damages, demonstrating the initiation of an autoreactive response in accordance with the signature of the infiltrating HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells.

Using two different models of induction of hepatic antigen expression, we show that antigen expression in the liver, either concomitant to a local inflammation cue (Ad Cre i.v.) or following a peripheral immunization (Ad Cre i.m. + Tamoxifen), mediates the hepatic recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. This raises the question of the first site of the immune reactivity against the antigen in AIH, either within the liver or peripherally. The previous studies using AIH mouse models did not allow to conclude on this point. In our model, we observed a weak HA expression in the spleen after Ad Cre i.v. injection which could be the source of a peripheral immunisation. Moreover, the liver-isolated HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from both our models share very similar transcriptomic programs. Thus, a concomitant antigen expression in the liver with the hepatic inflammation could explain the local accumulation and expansion of CD4<sup>+</sup> T cells after peripheral generation.

In pre-immunized mice, HA expression in the liver led to the local recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in 50% of the animals. Interestingly, we found that pre-immunization in these liver-infiltrated mice had led to a weaker humoral immune response compared to their liver-non-infiltrated counterparts. This suggests that a less effective i.m. injection of Ad Cre in some mice could have led to the expansion of high avidity CD4<sup>+</sup> T cells with a higher activation potential<sup>28-31</sup> allowing their recruitment in the HA-expressing liver. This would be consistent with their activated phenotype and transcriptomic profile.

Despite autoreactive responses development, the HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell infiltrate in the liver disappears over time concurrently to hepatitis resolution, demonstrating a control of the autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell population in the liver allowing a long-term tolerance of antigen expression. In patients, AIH is a chronic disorder evolving insidiously, fulminant hepatitis is rare, which suggests also a local control of the autoreactive response. Our capacity to track CD4<sup>+</sup> T cells specific to a liver antigen in both early stage of murine autoreactivity and in chronic phase of AIH patients reveals an up-regulation of regulatory markers like PD-1, TIGIT or CTLA-4 in autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells<sup>19</sup>. These immune checkpoint molecules could participate to the inhibition of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell responses in the liver<sup>32-34</sup> and their level of expression is probably subjected to a very fine tuning. Despite a local control of the autoreactive response, humoral response and peripheral antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells are not affected in our model. These peripheral specific cells maintain their pro-inflammatory transcriptomic profile over time, suggesting a potential to reactivation. Additional immune events may be required to trigger a chronic immune response in our model.

To conclude, autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells are central to the immunopathogenesis of AIH. These early actors of the first steps of hepatic autoreactivity are recruited in the liver following hepatic antigen exposure and mediate important hepatic damages. In mice, a local control of this cellular autoreactive response rapidly emerges allowing a long-term tolerance of antigen expression, without chronic hepatitis. Thus, the analysis of immunomodulatory molecules and pathways implicated in the local control of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in mice and the identification of potential extrinsic factors implicated in an acute-to-chronic transition could provide a better understanding of AIH initiation mechanisms and unveil new therapeutical targets to dampen immunopathogenesis of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in the liver of patients.

## **Abbreviations**

AIH: autoimmune hepatitis; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; CYP2D6 : cytochrome P450 2D6; FTCD: Formiminotransferase cyclodeaminase; HA: hemagglutinin; IgG: immunoglobulin G; i.m.: intramuscular; i.v.: intravenous; LC-1 : liver cytosol 1; LKM-1 : liver kidney microsomal type 1; MHC(-II): (class II) major histocompatibility complex; NPCs: non-parenchymal cells; SLA : soluble liver antigen; Tregs: regulatory T cells; TTR : transthyretin

## **Acknowledgments**

We are grateful to Pr. Liblau and Dr M Vasseur-Cognet for sharing the Rosa26 HA floxed and the TTR-Cre inducible mice strains.

We thank the NIH Tetramer Core Facility (contract number 75N93020D00005) for providing the class II HA-specific tetramers.

We wish to thank the UTE IRS-UN animal facility of the SFR Santé François Bonamy (Nantes Université, INSERM UAR016, CNRS UAR3556).

We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-INBS-04).

## **Fundings**

This work was supported by institutional grants from INSERM and Nantes Université to the Center for Research in Transplantation and Translational Immunology (CR2TI). This work was funded by the “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” and was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant number FDT202106013211) to Anaïs Cardon. It has been also carried out thanks to the support of the LabEx IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the “Investissements d’Avenir” French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This work was also supported by the patient association “Association pour la lutte contre les maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires” (ALBI) and by “Association Française pour l’Étude du Foie-Société Française d’Hépatologie” (AFEF).

## Conflicts of interest

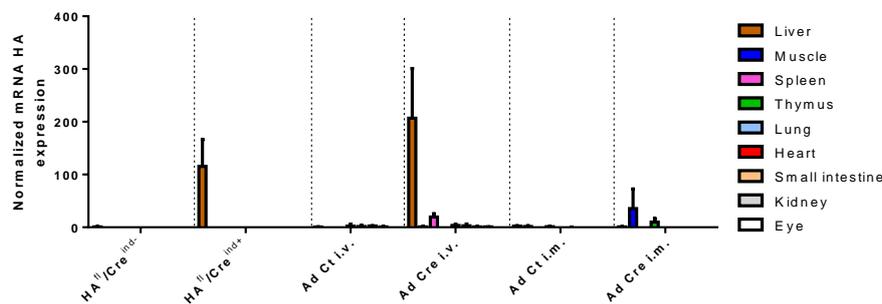
Authors declare no conflicts of interest.

## References

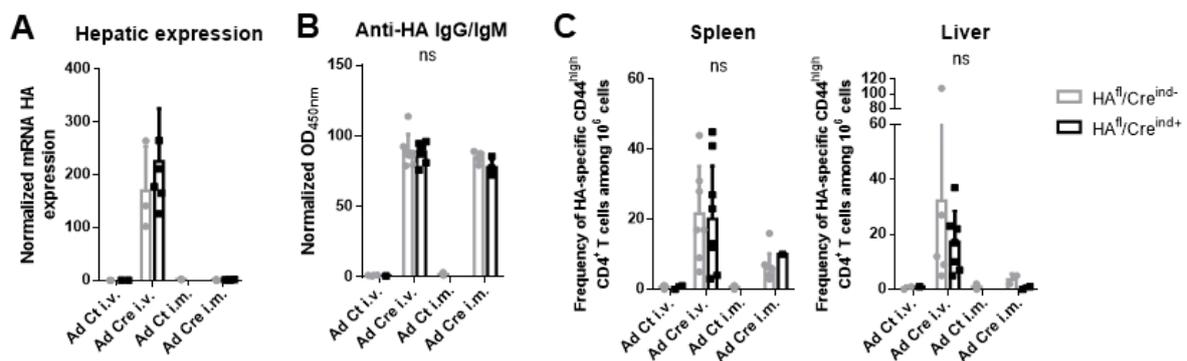
1. Kubes, P. & Jenne, C. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 247–277 (2018).
2. Bénéchet, A. P. et al. Dynamics and genomic landscape of CD8+ T cells undergoing hepatic priming. *Nature* 574, 200–205 (2019).
3. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J. Virol.* 77, 4911–4927 (2003).
4. Carambia, A. et al. TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* 61, 594–599 (2014).
5. Heymann, F. et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatol. Baltim. Md* 62, 279–291 (2015).
6. Holz, L. E. et al. Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology* 135, 989–997 (2008).
7. Benseler, V. et al. Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 16735–16740 (2011).
8. Cardon, A., Conchon, S. & Renand, A. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 37, 79–85 (2021).
9. Sahebjam, F. & Vierling, J. M. Autoimmune hepatitis. *Front. Med.* 9, 187–219 (2015).
10. Manns, M. P. et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51, 2193–2213 (2010).
11. Francque, S., Vonghia, L., Ramon, A. & Michielsen, P. Epidemiology and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatic Med. Evid. Res.* 4, 1–10 (2012).
12. Renand, A. et al. Immune Alterations in Patients With Type 1 Autoimmune Hepatitis Persist Upon Standard Immunosuppressive Treatment. *Hepatol. Commun.* 2, 968–981 (2018).
13. Behfarjam, F., Nasser-Moghaddam, S. & Jadali, Z. Enhanced Th17 Responses in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Middle East J. Dig. Dis.* 11, 98–103 (2019).
14. Bovensiepen, C. S. et al. TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 203, 3148–3156 (2019).
15. Liang, M., Liwen, Z., Yun, Z., Yanbo, D. & Jianping, C. The Imbalance between Foxp3+Tregs and Th1/Th17/Th22 Cells in Patients with Newly Diagnosed Autoimmune Hepatitis. *Journal of Immunology Research* vol. 2018 e3753081 <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/3753081/> (2018).
16. Longhi, M. S. et al. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J. Hepatol.* 41, 31–37 (2004).
17. Oo, Y. H. et al. Liver homing of clinical grade Tregs after therapeutic infusion in patients with autoimmune hepatitis. *JHEP Rep. Innov. Hepatol.* 1, 286–296 (2019).

18. Peiseler, M. et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J. Hepatol.* 57, 125–132 (2012).
19. Renand, A. et al. Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* 73, 1379–1390 (2020).
20. Hardtke-Wolenski, M. et al. Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatology*. Baltimore, Md 58, 718–728 (2013).
21. Holdener, M. et al. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J. Exp. Med.* 205, 1409–1422 (2008).
22. Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A. & Vasseur-Cognet, M. A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology*. Baltimore, Md 35, 1072–1081 (2002).
23. Saxena, A. et al. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol.* Baltimore, Md 1950 181, 1617–1621 (2008).
24. Le Guen, V. et al. Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to pancreatic islet graft by inducing CD8(+) regulatory T cells. *J. Hepatol.* 66, 765–777 (2017).
25. Silveira-Mattos, P. S. et al. Differential expression of CXCR3 and CCR6 on CD4+ T-lymphocytes with distinct memory phenotypes characterizes tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Sci. Rep.* 9, 1502 (2019).
26. Mandai, Y. et al. Distinct Roles for CXCR6(+) and CXCR6(-) CD4(+) T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. *PLoS One* 8, e65488 (2013).
27. Oja, A. E., van Lier, R. A. W. & Hombrink, P. Two sides of the same coin: Protective versus pathogenic CD4+ resident memory T cells. *Sci. Immunol.* 7, eabf9393 (2022).
28. Billeskov, R. et al. Low Antigen Dose in Adjuvant-Based Vaccination Selectively Induces CD4 T Cells with Enhanced Functional Avidity and Protective Efficacy. *J. Immunol.* Baltimore, Md 1950 198, 3494–3506 (2017).
29. Collins, K. A. et al. Ultra-low dose immunization and multi-component vaccination strategies enhance protection against malaria in mice. *Sci. Rep.* 11, 10792 (2021).
30. Oling, V., Geubtner, K., Ilonen, J. & Reijonen, H. A low antigen dose selectively promotes expansion of high-avidity autoreactive T cells with distinct phenotypic characteristics: a study of human autoreactive CD4+T cells specific for GAD65. *Autoimmunity* 43, 573–582 (2010).
31. Ploquin, M. J.-Y., Eksmond, U. & Kassiotis, G. B cells and TCR avidity determine distinct functions of CD4+ T cells in retroviral infection. *J. Immunol.* Baltimore, Md 1950 187, 3321–3330 (2011).
32. Qin, W. et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front. Immunol.* 10, (2019).
33. Harjunpää, H. & Guillerey, C. TIGIT as an emerging immune checkpoint. *Clin. Exp. Immunol.* 200, 108–119 (2020).
34. Tai, X. et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood* 119, 5155–5163 (2012).

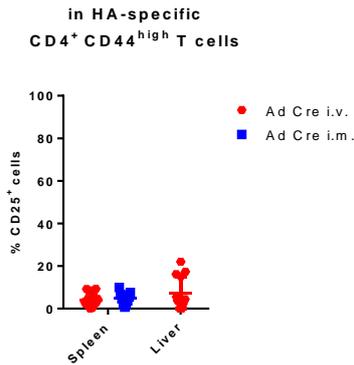
## Supplementary figures



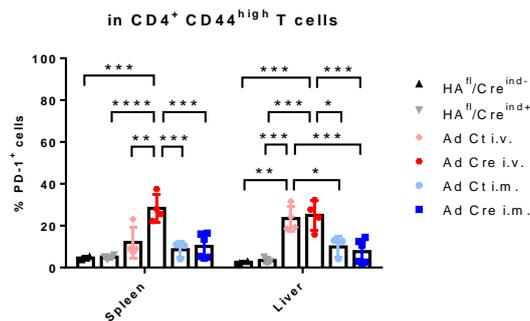
**Supplementary figure 1 : mRNA HA expression in different organs.** HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 5) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 9) are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg) for 14 days. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+/+</sup> mice receive a single i.v. injection (3.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 7) or Ad Cre (n = 9). HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+/+</sup> mice receive a single i.m. injection (1,5.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 3) or Ad Cre (n = 9). Mice are sacrificed at day 15. Quantitative RT-PCR analysis of mRNA HA expression in different organs. All results are normalized and represent the mean (+ SD).



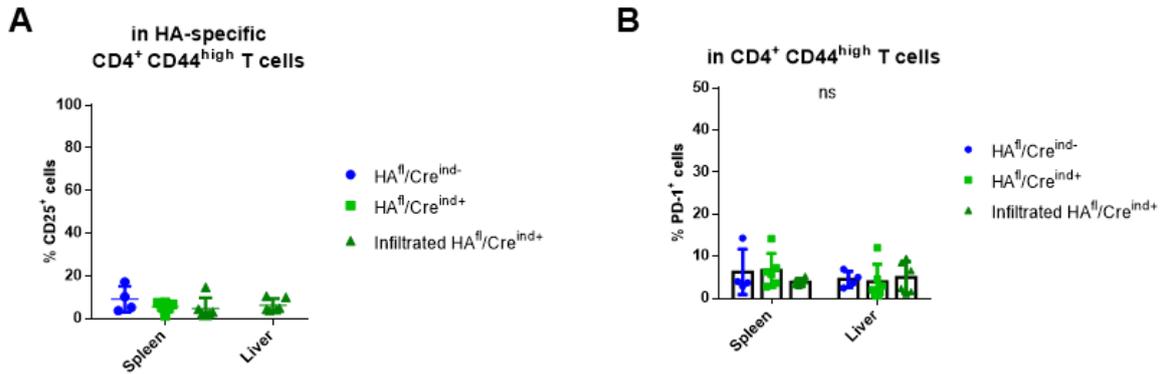
**Supplementary figure 2 : Effects of Ad Cre (i.v. or i.m.) in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice are similar.** HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice are used indiscriminately for Ad Cre protocols (i.v. or i.m.) and show similar levels of (A) mRNA HA levels, (B) anti-HA IgG and IgM and (C) HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in spleen and liver. All results represent the mean (+ SD). p values were calculated using non-parametric Kruskal-Wallis test between HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice in each condition, ns = no significance.



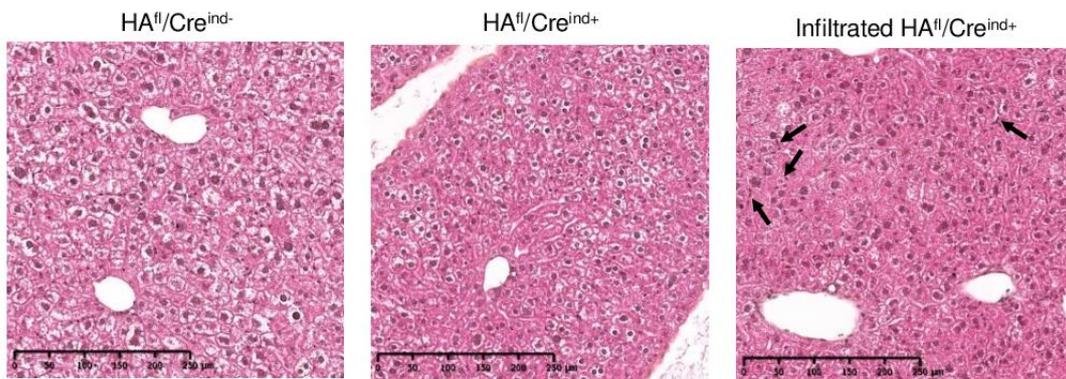
**Supplementary figure 3 : Phenotyping of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells induced by an i.v. or an i.m. Ad Cre injection.** Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, FoxP3, CD19) and analysed by flow cytometry. Percentage of CD25<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. Results represent the mean (+ SD).



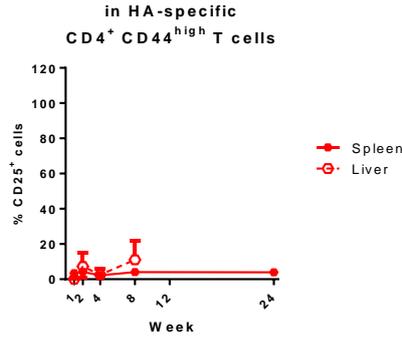
**Supplementary figure 4 : PD-1 expression in CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells.** HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 2) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 4) are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg) for 14 days. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice receive a single i.v. injection (3.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 4) or Ad Cre (n = 4). HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice receive a single i.m. injection (1,5.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 3) or Ad Cre (n = 6). Mice are sacrificed at day 15. Total splenocytes and liver NPCs are stained with Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD19 and analysed by flow cytometry. Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in spleen and liver are calculated among CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells populations. All results represent the mean (+ SD). p values were calculated using Tukey's multiple comparisons test, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001.



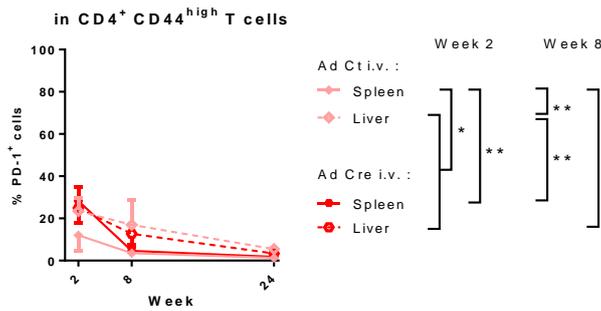
**Supplementary figure 5 : Phenotype of antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> T cells and total memory CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> pre-immunized mice.** HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 4) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 12) receive a single i.m. injection of Ad Cre (1,5.10<sup>9</sup> ip). From day 15 to day 30, mice are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg). Mice are sacrificed at day 30. Total splenocytes and liver NPCs are stained with Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, CD19 and analysed by flow cytometry. (A) Percentage of CD25<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in spleen and liver are represented. (B) Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in spleen and liver are calculated among CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells population. All results represent the mean (+ SD). p values were calculated using Tukey's multiple comparisons test, ns = no significance.



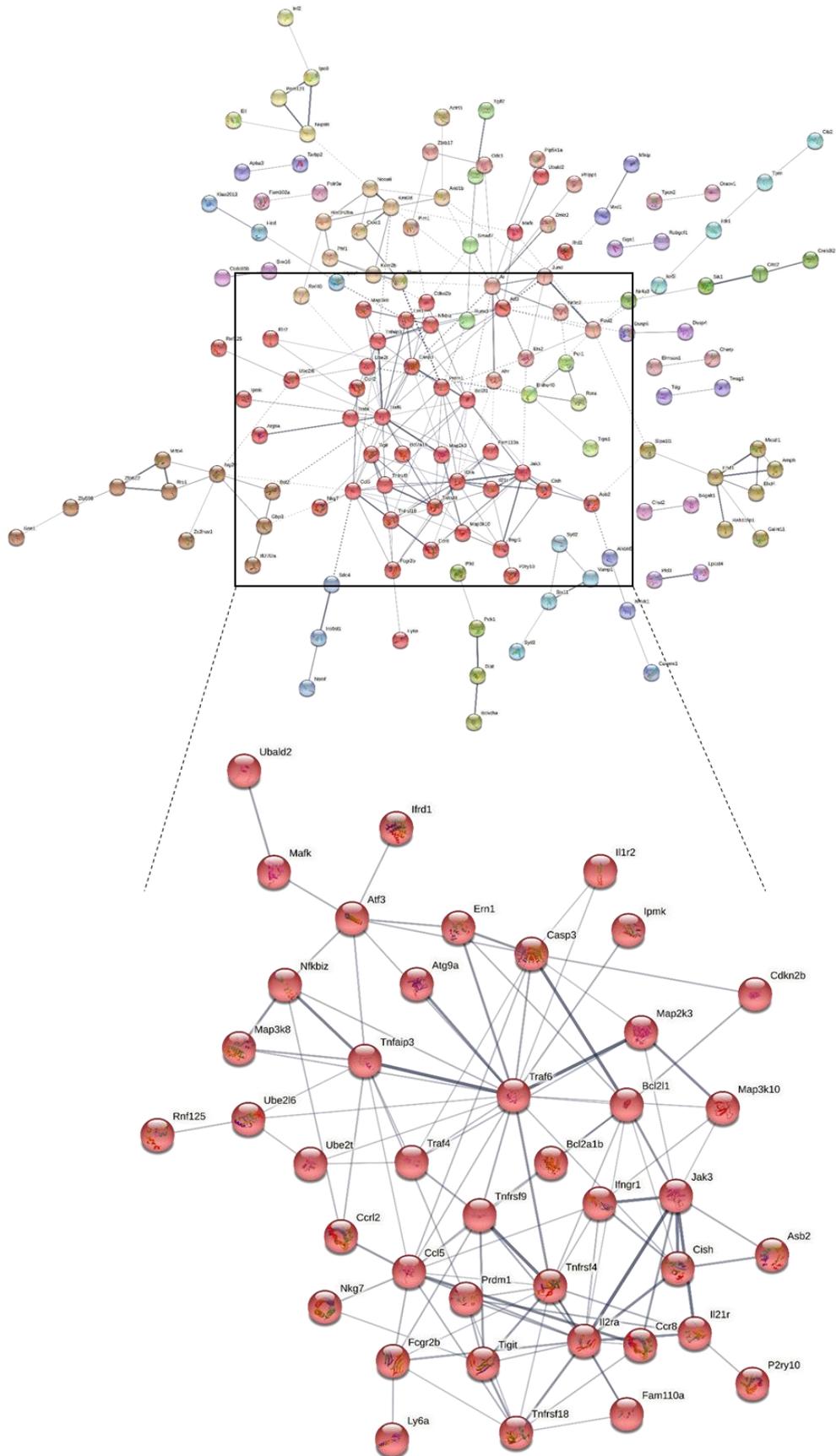
**Supplementary figure 6 : Liver-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice show a residual diffuse infiltrate.** At the end of the experiment, paraffin-embedded liver sections are stained with HPS coloration to analyse liver morphology (x10 ; arrows point lymphocytic infiltration).



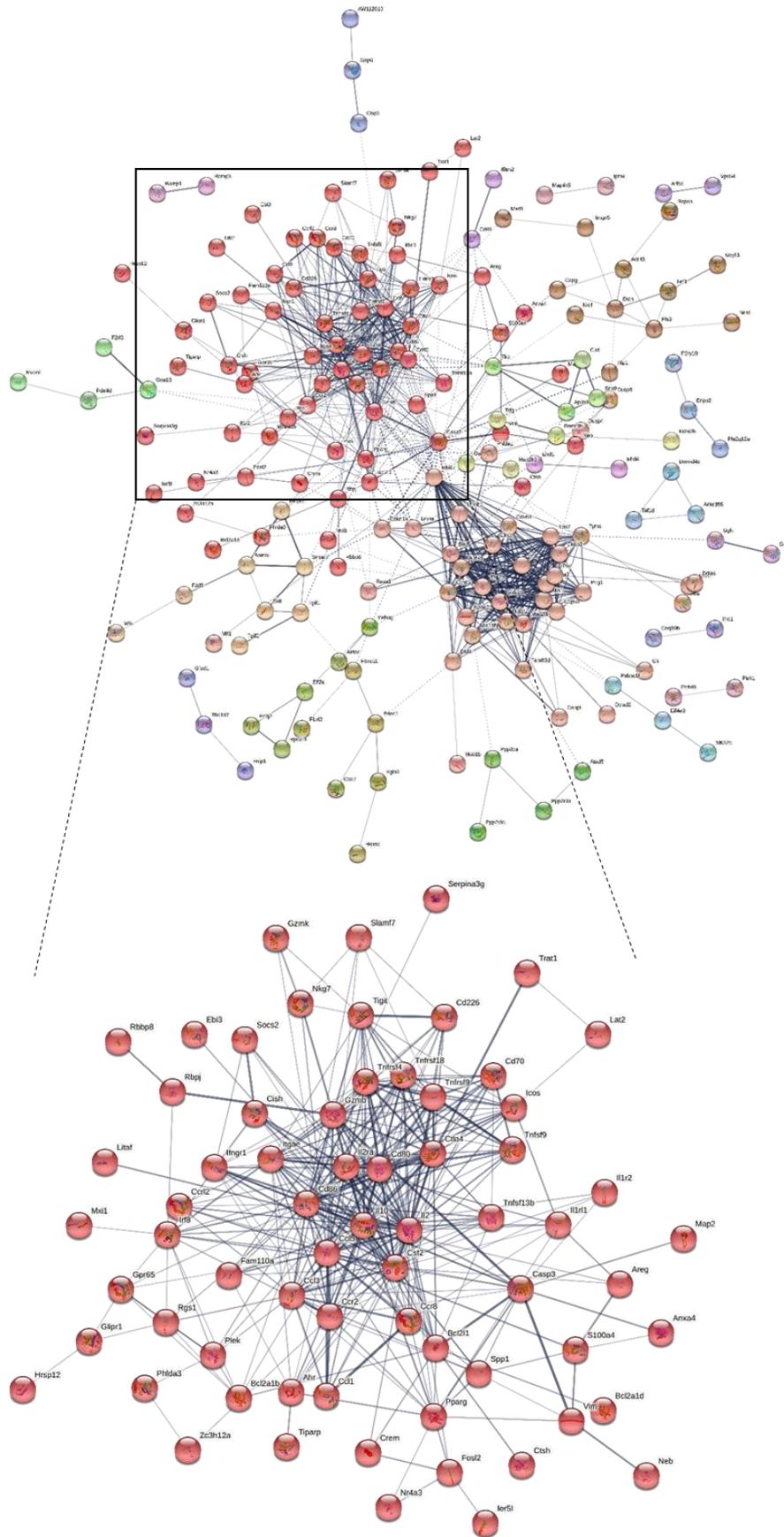
**Supplementary figure 7 : Phenotyping of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells induced by an i.v. Ad Cre injection.** Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, CD19) and analysed by flow cytometry. Percentage of CD25<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. Results represent the mean (+ SD).



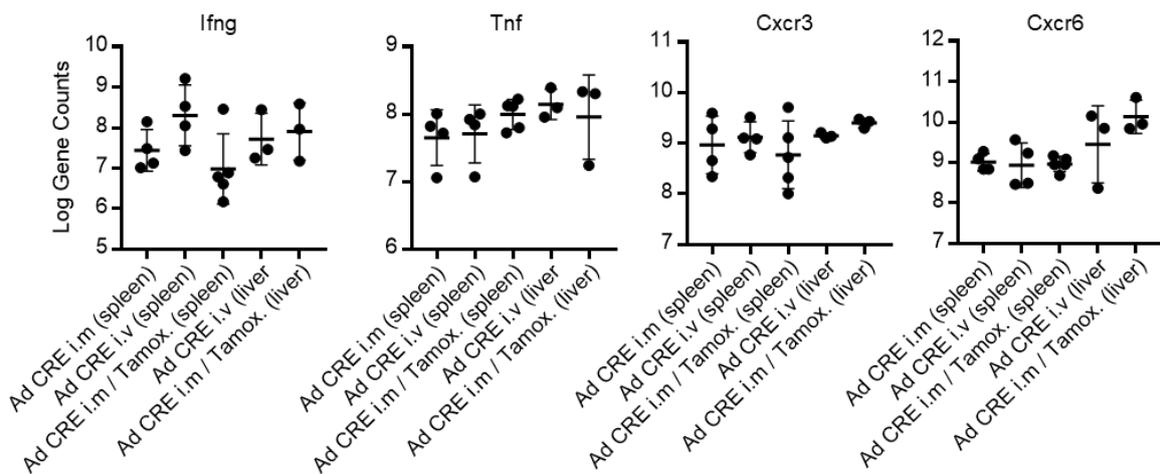
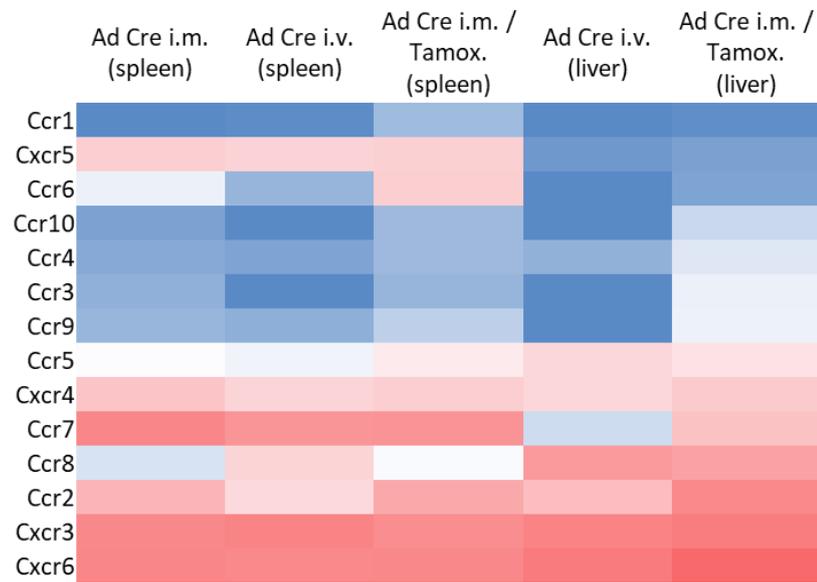
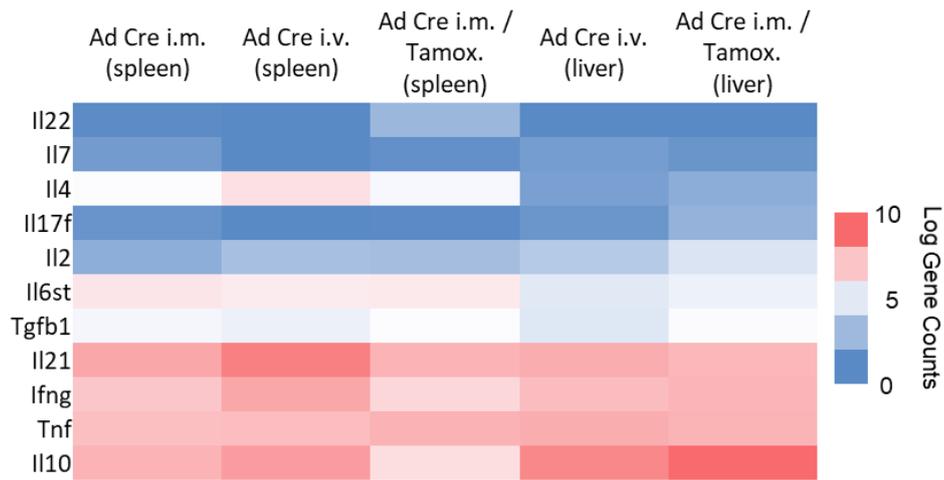
**Supplementary figure 8 : PD-1 expression in CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells after i.v. injection of Ad Ct or Ad Cre.** HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice receive a single i.v. injection (3.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct or Ad Cre. Mice are sacrificed at 2 (Ad Ct n = 4 ; Ad Cre n = 4), 8 (Ad Ct n = 6 ; Ad Cre n = 6) and 24 (Ad Ct n = 4 ; Ad Cre n = 5) weeks. Total splenocytes and liver NPCs are stained with Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD19 and analysed by flow cytometry. Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in spleen and liver are calculated among CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells population. All results represent the mean (+ SD). p values were calculated using Tukey's multiple comparisons test, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01.



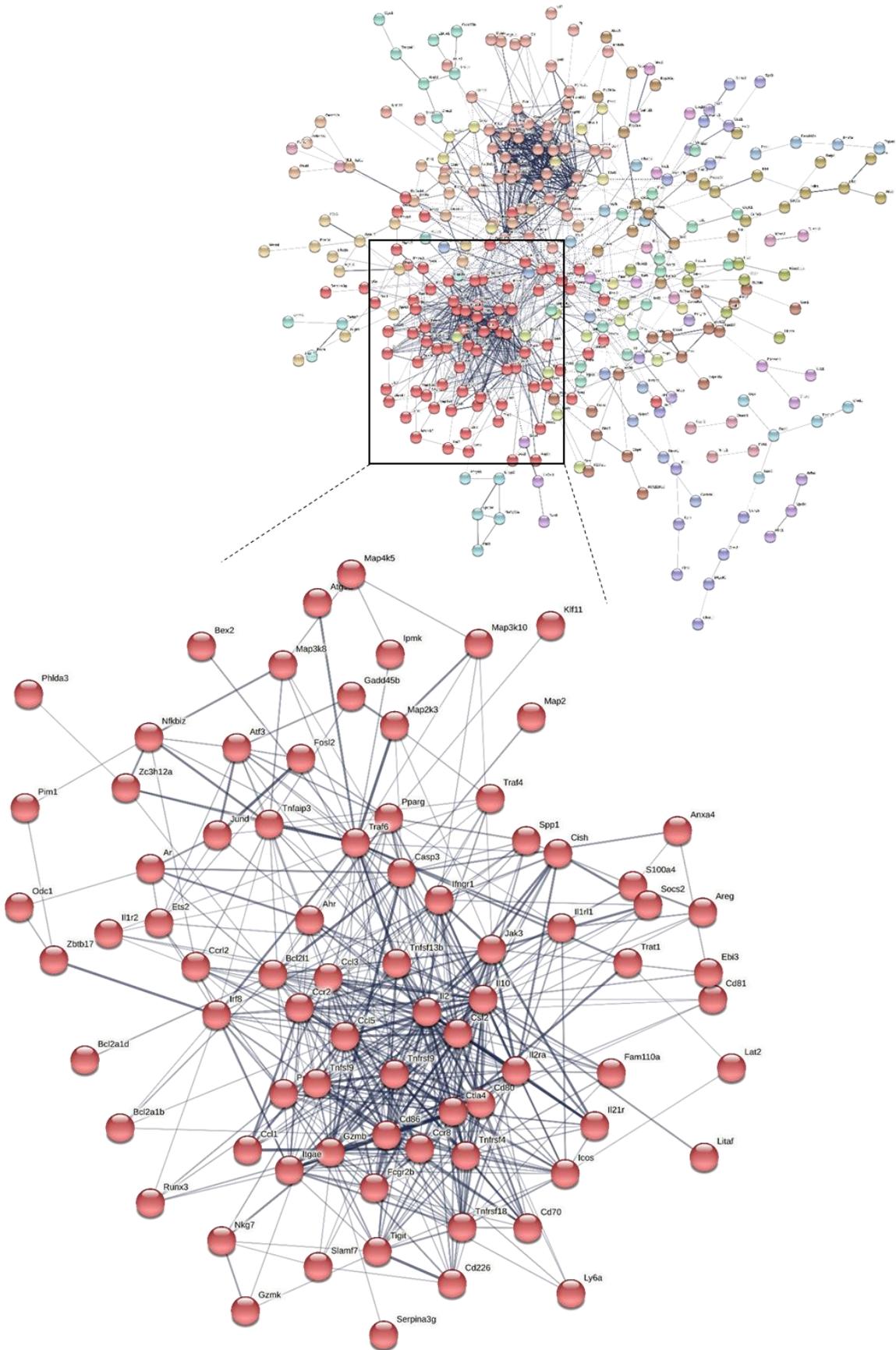
**Supplementary figure 9 : Up-regulated genes network of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the liver of Ad Cre i.v. mice.**



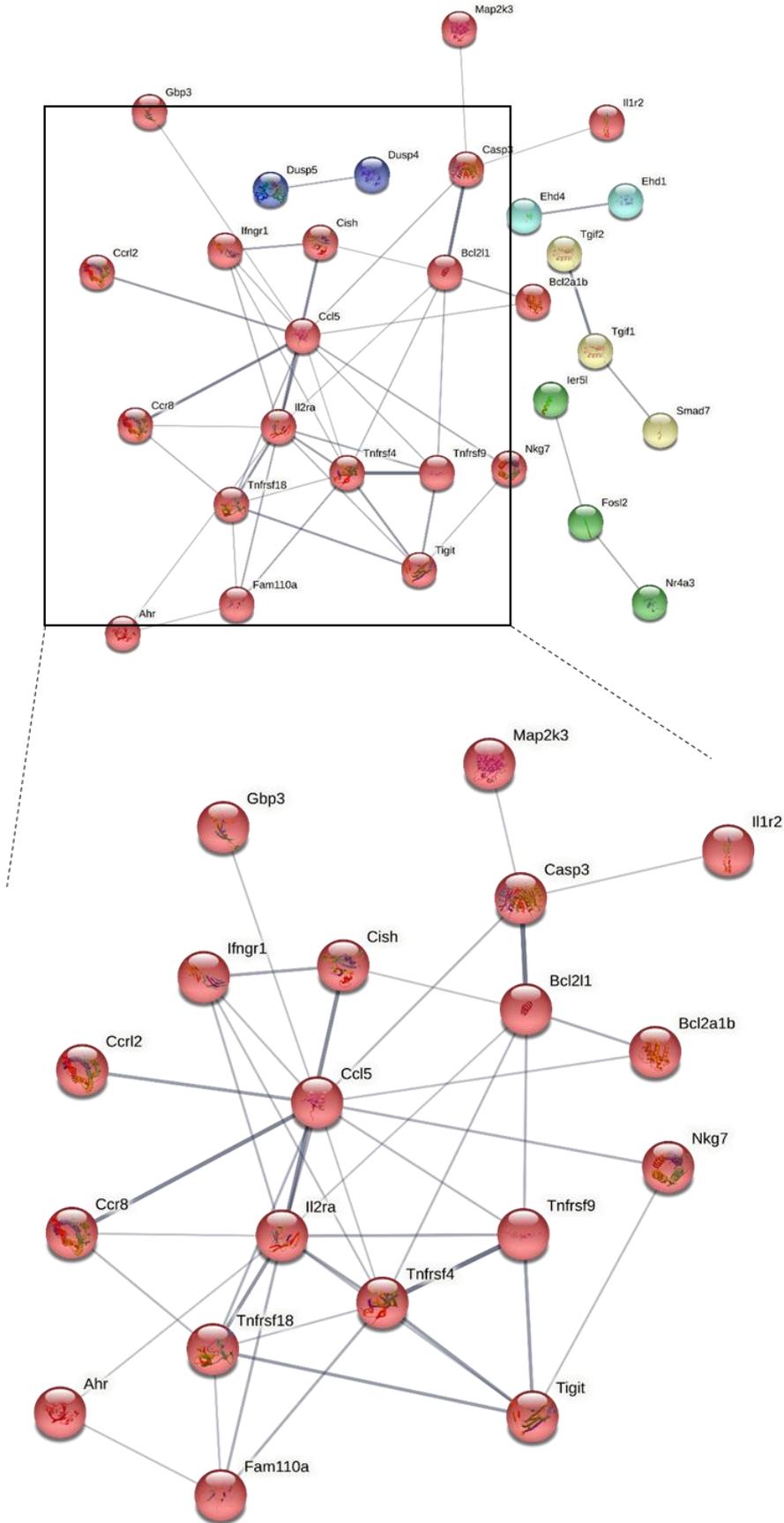
**Supplementary figure 10 : Up-regulated gene network of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the liver of Ad Cre i.m. + Tamoxifen group.**



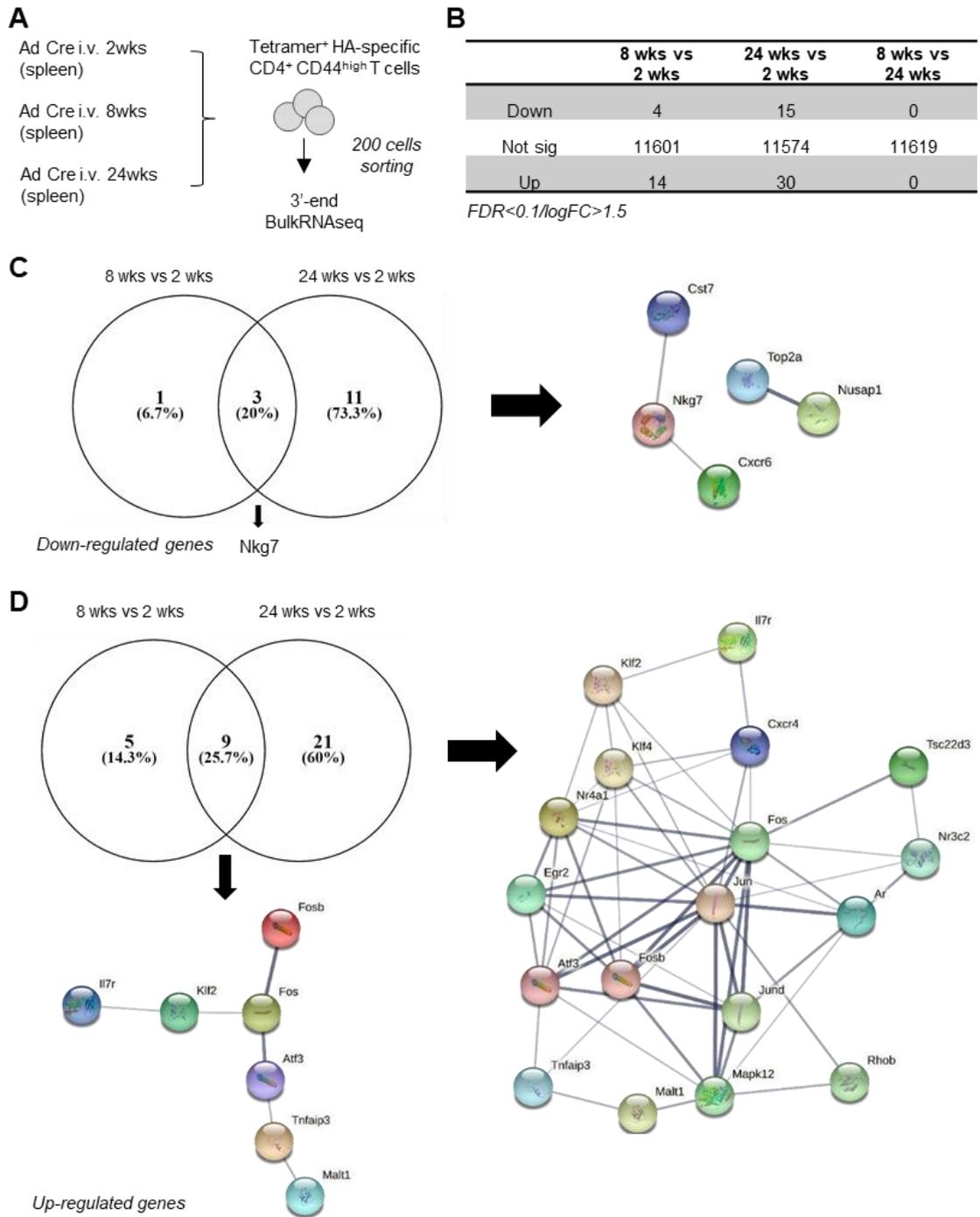
**Supplementary figure 11 : Cytokines and chemokines receptors transcriptomic profile of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells.**



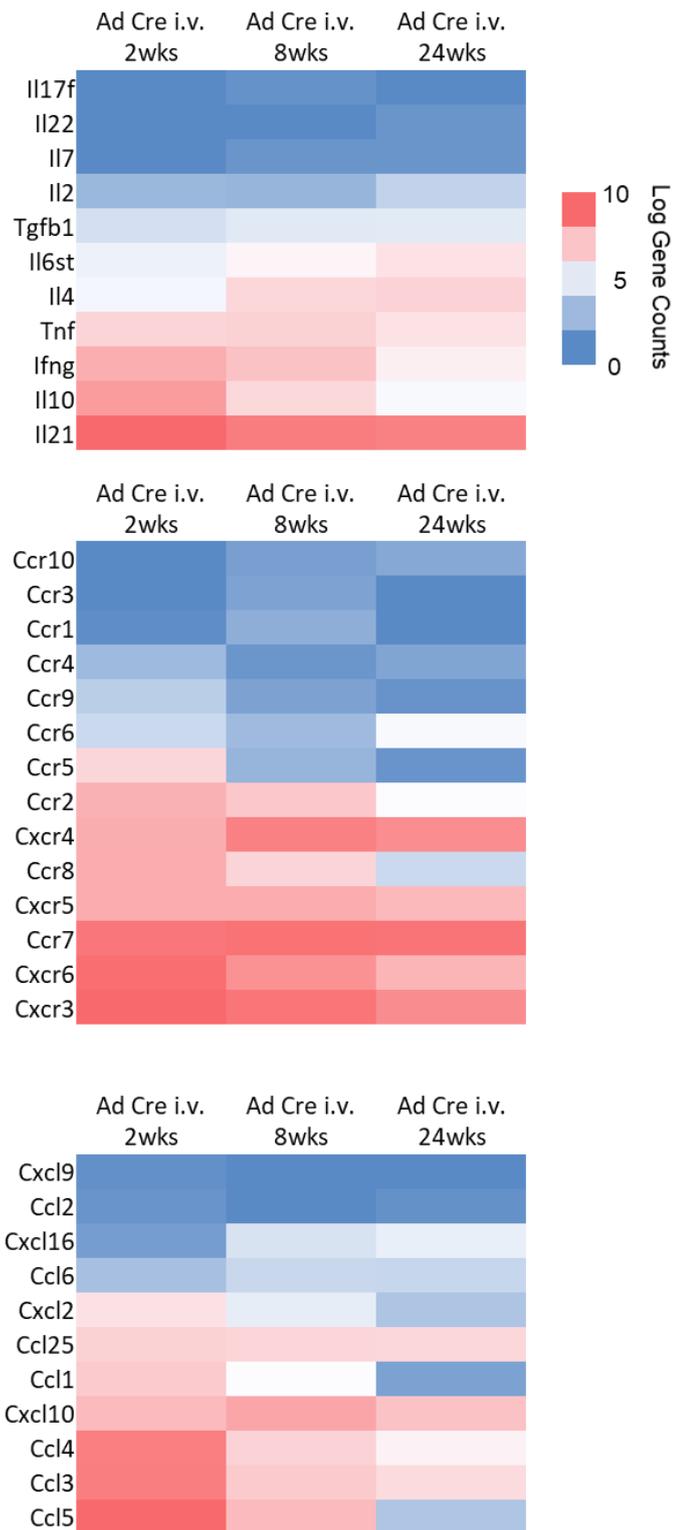
**Supplementary figure 12 : Up-regulated genes network between HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the liver of Ad Cre i.v. and Ad Cre i.m. + Tamoxifen groups.**



**Supplementary figure 13 : Shared up-regulated genes network between HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells isolated from the liver of Ad Cre i.v. and Ad Cre i.m. + Tamoxifen groups.**



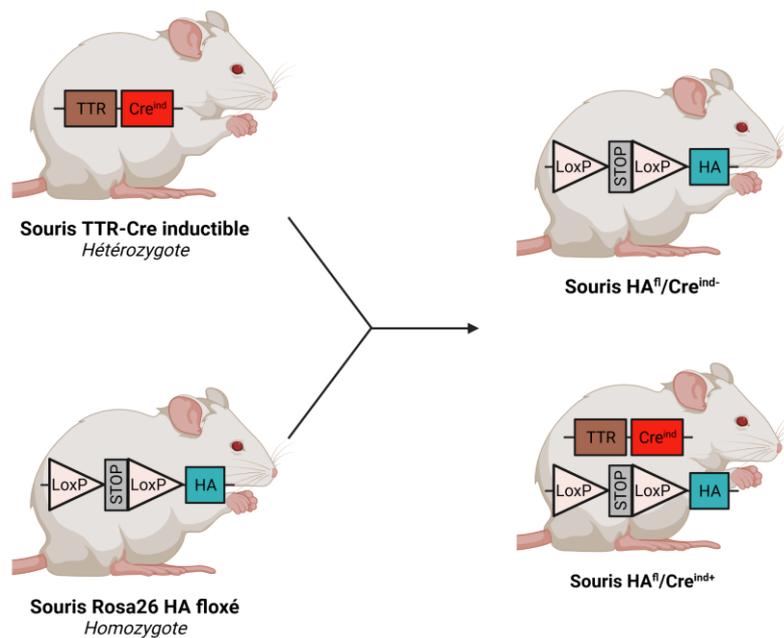
Supplementary figure 14 : Immune profile evolution of splenic HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from Ad Cre i.v. mice.



**Supplementary figure 15 : Evolution of cytokines, chemokines and chemokines receptors profile of splenic HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells from Ad Cre i.v. mice.**

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Dans ce manuscrit, grâce au développement d'un nouveau modèle murin permettant l'induction de l'expression hépatique de l'antigène modèle HA dans différentes conditions (Figure 25), nous avons pu suivre le développement et l'évolution de la réponse T CD4<sup>+</sup> antigène-spécifique. Cette étude de la dynamique de réponse vis-à-vis d'un néo-antigène hépatique permet de mieux comprendre les premiers rouages associés à l'auto-réactivité hépatique.



**Figure 25 : Représentation schématique de la génération du modèle HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup>.** Des souris hétérozygotes TTR-Cre inductible sont croisées avec des souris homozygotes Rosa26 HA floxé. Ce croisement engendre des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> et HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> permettant l'induction de l'expression hépatique de HA dans différentes conditions.

Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie en condition non-inflammatoire est tolérée, avec une absence de réponse immunitaire adaptative. L'utilisation d'un vecteur adénoviral injecté en i.m., permettant d'induire l'expression de l'antigène modèle HA en périphérie, conduit au développement d'une réponse adaptative périphérique complète, marquée par la production d'anticorps spécifiques et la génération de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques ainsi que de LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques (voir partie « 4. Les LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les modèles Ad Cre ») dans la rate. En revanche, grâce au tropisme hépatique de l'adénovirus, son injection en i.v. permet l'expression du néo-antigène HA dans le foie en association avec une inflammation hépatique concomitante conduisant au développement d'une réponse adaptative périphérique mais

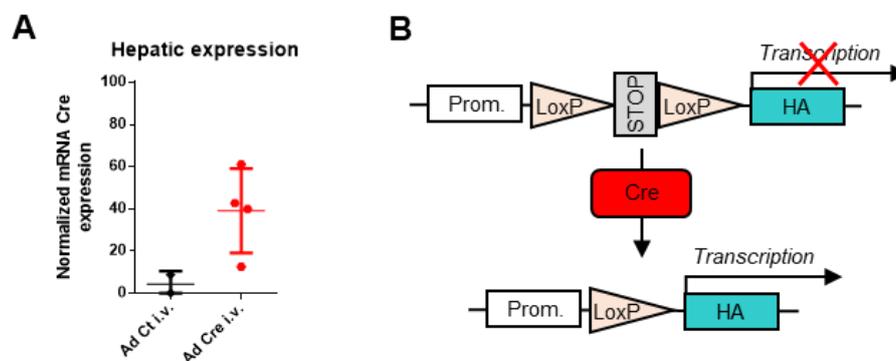
également à l'apparition de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le foie. La présence de ces cellules dans le foie exprimant l'antigène est associée à une importante hépatite et à de sévères dommages hépatiques. L'utilisation d'un modèle de pré-immunisation périphérique démontre que l'induction de l'expression hépatique de HA conditionne le recrutement intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques. Enfin, l'analyse du profil transcriptomique de ces LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques obtenus dans les différents modèles souligne un profil commun pro-inflammatoire de type Th1. Les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques infiltrant le foie montrent en revanche une augmentation de l'expression de marqueurs d'activation, cohérente avec les dommages hépatiques observés. De plus, ces LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques murins partagent des similitudes transcriptomiques avec les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs caractérisés chez les patients atteints d'HAI de type 1, soulignant la mise en place d'une réponse auto-réactive dans ces modèles murins. Ces cellules spécifiques murines présentent également une augmentation de l'expression de marqueurs impliqués dans la régulation des réponses immunes. De plus, l'expression hépatique de l'antigène persiste à long terme avec une régression de l'infiltrat de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le foie et une résolution de l'inflammation hépatique, sans impact cependant sur la réponse spécifique périphérique. L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'environnement hépatique chez la souris permet le contrôle local de l'auto-réactivité.

Ainsi, l'étude des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans ces étapes précoces d'auto-réactivité apporte des informations importantes sur la mise en place d'une auto-immunité hépatique. Chez la souris, cette réponse auto-réactive est fortement contrôlée localement avec l'apparition de marqueurs de régulation des réponses immunes et la régression de l'infiltrat, suggérant la nécessité d'événements immunologiques supplémentaires pour le développement d'une chronicité. Ces travaux soulèvent dès lors des questions intéressantes qui seront discutées dans la suite de ce manuscrit. Tout d'abord, nous étudierons le caractère auto-réactif de notre modèle d'immunisation local. Ensuite, nous analyserons l'effet de l'induction de l'expression hépatique d'un néo-antigène dans un contexte de pré-immunisation périphérique. Dans une troisième partie, nous questionnerons les limites de la tolérance hépatique en condition non-inflammatoire. Puis, nous étudierons la place des LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques notre modèle d'auto-réactivité. Enfin, nous détaillerons la particularité du profil auto-réactif des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques intra-hépatiques pour finir par un

questionnement sur les mécanismes possibles de rupture de tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs pouvant mener à une réponse auto-immune.

### 1. L'induction d'une réponse de type auto-réactive dans le foie dans un contexte inflammatoire

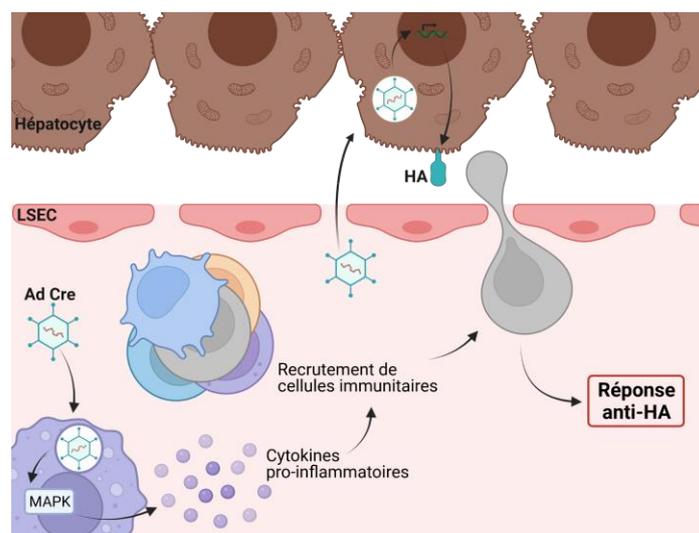
Tout d'abord, l'utilisation de l'Ad Cre permet d'induire l'expression de HA chez les souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> et HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> indépendamment de la présence du gène endogène Cre<sup>ind</sup>. L'injection i.m. de cet adénovirus restreint l'expression de la Cre dans le muscle. Grâce à l'importante perfusion du foie et au tropisme hépatique du vecteur adénoviral, l'injection en i.v. de l'Ad Cre induit l'expression de la recombinaise Cre dans les hépatocytes (Figure 26A). La Cre provoque ensuite la recombinaison des séquences LoxP entourant un codon stop précédant la séquence codante HA, ceci conduit au déblocage de la transcription puis à l'expression de la protéine HA à la surface des hépatocytes (Figure 26B). Dans toutes nos expériences, l'expression de la Cre induite par l'Ad Cre s'est révélée associée à l'expression de HA.



**Figure 26 : L'injection de l'Ad Cre permet l'expression d'une recombinaise Cre induisant l'expression de HA.** (A) Dans le modèle Ad Cre i.v., l'expression de l'ARN messager Cre est détecté grâce à une RT-PCR quantitative à partir d'échantillons de foie de souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> ayant reçu soit l'Ad Ct i.v. (n = 2), soit l'Ad Cre i.v. (n = 4). (B) L'expression du gène endogène HA est bloquée par la présence d'un codon stop floxé. Représentation schématique de l'effet de la recombinaise Cre induite par l'Ad Cre sur la recombinaison des séquences LoxP entourant le codon stop et permettant le déblocage que l'expression de la protéine HA. Prom. = promoteur.

Associée à l'expression musculaire de HA, l'injection i.m. du vecteur Ad Cre permet le déclenchement d'une réponse adaptative périphérique robuste, marquée par la génération d'anticorps anti-HA et de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques dans la rate (Figure 1 de la partie

« Résultats »). Or, l'immunisation périphérique par injection i.m. d'un vecteur adénoviral est un phénomène bien décrit dans la littérature. Les vecteurs adénoviraux sont de puissants vecteurs immunogènes. Ils sont d'abord reconnus par les cellules du système immunitaire inné provoquant l'activation de la voie des MAP kinases aboutissant à la production de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires [254]. Cet environnement immun pro-inflammatoire actif favorise le recrutement de cellules immunitaires sur le site infectieux conduisant au développement d'une réponse adaptative dirigée non seulement contre l'adénovirus lui-même mais également contre le produit de son transgène [255]. L'immunisation i.m. adénovirale est aujourd'hui utilisée dans de nombreux protocoles de vaccination en clinique, comme récemment dans la stratégie de lutte contre le SARS-CoV-2 [256,257]. L'originalité de notre modèle d'immunisation repose quant à lui sur un phénomène d'immunisation non pas direct mais « collatéral ». L'Ad Cre induit une réponse adaptative dirigée contre un antigène exprimé de manière concomitante à la réponse anti-adénoviral et anti-transgène. Nous supposons que l'induction de l'expression de HA dans le contexte pro-inflammatoire causé par l'Ad Cre favorise le déclenchement d'une réactivité vis-à-vis de ce néo-antigène (Figure 27). Cette hypothèse est supportée par le fait que Nakayama a récemment montré que l'inflammation était nécessaire pour le développement d'une immunisation post-vaccination [258]. En lien avec les données de la littérature sur la vaccination adénovirale, nous supposons que l'Ad Cre entraîne également le développement d'une réponse adaptative dirigée contre Cre ; toutefois nous n'avons pu étudier cette réponse par manque d'outils spécifiques de cette recombinaise.



**Figure 27 : Mécanisme d'action de l'Ad Cre injecté en intraveineux.** Grâce à son tropisme hépatocytaire, l'Ad Cre injecté en i.v. va induire l'expression de HA à la surface des hépatocytes dans un contexte inflammatoire favorisant le développement de réponses anti-HA.

De façon intéressante, alors que l'induction de l'expression de HA dans un contexte non-inflammatoire grâce à l'utilisation de tamoxifène chez des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> est tolérée (absence de réponse adaptative anti-HA), l'injection i.v. du vecteur Ad Cre, permettant l'expression hépatique de HA dans un contexte inflammatoire, conduit à la génération d'une réponse adaptative périphérique complète (anticorps anti-HA, LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques) (Figure 1 de la partie « Résultats »). De plus, contrairement à l'injection i.m. de ce vecteur, l'injection en i.v. aboutit au recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> antigène-spécifiques (Figure 1 de la partie « Résultats »). La présence de ces lymphocytes spécifiques dans le foie est associée à une importante inflammation et de sévères dommages tissulaires (Figure 1 de la partie « Résultats »). De plus, ces LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques périphériques et intra-hépatiques présentent une importante expression du marqueur d'activation PD-1 et un phénotype CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup>, divergeant d'un phénotype Tregs (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup>) (Figure 1 de la partie « Résultats »).

Ainsi, il semble que l'induction de l'expression de HA dans le foie dans un contexte inflammatoire induit par un adénovirus permet la présence intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques associée à d'importants dommages tissulaires. Ces données suggèrent une réactivité locale vis-à-vis de ce néo-antigène, pouvant être associée à un mécanisme d'auto-réactivité. Ce concept d'auto-réactivité hépatique est déjà décrit dans la littérature mais est limité sur la capacité d'étude de la réponse T CD4<sup>+</sup> antigène-spécifique.

En adéquation avec nos résultats, Ehser *et al.* [247] ont montré que l'injection i.v. d'un adénovirus à tropisme hépatocytaire et codant pour la protéine humaine CYP2D6 (Ad-hCYP2D6) chez des souris permet d'induire une réponse auto-réactive hépatique (présence d'une réponse cellulaire dans le foie associée à des dommages hépatiques persistants). En revanche, l'immunisation périphérique via l'utilisation d'adjuvant de Freund émulsifié avec la protéine hCYP2D6 ne permet d'induire qu'une réponse anti-hCYP2D6 périphérique sans développement d'auto-réactivité hépatique. Les auteurs suggèrent l'importance de l'utilisation d'un vecteur adénoviral atteignant le foie comme technique d'immunisation pour le développement d'une auto-réactivité hépatique. Similaires au modèle Ad-hCYP2D6, d'autres modèles murins d'HAI-2 (HAI de type 2) (Ad-hFTCD [245], Ad-2D6 [246]), utilisant également le principe de mimétisme moléculaire, ont montré que l'utilisation

d'un adénovirus à tropisme hépatocytaire injecté en i.v. et codant pour hCYP2D6 ou hFTCD permettait de déclencher une auto-immunité hépatique. L'adénovirus provoque une inflammation hépatique permettant l'exposition de ces auto-antigènes intra-hépatocytaires. Grâce à l'homologie de séquences entre les protéines humaines et murines, l'ensemble de ces modèles sont basés sur une immunisation adénovirale ciblant directement l'auto-antigène. Or, il est connu que les vecteurs adénoviraux déclenchent une forte réponse adaptative contre le produit de leur transgène [255]. L'une des originalités de notre modèle repose sur le phénomène d'« immunisation collatérale » provoquée par la concomitance de l'expression hépatique de HA et de la réponse anti-adénovirus. Notre modèle d'immunisation indirecte appuie l'idée que l'induction de l'expression hépatique d'un antigène dans un contexte inflammatoire immunogène, déclenché par un vecteur adénoviral à tropisme hépatocytaire, suffit à déclencher une réactivité vis-à-vis de cet antigène hépatique, réactivité qui n'est pas due à une réponse anti-vecteur adénoviral. De plus, les travaux récents de Mo *et al.*, publiés lors de ma thèse, appuient cette observation en montrant que l'injection i.v. simultanée d'un plasmide codant pour hCYP2D6 et d'un vecteur adénoviral permet d'induire le développement d'une HAI murine [252]. À la différence de nos travaux, cette immunisation vise encore directement l'auto-antigène CYP2D6.

Enfin, malgré le déclenchement d'une réponse auto-réactive, l'ensemble de ces modèles murins d'HAI-2 manquent d'outils de détection et de caractérisation de la réponse T antigène-spécifique. Ces travaux étudient soit les composantes T CD4<sup>+</sup> et/ou CD8<sup>+</sup> totales, non-spécifiques, soit la capacité des LT à sécréter des cytokines, notamment IFN- $\gamma$ , après stimulation *in vitro* avec des peptides [245–247,252]. Dans notre modèle, l'utilisation de tétramères de classe II chargés avec des peptides HA démontre une haute résolution pour la détection de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques ; de même, nous montrons également une capacité de détection précise des LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques grâce à l'utilisation d'un tétramère de classe I (voir partie « 4. Les LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les modèles Ad Cre » ci-après). Notre modèle propose ainsi un suivi approfondi et spécifique de la réponse T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique, tant périphérique qu'hépatique.

Ainsi, notre modèle Ad Cre i.v. démontre que l'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie dans un contexte inflammatoire immunogène déclenché par un adénovirus permet

la génération d'une réponse auto-réactive, caractérisée par le recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques exacerbant l'inflammation et les dommages hépatiques. Ce modèle, proche des modèles murins d'HAI-2 ciblant CYP2D6 ou FTCD, est pertinent pour l'étude des étapes précoces impliquées dans le développement de réponses auto-réactives vis-à-vis d'un antigène hépatique. De plus, grâce à l'utilisation de tétramères, il permet une fine analyse et un suivi de la réponse T CD4<sup>+</sup> auto-réactive.

Puisque les différents facteurs environnementaux associés à l'HAI sont sources d'inflammation et en particulier les infections virales qui peuvent également provoquer un mimétisme moléculaire, facteur clé de la pathogenèse de l'HAI, nous pourrions analyser l'importance de la composante virale dans l'initiation de l'auto-réactivité hépatique. Pour cela, nous pourrions comparer des modèles associant expression hépatique de l'antigène (tamoxifène) et inflammation hépatique provoquée par l'injection concomitante soit de médiateurs inflammatoires (combinaison D-galactosamine/LPS ou ConA –concanavaleine A–, connus pour induire une inflammation hépatique [259]), soit d'un Ad Ct injecté en i.v..

Enfin, la capacité du foie à induire l'activation intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques n'est pas encore bien définie [66–68]. L'une des hypothèses est que les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques ne seraient pas activés localement mais en périphérie dans les ganglions lymphatiques drainant le foie (portal et coéliquae), lieux traditionnels d'activation des réponses immunitaires [68,260]. Ainsi, étant donnée la capacité du foie à induire la tolérisation des réponses T CD4<sup>+</sup> (voir partie 2 de l'introduction, « 2.2.2. La tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> dans le foie »), il est probable que la réponse auto-réactive déclenchée par l'Ad Cre i.v. ne soit pas induite localement dans le foie mais dans les ganglions lymphatiques associés. Cette hypothèse d'une immunisation périphérique est renforcée par l'observation d'une faible expression de HA dans la rate des souris Ad Cre i.v. (Supplementary figure 1 de la partie « Résultats »). Par conséquent, nous pourrions étudier le site d'activation des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques en étudiant l'état d'activation des CPA professionnelles (macrophages, cellules dendritiques) et non-professionnelles (hépatocytes, LSEC et KC) dans le foie et dans les ganglions lymphatiques suite à l'injection de l'Ad Cre i.v..

## 2. L'induction de l'expression d'un antigène dans le foie post-immunisation périphérique conditionne le recrutement intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques

Dans nos résultats précédents, nous montrons que les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques sont uniquement recrutés dans le foie des souris Ad Cre i.v.. Or puisqu'une interrogation demeure quant au site d'activation (intra-hépatique ou périphérique) des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans ce modèle, nous nous sommes demandés si l'induction de l'expression de HA dans le foie pouvait influencer le recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> spécifiques mémoires générés en périphérie. Pour tester cette hypothèse, nous avons induit son expression hépatique, grâce au tamoxifène, dans des souris pré-immunisées via l'injection i.m. de l'Ad Cre. Nous avons observé que l'induction de l'expression hépatique de HA dans un contexte d'immunisation périphérique préexistante conduisait à la persistance de la réponse périphérique humorale et cellulaire spécifique (IgG et IgM anti-HA et LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans la rate) et chez 50 % des souris au recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques.

La persistance des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques en périphérie dans notre modèle de pré-immunisation périphérique concorde avec les résultats obtenus par Bartolo *et al.* concernant des LT CD4<sup>+</sup> totaux [261]. Dans un modèle d'immunisation anti-OVA induite par l'injection d'adjuvant de Freund incomplet (IFA) émulsifié avec un peptide OVA<sub>323</sub> restreint au CMH-II (IFA/OVA<sub>323</sub>), l'induction de l'expression hépatique d'une forme membranaire d'OVA (mOVA) grâce à l'injection i.v. d'un vecteur AAV8 codant pour mOVA (AAV8/mOVA) ne modifie pas la réponse périphérique T CD4<sup>+</sup> totale préexistante. En revanche, contrairement à nos résultats, l'équipe montre une absence d'anticorps anti-OVA à l'issue de l'injection i.v. de l'AAV8/mOVA.

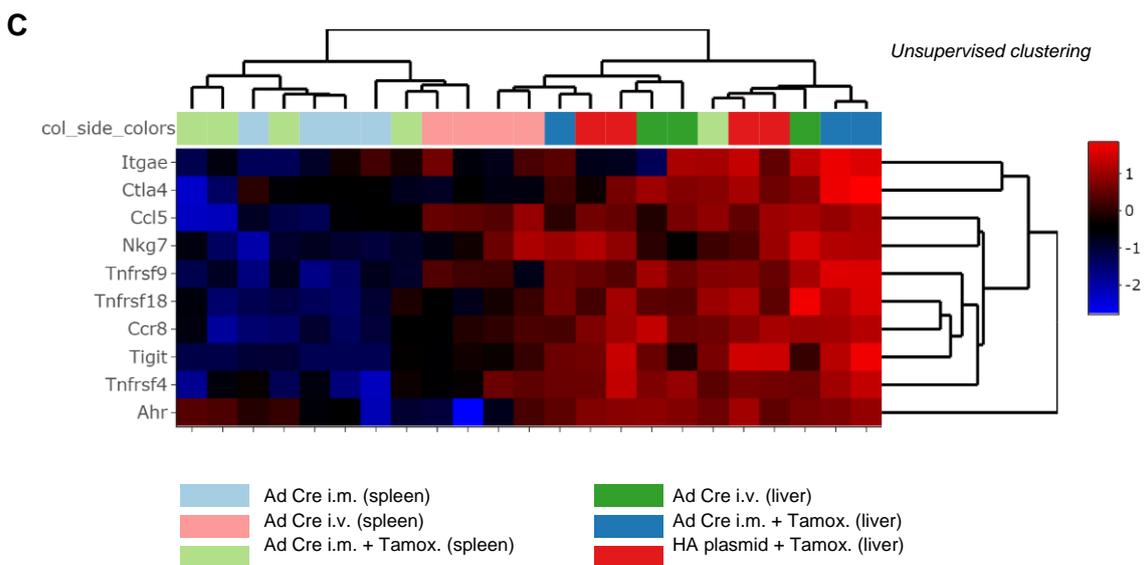
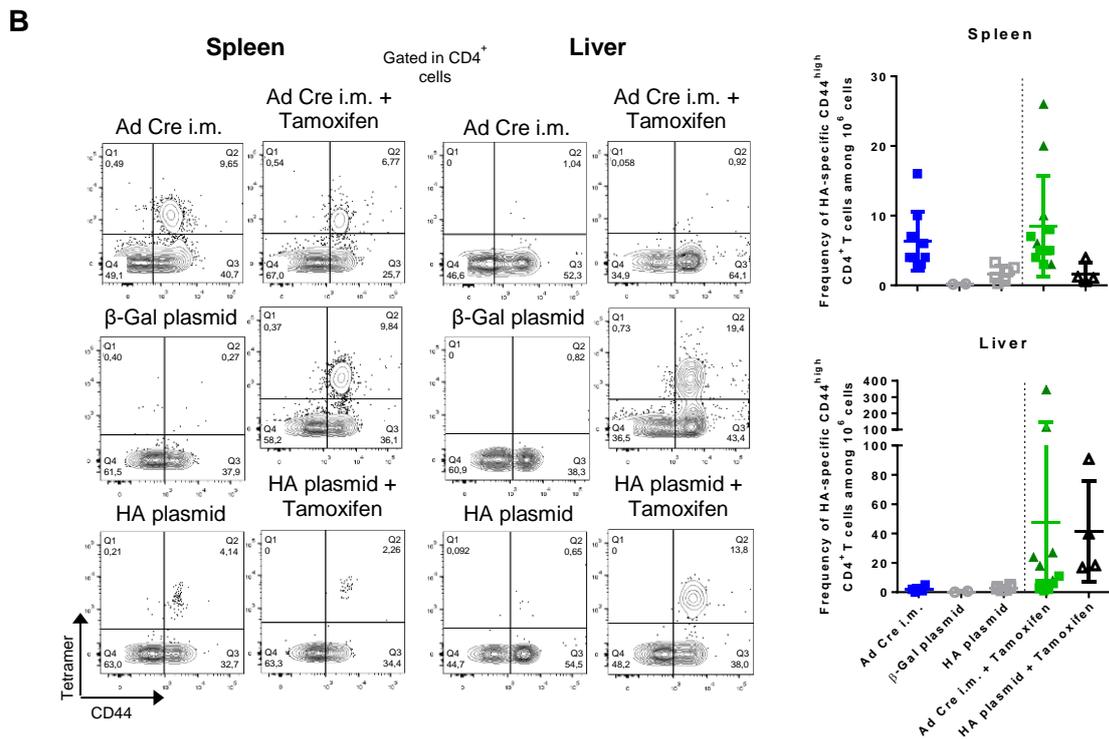
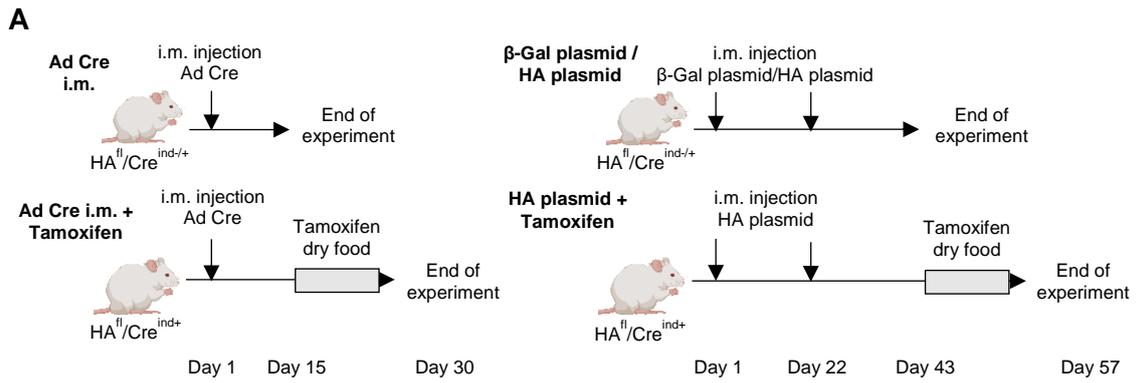
L'induction de l'expression d'un antigène dans le foie via l'utilisation d'un vecteur AAV est une technique bien décrite dans la littérature [125,130,131,133] et montre d'importantes capacités d'induction de tolérance vis-à-vis de l'expression hépatique du transgène, notamment via la génération de Tregs ; c'est d'ailleurs pourquoi cette technique est désormais en phases de tests pour une utilisation en clinique [126]. Or, dans notre modèle, l'utilisation du tamoxifène seul n'induit pas la génération de Tregs HA-spécifiques, ni ne montre d'augmentation de la composante Tregs générale. Ainsi, les différentes techniques utilisées

entre le modèle de Bartolo *et al.* et notre modèle (IFA vs Ad ; AAV vs Tamoxifène) peuvent justifier la divergence de résultats concernant la persistance des réponses antigène-spécifiques périphériques dans notre modèle. De plus, de façon similaire à notre modèle, Poupiot *et al.* ont montré que l'injection i.v. d'un vecteur AAV9 codant pour une protéine SGCA (impliquée dans la dystrophie musculaire) et permettant son expression hépatique, dans des souris préalablement immunisées via l'injection i.m. d'un vecteur AAV6 codant pour cette même molécule permettait de réduire seulement partiellement la réponse humorale spécifique [262].

De manière intéressante, nous avons observé que chez les souris pré-immunisées exprimant HA et montrant une infiltration hépatique de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques, la pré-immunisation a induit un plus faible taux d'anticorps anti-HA par rapport aux souris pré-immunisées exprimant HA mais ne montrant pas d'infiltration hépatique (Figure 3 de la partie « Résultats »).

Il a été montré que la vaccination faible dose pouvait mener à la génération de LT CD4<sup>+</sup> de haute avidité [263,264]. En particulier, dans le cas du diabète de type 1, la stimulation *in vitro* de LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs antigène-spécifiques avec différentes doses d'antigènes a montré que les LT stimulés par une faible dose antigénique montraient une plus grande avidité [265]. Or, Ploquin *et al.* ont démontré que les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques de haute avidité avaient des capacités d'expansion et de production d'IFN- $\gamma$  augmentées [266]. Par conséquent, nous pouvons supposer qu'une faible pré-immunisation (caractérisée par le faible taux d'anticorps anti-HA) a conduit à la génération de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques de haute avidité ayant un potentiel d'activation augmenté permettant leur recrutement dans le foie lorsque l'expression hépatique de HA est induite.

De plus, cette hypothèse supposant qu'une faible immunisation périphérique pourrait favoriser le développement d'une auto-réactivité hépatique est soutenue par des résultats préliminaires que nous avons obtenus dans un modèle de pré-immunisation utilisant non pas l'Ad Cre mais un plasmide codant pour HA (Figure 28). Cette immunisation périphérique via l'utilisation du plasmide HA (injection i.m. à J1 et J22, euthanasie à J43 ; contrôle : utilisation d'un plasmide codant pour la  $\beta$ -galactosidase –  $\beta$ -Gal ; Figure 28A) conduit à une génération



**Figure 28 : Une faible pré-immunisation périphérique permet le recrutement intra-hépatique de LT  $CD4^+$  antigène-spécifiques après induction de l'expression hépatique de l'antigène. (A) Des souris  $HA^{fl}/Cre^{ind/+}$  reçoivent une injection i.m. de l'Ad Cre ( $n = 6$ ) puis sont euthanasiée à J15. Des**

souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> reçoivent une injection i.m. d'un plasmide codant pour la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) (n = 2) ou codant pour HA (n = 6) à J1 et J22 et sont euthanasiées à J43. Des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> sont pré-immunisées par une injection i.m. de soit l'Ad Cre (n = 12), soit du plasmide HA (n = 4) puis sont nourries avec des croquettes au tamoxifène pendant 14 jours avant d'être euthanasiées. (B) Les splénocytes et les NPC totaux sont marqués avec un tétramère de CMH-II chargé avec des peptides HA puis sont marqués phénotypiquement (Live/Dead, CD4, CD44, PD-1, CD19) et analysés par cytométrie en flux. Dot plot représentatifs d'un co-marquage tétramère CMH-II/peptide et CD44, ciblé dans les cellules vivantes CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>. Les fréquences de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques sont calculées parmi 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> totales. Triangles : souris présentant un infiltrat hépatique de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques. (C) 50 à 200 LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> CD25<sup>-</sup> HA-spécifiques sont triés pour réaliser un séquençage ARN en 3' groupé. *Heat map* représentant une sélection de gènes majeurs relatifs à la biologie des lymphocytes T dont l'expression est augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques.

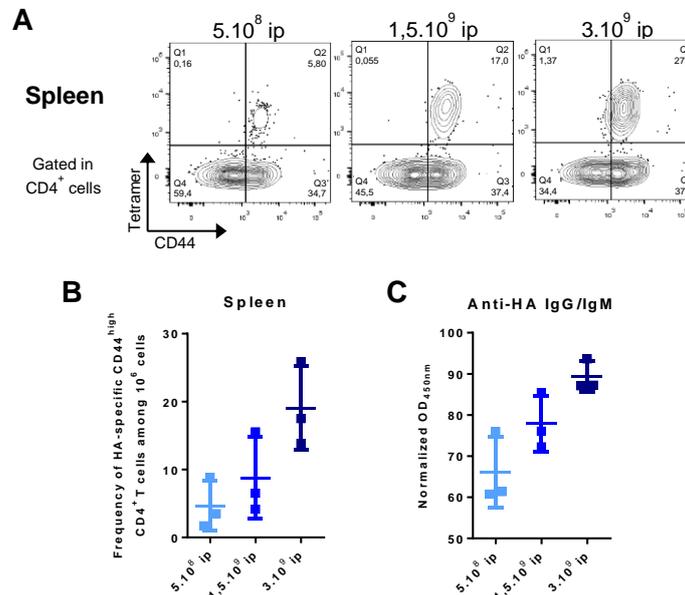
de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques uniquement dans la rate mais avec une fréquence plus faible (fréquence parmi 10<sup>6</sup> cellules : 1,64  $\pm$  1,15) que celle observée dans le modèle Ad Cre i.m. (fréquence parmi 10<sup>6</sup> cellules : 6,33  $\pm$  4,27) (Figure 28B). L'induction de l'expression hépatique de HA chez ces souris pré-immunisées par le plasmide HA ne modifie pas la fréquence en cellules spécifiques dans la rate (fréquence parmi 10<sup>6</sup> cellules : 1,69  $\pm$  1,53) mais provoque le recrutement intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques chez 100% des souris (fréquence parmi 10<sup>6</sup> cellules : 41.37  $\pm$  34.55) (Figure 28B). Enfin, l'analyse du profil transcriptomique de ces cellules spécifiques intra-hépatiques montre une signature similaire à celle des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques infiltrant le foie des souris Ad Cre i.v. et des souris Ad Cre i.m. + Tamoxifène (Figure 28C), à savoir pro-inflammatoire activée et augmentant l'expression de gènes associés à l'immuno-régulation.

Ces résultats suggèrent donc qu'une pré-immunisation périphérique suboptimale, générant notamment peu de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques, est propice au recrutement intra-hépatique de ces cellules spécifiques après induction de l'expression du néo-antigène dans le foie. Ceci peut alors conduire au développement d'une réponse auto-réactive locale.

Ainsi, dans le modèle Ad Cre i.v., nous pouvons supposer qu'une faible immunisation périphérique, potentiellement dans les ganglions lymphatiques drainant le foie, a lieu et des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques sont secondairement recrutés dans le foie exprimant HA.

Nous pourrions alors évaluer cette hypothèse en étudiant l'effet d'une pré-immunisation Ad Cre i.m. faible dose sur le déclenchement d'une auto-réactivité post-induction hépatique de HA. Des expériences préliminaires montrent que la fréquence en LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques périphériques et anticorps anti-HA est proportionnelle à la dose d'Ad Cre i.m. injectée (faible

dose =  $5.10^8$  ip – *infectious particles*, particules infectieuses – ; dose normale =  $1,5.10^9$  ip ; forte dose =  $3.10^9$  ip) (Figure 29).



**Figure 29 : La réponse adaptative anti-HA est proportionnelle à la dose d'Ad Cre i.m. injectée.** Des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> reçoivent une injection i.m. de l'Ad Cre à la dose  $5.10^8$  ip (*infectious particle*, particule infectieuse),  $1,5.10^9$  ip ou  $3.10^9$  ip (n = 3 par groupe). Les souris sont euthanasiées 14 jours après l'injection. (A) Les splénocytes totaux sont marqués avec un tétramère de CMH-II chargé avec des peptides HA puis sont marqués phénotypiquement (Live/Dead, CD4, CD44, PD-1, CD19) et analysés par cytométrie en flux. Dot plot représentatifs d'un co-marquage tétramère CMH-II/peptide et CD44, ciblé dans les cellules vivantes CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup>. (B) Les fréquences de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques sont calculées parmi 10<sup>6</sup> CD4<sup>+</sup> totales. (C) A la fin de l'expérimentation, les sérums sont dilués et testés pour la présence d'IgG et IgM anti-HA.

Enfin, dans les différents modèles (Ad Cre i.v. ; Ad Cre i.m. + Tamoxifène ; Plasmide HA + Tamoxifène), les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques infiltrant le foie montrent un profil transcriptomique pro-inflammatoire activé. Ce recrutement spécifique intra-hépatique s'accompagne également d'une augmentation de l'inflammation et de l'infiltrat lymphocytaire hépatiques concomitante à l'induction de l'expression hépatique de HA dans le foie, signes d'une auto-réactivité.

Cependant, bien que nous puissions émettre l'hypothèse que nos modèles permettent de refléter les premiers évènements d'une auto-réactivité hépatique, ces derniers présentent des limites, avec une diminution de l'inflammation hépatique à court terme et la présence de marqueurs de régulation de la réponse immune dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques, sans pour autant impacter la réponse spécifique périphérique. Ceci suggère donc que l'environnement hépatique, pro-tolérologène, participe au contrôle local de l'auto-réactivité.

### 3. La tolérance vis-à-vis d'un néo-antigène hépatique exprimé en condition non-inflammatoire est robuste

En accord avec les capacités d'induction de tolérance du foie, nous avons montré, grâce à l'utilisation du tamoxifène seul permettant l'expression hépatocytaire de HA chez des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup>, que l'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie en condition non-inflammatoire conduit à sa tolérance, marquée par l'absence de réponses humorale et cellulaire spécifiques, et à un maintien de son expression dans le temps.

Ces résultats concordent avec les données obtenues dans les modèles d'induction de tolérance détournant les propriétés tolérogènes du foie dans le cadre de thérapies géniques. Dans le cas du traitement de l'hémophilie B, l'injection d'un vecteur AAV codant pour le FIX (facteur IX) a permis la production dans le foie du FIX et la tolérance à long terme de celui-ci, d'abord dans des modèles pré-cliniques puis dans un essai clinique comportant 12 patients [125]. De même, dans des modèles pré-cliniques murins de MAI (maladies auto-immunes) non-spécifiques du foie telles que le diabète de type 1 ou la sclérose en plaque, l'induction de l'expression de l'auto-antigène dans le foie via l'utilisation respective d'un vecteur lentiviral et d'un vecteur AAV ont permis de prévenir le développement de la maladie, voire d'induire une régression de celle-ci lorsqu'elle était déjà en place [130,131]. L'ensemble de ces modèles montrent que la tolérance vis-à-vis de l'expression du transgène dans le foie passe par l'expansion de Tregs, et en particulier de Tregs spécifiques du transgène MOG dans le modèle murin de sclérose en plaque [127,130,131]. Dans notre modèle tamoxifène, nous ne détectons pas de génération de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques, ni d'augmentation de la population totale CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, suggérant que l'induction de tolérance vis-à-vis de l'expression de HA par le tamoxifène ne passe pas par une expansion de Tregs. En introduction de cette thèse, nous avons vu que l'environnement hépatique en condition d'homéostasie entraîne une tolérisation des réponses T (voir partie 2 de l'introduction, « 2.2. Le foie en homéostasie »). Ainsi, il semble que l'induction de l'expression de HA dans le foie par le tamoxifène passe plutôt par une hyporéactivité des réponses T vis-à-vis de l'antigène plutôt que par une induction de Tregs. Nous pouvons supposer que l'utilisation de vecteurs viraux déclenche une cascade de signalisation différente de celle activée par l'utilisation du tamoxifène, d'où une différence de mécanisme dans l'induction de la tolérance vis-à-vis du néo-antigène. Il pourrait être intéressant de comparer l'effet de l'injection i.v. d'un AAV ou d'un lentivirus codant pour HA à

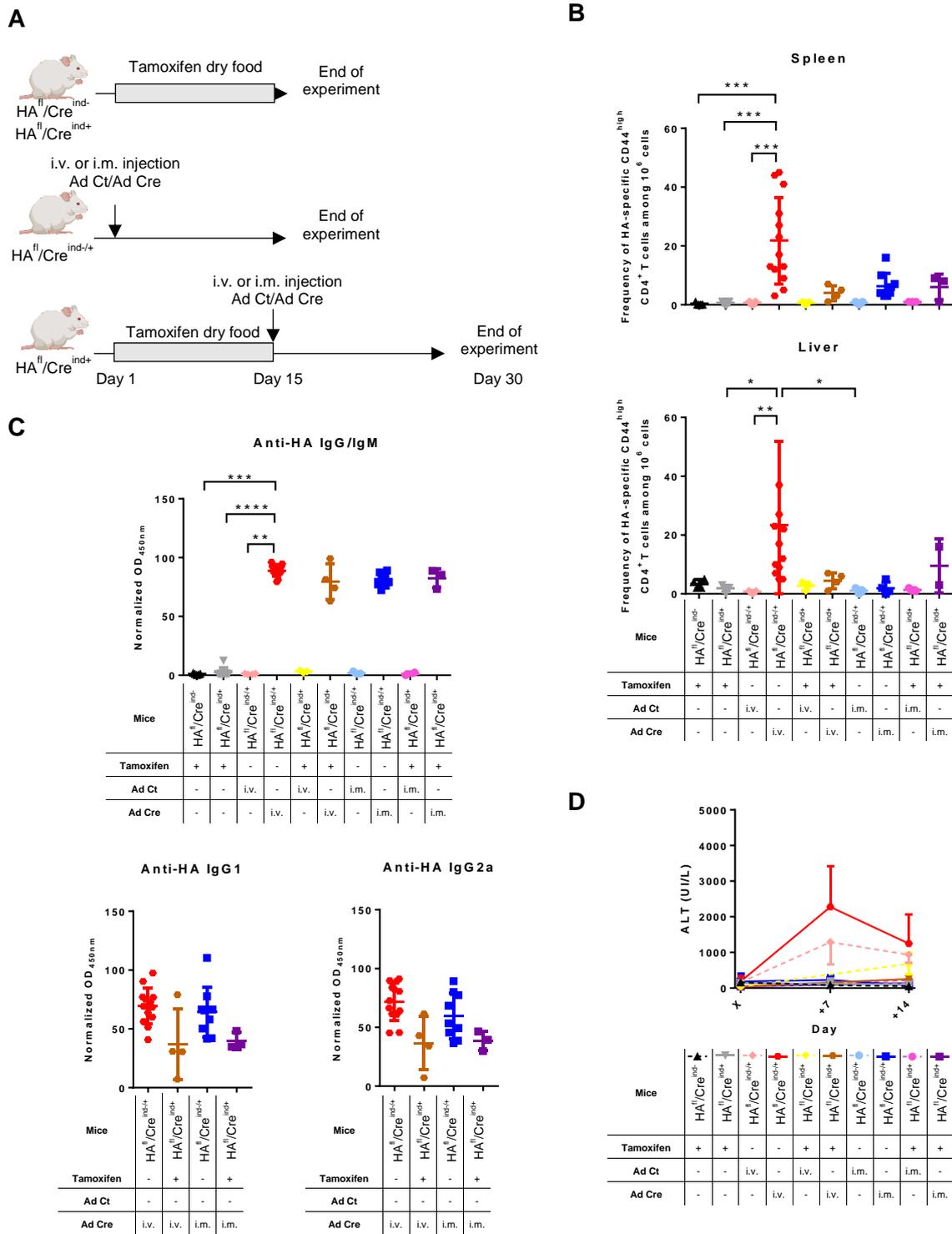
l'utilisation du tamoxifène, afin d'observer si ces méthodes permettent la génération de Tregs HA-spécifiques.

Enfin, les Tregs ne sont pas les seules cellules régulatrices de la réponse immune. Nous pourrions donc étudier la possibilité de l'émergence d'autres sous-populations régulatrices, telles que les lymphocytes Tr1 (CD4<sup>+</sup> LAG-3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup>) [267], chez les souris exprimant HA grâce au tamoxifène.

Dans des expériences préliminaires, nous avons également mis à l'épreuve la robustesse de la tolérance vis-à-vis de l'expression hépatique de HA induite par le tamoxifène. Pour cela, nous avons induit l'expression hépatique de HA chez des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> grâce au tamoxifène, puis ces souris ont reçu une injection d'Ad Cre (ou Ad Ct) soit en i.v., soit en i.m. (Figure 30A).

Nous avons observé que l'injection d'Ad Ct en i.v. ou en i.m. ne déclenchait aucune réponse anti-HA, humorale ou cellulaire (Figure 30B-C). En revanche, l'immunisation via l'Ad Cre injecté en i.v. ou en i.m. post-induction de l'expression hépatique de HA conduit à la génération de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques en périphérie (Figure 30B). Cependant, la fréquence en cellules spécifiques est largement diminuée dans la rate lorsque l'expression hépatique de HA est induite préalablement à l'immunisation Ad Cre i.v. (fréquence par 10<sup>6</sup> cellules : 4,00 ± 2,58), en comparaison à des souris simplement immunisées par l'Ad Cre i.v. (fréquence par 10<sup>6</sup> cellules : 21,77 ± 14,68) (Figure 30B). De façon intéressante, nous observons l'absence de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le foie des souris immunisées par l'Ad Cre i.v. post-induction de HA (Figure 30B).

Bartolo *et al.* [261] ont montré un mécanisme similaire concernant la réponse T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique dans un modèle d'immunisation post-induction de l'expression hépatique de l'antigène OVA. L'injection i.v. du vecteur AAV8 codant pour une forme membranaire de OVA (AAV8/mOVA) permet l'expression hépatique de mOVA et la tolérance de cet antigène, marquée par l'absence de réponses humorale et cellulaire antigène-spécifiques. L'immunisation de ces souris via l'injection i.m. d'un AAV1/mOVA, après induction de l'expression hépatique de OVA par l'AAV8/mOVA i.v., empêche la génération de LT CD8<sup>+</sup> OVA-spécifiques, normalement provoquée par le vecteur AAV1/mOVA i.m..



**Figure 30 : L'expression hépatique de HA induite par le tamoxifène inhibe le recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques provoqué par l'Ad Cre i.v..** (A) Après nutrition avec des croquettes au tamoxifène, des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> reçoivent une injection i.v. ou i.m. d'Ad Ct (n = 3 / n = 3) ou d'Ad Cre (n = 4 / n = 3). Ces groupes sont comparés à des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> et des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> nourries au tamoxifène et des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> immunisées avec l'Ad Ct ou l'Ad Cre injecté en i.v. ou i.m.. (B) Les splénocytes et les NPC totaux sont marqués avec un tétramère de CMH-II chargé avec des peptides HA avant une étape d'enrichissement. Les cellules enrichies sont marquées phénotypiquement (Live/Dead, CD4, CD44, PD-1, CD25, CD19) et analysées par cytométrie en flux. Les fréquences de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques sont calculées parmi 10<sup>6</sup> cellules totales. (C) A la fin de l'expérimentation, les sérums sont dilués et testés pour la présence d'IgG et IgM, d'IgG1 ou d'IgG2a anti-HA. (D) Des échantillons de sang sont collectés avant le début et au cours de l'expérimentation afin de doser les ALAT plasmatiques. X représente le jour de l'injection des vecteurs

adénoviraux ou le début de la nutrition au tamoxifène pour les souris recevant simplement du tamoxifène. Tous les résultats représentent la moyenne (+ écart-type). Les valeurs p sont calculées avec un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis, \* = p <0.05, \*\* = p <0.01, \*\*\* = p <0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001.

De plus, Derkow *et al.* ont montré que le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> OVA-spécifiques effecteurs dans des souris transgéniques exprimant constitutivement OVA de manière tolérée à la surface des hépatocytes conduit à leur activation en périphérie (rate et ganglion lymphatique drainant le foie) mais n'induit pas leur recrutement dans le foie, ni le développement d'une hépatite [238].

L'ensemble de ces données démontrent donc que l'induction de l'expression hépatique d'un néo-antigène en condition non-inflammatoire permet de contrôler de façon robuste la mise en place des réponses T antigène-spécifiques locales.

Cependant, malgré l'inhibition de la réponse T CD4<sup>+</sup> antigène-spécifique, l'injection de l'Ad Cre en i.v. ou en i.m. chez des souris exprimant HA conduit à la génération d'IgG et d'IgM anti-HA à des taux similaires à ceux présents chez les souris simplement immunisées (unités normalisées : Ad Cre i.v. : 89,0 ± 4,95 ; Tamoxifène + Ad Cre i.v. : 79,50 ± 15,15 ; Ad Cre i.m. : 81,65 ± 5,72 ; Tamoxifène + Ad Cre i.m. : 82,54 ± 8,13) (Figure 30C). En s'intéressant plus particulièrement aux sous-types d'IgG produites, nous avons constaté que les souris immunisées post-expression de HA présentent moins d'IgG1 et IgG2a anti-HA que les souris simplement immunisées (Figure 30C). Or, les IgG sont particulièrement efficaces dans l'activation des réponses effectrices (activation du complément, ADCC, neutralisation), notamment les IgG1 murines sont associées à des réponses dépendantes des LT [268]. Les IgG1 et IgG2a murines se fixent aux récepteurs FcγRIII (CD16) [269] et FcγRIV [270] respectivement, dont l'activation dans des modèles murins est associée au développement d'arthrite et d'anaphylaxie [271].

La réduction de la réponse périphérique spécifique et l'absence de LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques chez des souris immunisées par l'Ad Cre i.v. post-expression hépatique HA suggèrent donc que l'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie en condition non-inflammatoire conduit à une tolérance robuste vis-à-vis de son expression et prévient le développement d'une auto-réactivité hépatique. Cette hypothèse est renforcée par l'absence d'inflammation hépatique chez ces souris (Figure 30D). Cette altération de l'effet inflammatoire

normalement provoqué par le vecteur adénoviral et la diminution de la réponse spécifique périphérique soulèvent l'hypothèse que des mécanismes immuns actifs se déroulent dans le foie de ces souris. Il serait donc intéressant d'évaluer dans ce contexte le phénotype précis des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques périphériques afin d'observer si ces cellules présentent un profil régulateur, de type Tregs ou Tr1.

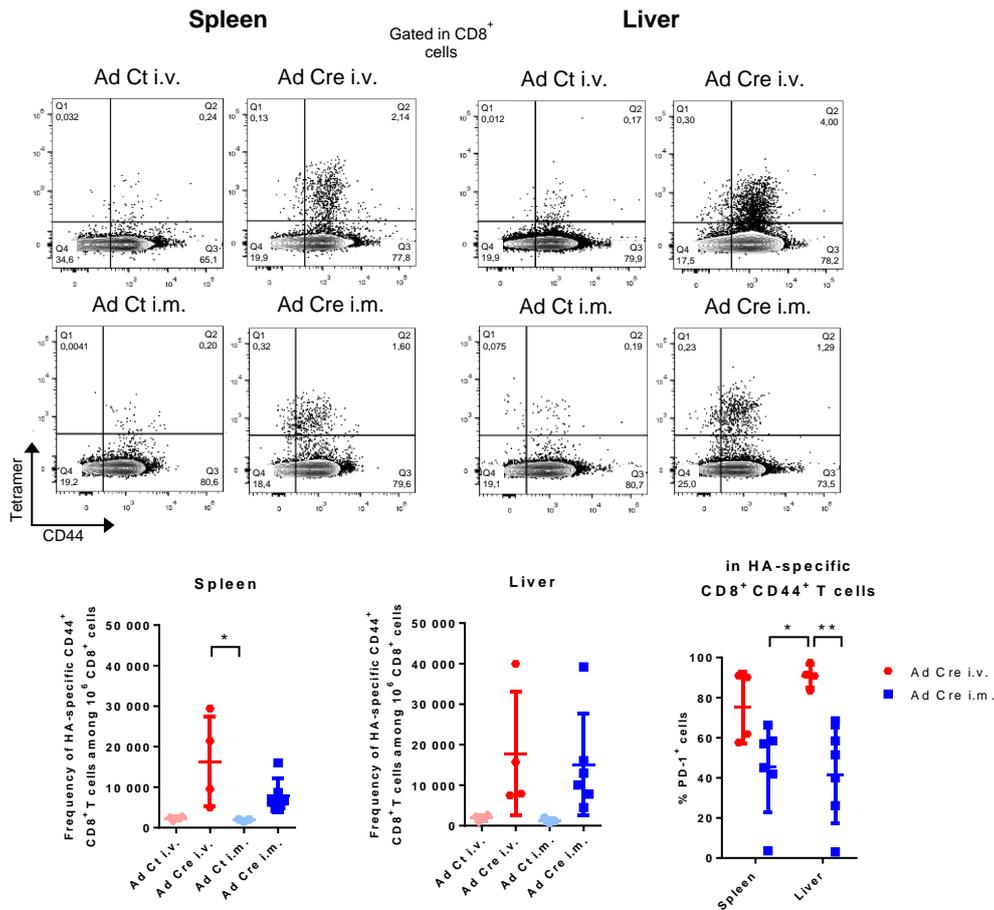
#### 4. Les LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les modèles Ad Cre

Malgré un rôle prépondérant des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs dans l'auto-immunité hépatique, nous nous sommes également intéressés à la composante T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique. Grâce à l'utilisation d'un tétramère formé de molécules de CMH-I murines H-2K<sup>d</sup> chargées avec des peptides HA, nous avons suivi le développement de LT CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les modèles Ad Cre (ou Ad Ct) injectés en i.v. ou en i.m..

Contrairement à l'utilisation du tétramère de CMH-II utilisé pour détecter les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques, le marquage tétramère CMH-I, du fait du nombre important de LT CD8<sup>+</sup> dans le foie, ne nécessite pas d'étape d'enrichissement en cellules tétramère<sup>+</sup>. Cette détection directe entraîne un bruit de fond plus important que dans le marquage tétramère CMH-II, mais celui-ci n'empêche pas la détection spécifique des LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques.

Nous avons observé que l'immunisation par l'Ad Cre injecté en i.v. ou en i.m. induit la génération de LT CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> HA-spécifiques périphériques dans la rate (Figure 31). De manière surprenante, alors que seul l'Ad Cre i.v. induit le recrutement hépatique de LT CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> HA-spécifiques, nous avons constaté que les modèles Ad Cre i.v. et i.m. montrent la présence de LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le foie (Figure 31).

Kaufman *et al.* dans des modèles murins et simiens d'immunisation i.m. via l'utilisation d'un adénovirus codant pour une protéine du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) ont montré une réponse T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique systémique avec la présence de ces cellules dans le sang, la rate, les plaques de Peyer et les muqueuses intestinales et vaginales [272]. Le recrutement de ces cellules dans les muqueuses s'accompagne de l'augmentation de l'expression à leur surface de marqueurs impliqués dans la migration des LT dans les



**Figure 31 : L'Ad Cre induit une forte réponse T CD8<sup>+</sup> HA-spécifique.** Des souris HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> reçoivent une injection i.v. ou i.m. de l'Ad Ct (n = 4 / n = 3) ou de l'Ad Cre (n = 4 / n = 6) puis euthanasiée à J15. Les splénocytes et les NPC totaux sont marqués avec un tétramère de CMH-I chargé avec des peptides HA puis sont marqués phénotypiquement (Live/Dead, CD8, CD44, PD-1, CD19) et analysés par cytométrie en flux. Dot plot représentatifs d'un co-marquage tétramère CMH-I/peptide et CD44, ciblé dans les cellules vivantes CD19<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>. Les fréquences de LT CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> HA-spécifiques sont calculées parmi 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> totales. Les pourcentages de cellules PD-1<sup>+</sup> sont calculés parmi les LT CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> HA-spécifiques. Les valeurs p sont calculées avec un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis ou ANOVA à deux facteurs, \* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01.

muqueuses (CD103, CCR9). De même, dans un modèle murin d'infection par le HCV (virus de l'hépatite C), Lang Khus *et al.* ont montré que l'immunisation ADN par voie i.m. permettait le recrutement de LT CD8<sup>+</sup> antigène-spécifiques dans le foie et ce en absence d'expression hépatique de l'antigène [273]. Ces données suggèrent donc que l'immunisation i.m. permet d'induire une réponse T CD8<sup>+</sup> antigène-spécifique systémique capable d'envahir divers organes de manière non-antigène-spécifique, expliquant la présence de LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le foie de souris Ad Cre i.m. n'exprimant pas HA.

De façon comparable à la réponse T CD4<sup>+</sup> HA-spécifique, nous avons constaté que les LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques présents dans la rate et le foie des souris Ad Cre i.v. étaient enrichis en

cellules PD-1<sup>+</sup> par rapport aux souris Ad Cre i.m.. Cela suggère une activation plus importante de ces cellules qui pourrait être associée à une reconnaissance antigénique.

Malgré la présence intra-hépatique de LT CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> HA-spécifiques dans le modèle Ad Cre i.m., les souris ne présentent pas d'inflammation ni d'infiltrat hépatiques. De plus, le fait que ces cellules spécifiques soient présentes dans le foie de souris Ad Cre i.m. indépendamment de l'expression hépatique de l'antigène et que leur fréquence ne soit pas augmentée dans le foie lorsque HA est exprimé (Ad Cre i.m. vs i.v.) renforce l'idée d'un rôle prépondérant des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans l'auto-réactivité hépatique du modèle Ad Cre i.v. par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques.

Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions dans un premier temps caractériser de manière plus approfondie le phénotype des LT CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques afin d'évaluer leur fonction, puis analyser leur stabilité à long terme. Des expériences de transfert adoptif des LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques provenant de la rate et du foie de souris Ad Cre i.v., voire Ad Cre i.m., dans des souris exprimant HA (tamoxifène) permettraient d'évaluer leur potentiel cytotoxique *in vivo* et leur rôle dans l'induction de l'auto-réactivité. L'induction de l'expression hépatique de HA par le tamoxifène provoquant une tolérance robuste, nous pourrions envisager différents protocoles de transfert, pré- et post-induction de l'expression de HA dans le foie.

Malgré leur potentiel auto-réactif, les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques générés dans le modèle Ad Cre i.v. sont présents en faible quantité. Il est par conséquent nécessaire d'envisager au préalable une étape d'expansion *in vitro* avant transfert adoptif afin de générer un nombre significatif de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques. La culture *in vitro* de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques requière des paramètres méthodologiques précis (choix des cytokines, choix des doses en cytokines et autres compléments du milieu, présence de CPA, stimulation antigène-spécifique), variant en fonction du type cellulaire d'intérêt. Des étapes de mise au point préalables seront donc nécessaires.

Puisque les LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> HA-spécifiques représentent une population de cellules mémoires, une autre possibilité serait le transfert adoptif de LT CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup> totaux mémoires (CD44<sup>high</sup> et CD44<sup>+</sup> respectivement), qui sont suffisamment fréquents pour être isolés et utilisés sans expansion *in vitro*.

Enfin, l'analyse histologique hépatique et le dosage sérique d'anticorps anti-HA après transfert adoptif isolé et combiné de chaque population T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (HA-spécifiques ou mémoires) permettraient d'évaluer leur implication respective dans l'auto-réactivité du modèle Ad Cre i.v..

## 5. Les LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques intra-hépatiques présentent un profil auto-réactif

La comparaison des profils transcriptomiques des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques des modèles d'immunisation anti-HA (Ad Cre i.m. ; Ad Cre i.v. ; Ad Cre i.m. + Tamoxifène), qu'ils proviennent de la rate ou du foie, montre que ces cellules ont un profil de base effecteur, marqué par la forte expression des marqueurs *Ifng*, *Tnf*, *Cxcr3* et *Cxcr6* et une faible voire absence d'expression de *Ccr6* (Supplementary figure 11 de la partie « Résultats »). Or, un phénotype CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> est caractéristique des lymphocytes Th1 [274]. La fréquence en ces lymphocytes ainsi que le taux de cytokines associées (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) ont d'ailleurs été montrés comme augmentés chez les patients atteints d'HAI [186,187]. En outre, les LT CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup> sont associés à l'inflammation systémique observée chez les patients atteints d'une co-infection tuberculose pulmonaire et virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [274] et les LT CD4<sup>+</sup> CXCR6<sup>+</sup> sont la source principale de cytokines pro-inflammatoires dans le tissu inflammé d'un modèle murin de maladie inflammatoire de l'intestin [275]. Ainsi, les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques générés dans les différents modèles d'immunisation anti-HA semblent représenter une population de lymphocytes Th1 pathogéniques pro-inflammatoires, ce qui va de pair avec l'environnement pro-inflammatoire induit par les vecteurs adénoviraux.

Malgré un profil de base commun des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les différentes conditions, les cellules spécifiques recrutées dans le foie (modèle Ad Cre i.v. et modèle Ad Cre i.m. + Tamoxifène) montrent un profil distinct de celui des cellules spécifiques présentes dans la rate des différents modèles (Figure 5 de la partie « Résultats », Tableau 6). Ces LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques hépatiques ont une expression augmentée de gènes associés à des marqueurs d'activation, tels que *Tnfrsf9* (4-1BB), *Tnfrsf18* (GITR) ou encore *Tnfrsf4* (OX40),

et associés à des médiateurs pro-inflammatoires, tels que *Ccl5* ou *Nkg7*. Elles montrent également l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'activation des LT, comme *Tigit*, *Ctla4*, *Ahr* ou encore *Ccr8*.

**Tableau 6 : Principaux gènes dont l'expression est augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques.**

	Gène / Protéine	Fonction(s)	Références
Pro-activation	<b>Tnfrsf9 / 4-1BB (CD137)</b>	Récepteur co-stimulateur ; marqueur d'activation ; ligand : 4-1BBL ; promeut la survie des LT ; induit la production d'IFN- $\gamma$ et de TNF- $\alpha$ par les LT ; participe à la réponse immunitaire anti-virale ; promeut l'expansion de Tregs	[276]
	<b>Tnfrsf18 / GITR (CD357)</b>	Récepteur co-stimulateur ; marqueur d'activation ; ligand : GITRL ; promeut la survie, l'activation et la prolifération des LT effecteurs ; inhibe la fonction suppressive des Tregs mais promeut leur expansion et leur prolifération <i>in vitro</i>	[277]
	<b>Tnfrsf4 / OX40 (CD134)</b>	Récepteur co-stimulateur ; marqueur d'activation ; ligand : OX40L ; promeut l'expansion, la survie et la fonction des LT effecteurs ; inhibe l'activité des Tregs	[278,279]
	<b>Bcl2l1 / BCL-XL</b>	Protéine anti-apoptotique ; expression augmentée par un mécanisme OX40-dépendant	[280]
	<b>Ccl3 / CCL3</b>	Induit le recrutement de LT	[281,282]
	<b>Ccl5 / CCL5</b>	<b>Chimiokine pro-inflammatoire ; récepteurs : CCR1, CCR3, CCR5 ; induit la migration des lymphocytes Th1</b>	[283–285]
	<b>Ccr2 / CCR2</b>	Ligand principal : CCL2 ; induit le recrutement de monocytes et macrophages ; induit la production de cytokines pro-inflammatoires ; inhibe l'activité des Tregs	[286,287]
	<b>Csf2 / GM-CSF</b>	Induit la prolifération cellulaire ; pro-inflammatoire	[288,289]
	<b>Itgae / CD103</b>	Marqueur des T <sub>RM</sub>	[290]
	<b>Nkg7 / NKG7</b>	<b>Pro-inflammatoire</b>	[291]
Régulateur de l'activation	<b>Tigit / TIGIT</b>	Récepteur inhibiteur ; marqueur d'activation ; ligand : CD155, CD112 ; inhibe la prolifération et la fonction des LT effecteurs ; promeut les fonctions immunosuppressives des Tregs	[292]
	<b>Ccl1 / CCL1 Ccr8 / CCR8</b>	Expression de CCR8 sur les Tregs et lymphocytes Th2 ; l'activité des Tregs est promue par l'axe CCR8/CCL1 ; CCL1 induit le recrutement intra-tumoral de Tregs	[293,294]
	<b>Casp3 / Caspase 3</b>	Impliqué dans la voie des caspases provoquant l'apoptose	[295]
	<b>Prdm1 / BLIMP-1</b>	Marqueur d'activation ; régulateur de différenciation des LT et LB ; inhibe la différenciation Th1 et Tfh ; promeut l'activité des Tregs	[296,297]
	<b>Traf6 / TRAF6</b>	Contrôle l'activation T ; participe au maintien de l'expression de FoxP3 dans les Tregs	[298,299]
	<b>Ctla-4 / CTLA-4</b>	Récepteur inhibiteur ; marqueur d'activation ; promeut l'activité suppressive des Tregs	[300]
	<b>Ahr / AHR</b>	Participe à l'activité suppressive des Tregs et lymphocytes Tr1	[301]
	<b>Cish / CISH</b>	Inhibe la prolifération des LT	[302,303]

**En gras** : gènes dont l'expression est augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques des modèles Ad Cre i.v. et Ad Cre i.m. + Tamoxifène par rapport aux LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques périphériques de tous les modèles

De façon intéressante, ce profil transcriptomique concorde avec les résultats obtenus par notre équipe chez des patients atteints d'HAJ présentant des anticorps anti-SLA [175]. La

stimulation *ex vivo* courte de PBMC (cellules mononucléées sanguines périphériques) provenant des patients avec un pool de peptides SLA a entraîné l'augmentation de l'expression du marqueur CD154 à la surface de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques [176], permettant leur isolement via une technique d'enrichissement en cellules CD154<sup>+</sup>. Ces LT CD4<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup> stimulés par les peptides SLA ne sont détectés que chez les patients présentant des anticorps anti-SLA et représentent une population unique de LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques auto-réactifs. L'analyse de ces cellules a conduit à l'identification d'une sous-population de LT CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> constituant le réservoir principal des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients, indépendamment de la présence d'anticorps anti-SLA. Enfin, le profil transcriptomique des LT CD4<sup>+</sup> SLA-spécifiques montre une expression augmentée des gènes *IFNG*, *TNF*, *TIGIT* et *CTLA4*, concordant avec le profil de nos LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques intra-hépatiques.

Cette similarité entre LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients et LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans nos modèles appuie notre hypothèse du développement d'une réponse auto-réactive dans ces derniers et confirme leur pertinence pour l'étude des événements précoces impliqués dans l'initiation de l'auto-réactivité hépatique.

Malgré un profil similaire entre cellules auto-réactives humaines et murines, l'expression hépatique de HA induite par l'Ad Cre i.v. est tolérée à long terme, s'accompagnant d'une diminution de l'infiltrat intra-hépatique spécifique et non-spécifique et de l'inflammation hépatique au cours du temps (Figure 6 de la partie « Résultats »). La réponse antigène-spécifique périphérique (anticorps anti-HA et LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques) persiste quant à elle (Figure 6 de la partie « Résultats »). Les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques persistants à long terme en périphérie conservent une signature transcriptomique pro-inflammatoire stable au cours du temps (Supplementary figure 14 de la partie « Résultats »). Ainsi, l'environnement hépatique semble induire une tolérance locale vis-à-vis de HA, sans pour autant impacter la réponse périphérique. Or, l'HA est une pathologie qui évolue de façon chronique, à bas bruit chez les patients, les hépatites fulminantes sont rares, ce qui suppose également un contrôle local de l'auto-réactivité.

L'ensemble de ces données suggèrent donc qu'un ajustement très fin s'opère dans le foie entre l'expression de molécules impliquées dans la régulation de la réponse immune et leur

niveau de mobilisation. Puisque cette balance varie entre l'Homme et la souris, nous pouvons supposer que des facteurs extrinsèques additionnels sont nécessaires afin d'enclencher une réponse auto-réactive chronique chez la souris.

## 6. L'étude de la rupture des mécanismes de tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs

Les molécules régulatrices exprimées par les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs humains et murins (PD-1, TIGIT, CTLA-4) sont des récepteurs de points de contrôles immunitaires (*immune checkpoint* en anglais, ICP). Les ICP participent au maintien de la tolérance immune en inhibant les réponses immunitaires, notamment l'activation des LT [304]. L'implication des ICP dans la prévention du développement de MAI a d'abord été démontrée dans des modèles de souris déficientes. Par exemple, la déficience en PD-1 ou en TIGIT augmente respectivement la prévalence du diabète de type 1 chez les souris NOD et la susceptibilité de souris C57BL/6 vis-à-vis du développement de la sclérose en plaques murine [304]. Les cellules auto-réactives présentant souvent des ICP à leur surface, les options thérapeutiques visent donc soit à activer ces molécules régulatrices, soit à dépléter les cellules porteuses d'ICP afin de limiter la réponse auto-réactive [304].

Du fait de la similarité entre les ICP exprimés par les LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs humains et murins et puisque nos modèles murins ne développent pas de réponse chronique, nous pouvons supposer qu'une altération de ces voies de signalisation régulatrices puisse être à l'origine de la mise en place d'une réponse chronique chez les patients. Afin d'identifier quels ICP sont nécessaires au contrôle de l'auto-réactivité dans nos modèles murins et identifier quelles voies pourraient être altérées chez les patients, nous pourrions utiliser des inhibiteurs de points de contrôles immunitaires (ou *immune checkpoint inhibitors* en anglais, ICI) dans nos modèles. Ces ICI, comme les anticorps bloquants anti-PD-1 ou anti-TIGIT, en se fixant aux ICP à la surface des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques pourraient permettre de lever le blocage de l'auto-réactivité dans nos modèles et déclencher une réponse chronique.

Afin d'étudier le potentiel de réactivation des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques persistants dans le modèle Ad Cre i.v. à long terme, nous pourrions également envisager un blocage des voies de régulation à partir de 8 semaines après l'injection de l'Ad Cre (point après lequel les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques ne sont plus présents dans le foie).

Enfin, puisque le traitement du CHC (carcinome hépatocellulaire) par l'immunothérapie a montré une meilleure efficacité de thérapies combinées par rapport aux monothérapies [121,122], nous pourrions comparer l'effet de monothérapies ou de thérapies combinées dans nos modèles.

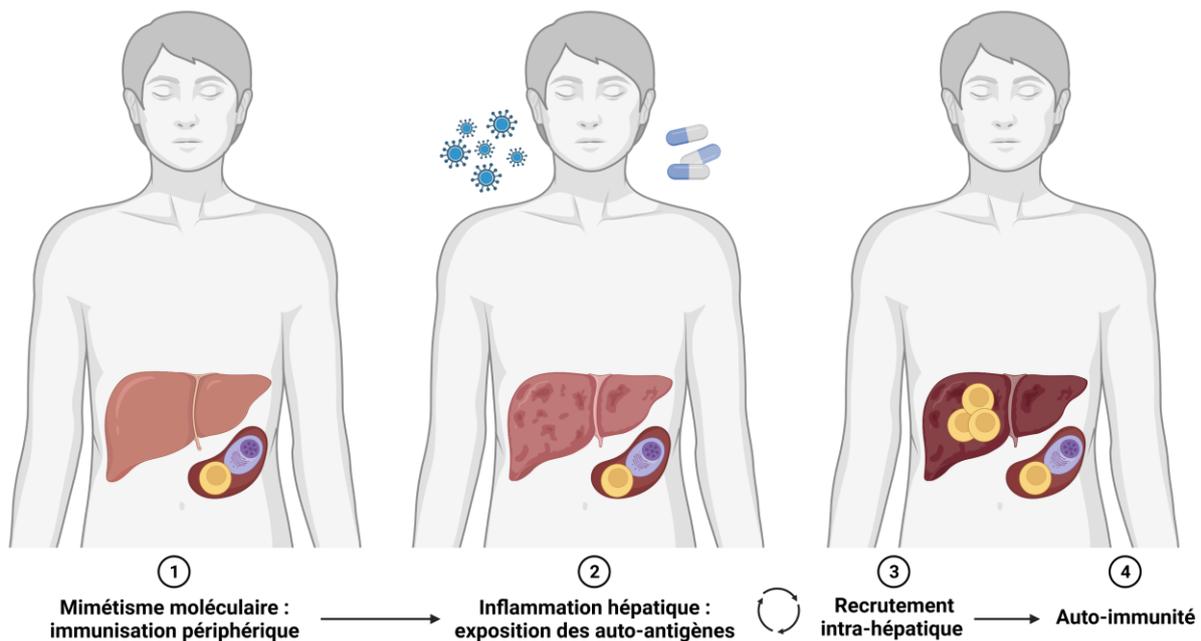
L'identification de voies de régulation impliquées dans la tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques pourrait conduire à l'étude de ces mêmes voies chez les patients atteints d'HAI. Des expériences *in vitro* de stimulation des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs identifiés chez les patients en présence d'agonistes d'ICP pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de l'HAI.

Chez les patients atteints d'HAI, l'altération de la voie de signalisation AHR, empêchant l'augmentation de l'expression de l'ICP CD39 à la surface des LT, est associée à un défaut de suppression des Tregs et à une résistance à l'immunosuppression des lymphocytes Th17. Cette altération est provoquée par l'augmentation de facteurs inhibiteurs tels que AHRR (*AHR repressor*) ou Era (récepteur  $\alpha$  des œstrogènes) pour les Tregs et HIF-1 $\alpha$  pour les Th17 [144]. Les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques auto-réactifs de nos modèles montrent une augmentation de l'expression du gène associé à AHR. Ainsi, nous pourrions considérer une expérience de blocage de cette voie dans nos modèles via l'utilisation d'un antagoniste AHR, ou plus indirectement via l'utilisation d'inhibiteurs de CD39, afin d'observer le rôle de la voie AHR dans la régulation de l'activation chronique des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques.

Enfin, les patients présentent également une perturbation de la voie Gal-9/Tim-3, avec une diminution de l'expression de Gal-9 à la surface des Tregs et de Tim-3 sur les LT CD4<sup>+</sup> effecteurs [144]. Nous pourrions donc analyser l'expression de Tim-3 à la surface de nos LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques, afin d'observer si son expression est stable, voire augmentée, et envisager des expériences de blocage de cette voie.

L'identification des voies de régulation de la réponse immune impliquées dans la tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients, mais cela ne permet pas de comprendre le ou les facteurs à l'origine de cette dérégulation, provoquant la mise en place d'une réponse chronique chez les patients.

Les facteurs environnementaux associés à l'HAI (infections virales, exposition à certains médicaments) sont sources d'inflammation [148]. Nous pouvons imaginer qu'un premier événement associé au mimétisme moléculaire provoque une immunisation périphérique vis-à-vis des auto-antigènes cibles dans l'HAI et génère ainsi des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs périphériques. Puis, des événements inflammatoires répétés dans le foie, provoqués par les facteurs environnementaux associés à l'HAI chez des personnes qui présentent une susceptibilité génétique à l'HAI (voir partie 3 de l'introduction, « 1.3. Les prédispositions génétiques et facteurs environnementaux »), pourraient engendrer une destruction hépatocytaire régulière et induire une exposition des auto-antigènes cibles de l'HAI, normalement intra-hépatocytaires. L'inflammation et l'exposition des auto-antigènes pourraient alors induire le recrutement intra-hépatique des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs périphériques qui déclencheraient une réponse auto-réactive dans le foie. Cette stimulation antigénique intra-hépatique répétée pourrait permettre l'activation chronique des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients (Figure 32).



**Figure 32 : Le mimétisme moléculaire associé à une exposition chronique de l'auto-antigène pourraient déclencher la réaction auto-immune hépatique.**

De plus, l'action des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs dans le foie pourrait participer à l'entretien d'une inflammation hépatique chronique. Or, l'inflammation peut modifier la composition en NPC (cellules non-parenchymateuses) dans le foie, voire altérer leurs fonctions [74]. Puisque ces

cellules sont des acteurs principaux de la tolérance hépatique, nous pouvons supposer qu'un déséquilibre de la composition ou de la fonction des NPC pourrait participer à l'activation chronique des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs chez les patients. En outre, la composante NPC semble altérée chez les patients, avec notamment un changement de morphologie de ces cellules pouvant suggérer une perturbation de leur fonction (voir Partie 3 de l'introduction, « 2.3. Les modifications des cellules non-parenchymateuses »).

L'étude de la composition en NPC chez les patients avant développement de l'HAI n'est pas envisageable. Par conséquent, dans un premier temps, nous pourrions observer l'effet d'une inflammation hépatique répétée sur la composition en NPC de souris naïves. Puis, dans les modèles Ad Cre i.v. et Ad Cre i.m. + Tamoxifène, nous pourrions induire des événements d'inflammation hépatique répétés (via l'utilisation de D-galactosamine/LPS ou de ConA) ou supprimer/inhiber de manière ciblée certains types de NPC comme les cellules de Kupffer (via l'utilisation de *clodronate liposome*), avant ou après initiation de la réponse auto-réactive. Le suivi de cette réponse (LT antigène-spécifiques, anticorps, histologie) sur le long terme nous permettrait d'évaluer l'effet de l'inflammation chronique et/ou de l'altération de la composition en NPC sur l'activation chronique des LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques et la mise en place d'une réponse auto-immune.

## 7. Perspectives pour une amélioration de la caractérisation de nos modèles

L'analyse de la signature transcriptomique des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques a permis l'identification de marqueurs d'activation et de régulation et d'un profil de sécrétion en cytokines et chimiokines associés à ces cellules. L'expression de ces marqueurs à la surface des cellules ou encore la capacité de sécrétion de ces cytokines et chimiokines doivent encore être confirmées d'un point de vue protéique.

Nous projetons donc d'étudier en cytométrie en flux, classique ou spectrale, l'expression des différents marqueurs de surface dont les gènes ont été montrés comme sur-exprimés dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques des différents modèles.

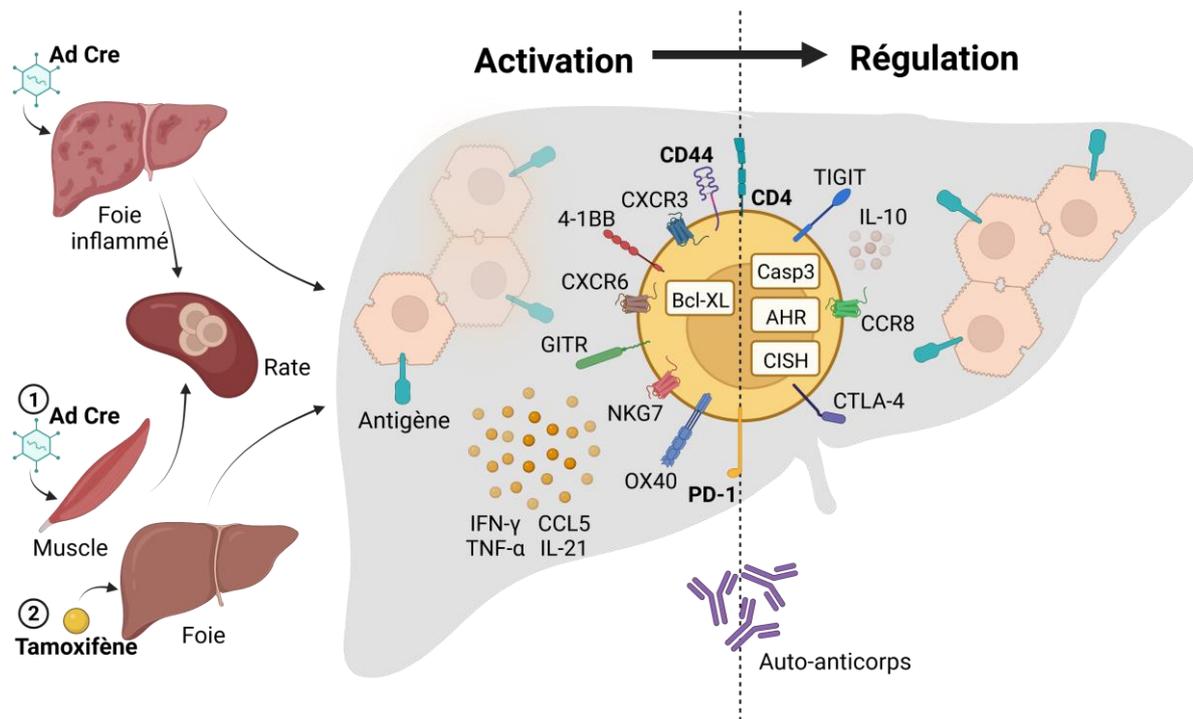
Les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques étant présents en faible nombre dans les organes, le marquage intra-cellulaire des cytokines/chimiokines pour une analyse en cytométrie en flux semble difficile. Nous pouvons donc envisager des techniques de stimulation *in vitro* avec des

peptides HA de splénocytes totaux ou de NPC, voire de LT CD4<sup>+</sup> mémoires (CD44<sup>high</sup>) non-spécifiques, provenant de souris immunisées, en comparaison avec des cellules provenant de souris non-immunisées. Des expériences préliminaires d'utilisation de kits Miltenyi (#130-090-984), permettant la co-liaison des cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$  et de l'IFN- $\gamma$  sécrété par ces cellules, montrent un potentiel prometteur de cette technique après stimulation *in vitro* de splénocytes totaux provenant de souris Ad Cre i.m. (comparé à des souris Ad Ct i.m.). Toutefois, ces kits étant limités dans le choix des cytokines détectables, nous pouvons également analyser par test ELISA la présence des cytokines et chimiokines d'intérêt dans le surnageant de culture après stimulation *in vitro*.

L'analyse d'un séquençage ARN étant complexe, nous nous sommes concentrés dans un premier temps sur les gènes dont l'expression était augmentée dans les LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques. Or l'expression de nombreux gènes est également diminuée dans ces cellules. Il conviendra donc d'étudier en détail ce profil transcriptomique de « *down-regulation* ».

Enfin, d'un point de vue général, nous pourrions améliorer la caractérisation de la réponse auto-réactive dans nos modèles en établissant un score histologique des lésions hépatiques observées et en analysant la présence d'auto-anticorps (ANA, SMA, etc...) et d'une hypergammaglobulinémie, caractéristiques de l'HAI. La capacité de suppression et/ou de régulation des LT CD4<sup>+</sup> HA-spécifiques dans les différents modèles et à différents temps pourra également être étudiée via le développement de protocoles de tests *in vitro*.

# **CONCLUSION**



**Figure 33 : L'auto-réactivité hépatique est induite dans un contexte d'immunisation périphérique mais est fortement régulée chez la souris.** L'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie dans un contexte d'immunisation périphérique (préexistant ou concomitant) est suffisant pour induire une auto-réactivité hépatique. Celle-ci se caractérise par une réponse adaptative cellulaire et humorale en périphérie et le recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques auto-réactifs au profil pro-inflammatoire Th1 activé. Toutefois, cette réponse cellulaire auto-réactive est fortement régulée et conduit à la tolérance à long terme de l'expression hépatique de l'auto-antigène.

En conclusion, grâce au développement d'un nouveau modèle murin mimant l'auto-réactivité hépatique, nous avons montré qu'un contexte d'immunisation périphérique, préexistant ou concomitant à l'induction de l'expression hépatique d'un néo-antigène, est suffisant pour induire une réponse auto-réactive hépatique. Celle-ci se caractérise par la génération d'une réponse humorale et cellulaire (T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>) spécifique de l'antigène en périphérie et au recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques associé à une inflammation et des dommages hépatiques. La mise en place de la réponse auto-réactive semble être générée en périphérie et est associée au recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> antigène-spécifiques présentant un profil pro-inflammatoire de type Th1, proche de celui observé chez les patients atteints d'hépatite auto-immune. Toutefois, malgré un recrutement spécifique de ces cellules associé à des dommages tissulaires, l'environnement hépatique semble induire une tolérisation des LT CD4<sup>+</sup> auto-réactifs. Ceci conduit à un contrôle de leur réactivité et une tolérance à long terme de l'auto-antigène dans le foie (Figure 33).

L'identification de voies de régulation impliquées dans le contrôle de cette réponse auto-réactive antigène-spécifique murine pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la rupture de la tolérance chez les patients atteints d'hépatite auto-immune, menant à une réponse chronique, et révéler ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques spécifiques de la pathologie.

# RÉFÉRENCES

- [1] Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Principles of innate and adaptive immunity 2001.
- [2] Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>.
- [3] Cruz-Tapias P, Castiblanco J, Anaya J-M. Major histocompatibility complex: Antigen processing and presentation. El Rosario University Press; 2013.
- [4] Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006;126:32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>.
- [5] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of Effector CD4 T Cell Populations. *Annu Rev Immunol* 2010;28:445–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101212>.
- [6] Cano RLE, Lopera HDE. Introduction to T and B lymphocytes. El Rosario University Press; 2013.
- [7] Singh RP, Hasan S, Sharma S, Nagra S, Yamaguchi DT, Wong DTW, et al. Th17 cells in inflammation and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2014;13:1174–81. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.08.019>.
- [8] Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler A-K, Rizzi M. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:434. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0434-8>.
- [9] Forthal DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr* 2014;2:1–17.
- [10] Parra-Medina R, Quintero-Ronderos P, Rodríguez ÉG. The complement system. El Rosario University Press; 2013.
- [11] Stavnezer J, Guikema JEJ, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 2008;26:261–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090248>.
- [12] Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The distribution and functions of immunoglobulin isotypes. *Immunobiol Immune Syst Health Dis* 5th Ed 2001.
- [13] Izquierdo JH, Cañas CA, Tobón GJ. B lymphocytes in autoimmunity. El Rosario University Press; 2013.
- [14] Gonzalez S, González-Rodríguez AP, Suárez-Álvarez B, López-Soto A, Huergo-Zapico L, Lopez-Larrea C. Conceptual aspects of self and nonself discrimination. *Self Nonself* 2011;2:19–25. <https://doi.org/10.4161/self.2.1.15094>.
- [15] Kyewski B, Klein L. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:571–606. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115601>.
- [16] Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009;9:833–44. <https://doi.org/10.1038/nri2669>.
- [17] Wang L, Wang F-S, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med* 2015;278:369–95. <https://doi.org/10.1111/joim.12395>.
- [18] Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 2015;125:2228–33. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>.
- [19] Roudier J, Balandraud N, Mugnier B, Guis S, Reviron D, Roudier C, et al. Rôle des molécules HLA-DR dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde. *Joint Bone Spine* 2005. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2005.01.005>.
- [20] Tsai S, Santamaria P. MHC Class II Polymorphisms, Autoreactive T-Cells, and Autoimmunity. *Front Immunol* 2013;4.
- [21] Szafranska K, Kruse LD, Holte CF, McCourt P, Zapotoczny B. The wHole Story About Fenestrations in LSEC. *Front Physiol* 2021;12.
- [22] Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:88–110. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.200>.
- [23] Kubes P, Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* 2018;36:247–77. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415>.

- [24] LeCluyse EL, Norona LM, Presnell SC. Liver—Structure and Microanatomy☆. Ref. Module Biomed. Sci., Elsevier; 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05123-0>.
- [25] Pillarisetty VG, Shah AB, Miller G, Bleier JI, DeMatteo RP. Liver Dendritic Cells Are Less Immunogenic Than Spleen Dendritic Cells because of Differences in Subtype Composition. *J Immunol* 2004;172:1009–17. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.1009>.
- [26] Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JI, Shah AB, Dematteo RP. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol Baltim Md* 1950 2005;174:2612–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2612>.
- [27] Trobonjaca Z, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R, Reimann J. Activating immunity in the liver. I. Liver dendritic cells (but not hepatocytes) are potent activators of IFN-gamma release by liver NKT cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 2001;167:1413–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1413>.
- [28] Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr* 2014;3:344–63. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2014.11.03>.
- [29] Schrage A, Wechsung K, Neumann K, Schumann M, Schulzke J-D, Engelhardt B, et al. Enhanced T cell transmigration across the murine liver sinusoidal endothelium is mediated by transcytosis and surface presentation of chemokines. *Hepato Baltim Md* 2008;48:1262–72. <https://doi.org/10.1002/hep.22443>.
- [30] Breiner KM, Schaller H, Knolle PA. Endothelial cell-mediated uptake of a hepatitis B virus: a new concept of liver targeting of hepatotropic microorganisms. *Hepato Baltim Md* 2001;34:803–8. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27810>.
- [31] Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature* 1969;223:472–6. <https://doi.org/10.1038/223472a0>.
- [32] Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, et al. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 2005;77:626–33. <https://doi.org/10.1189/jlb.0604332>.
- [33] Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *J Immunol Baltim Md* 1950 1999;162:1401–7.
- [34] Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepato* 1995;22:226–9. [https://doi.org/10.1016/0168-8278\(95\)80433-1](https://doi.org/10.1016/0168-8278(95)80433-1).
- [35] Knolle PA, Uhrig A, Hegenbarth S, Löser E, Schmitt E, Gerken G, et al. IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules. *Clin Exp Immunol* 1998;114:427–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1998.00713.x>.
- [36] Schildberg FA, Hegenbarth SI, Schumak B, Limmer A, Knolle PA. Liver sinusoidal endothelial cells veto CD8 T cell activation by antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Immunol* 2008;38:957–67. <https://doi.org/10.1002/eji.200738060>.
- [37] You Q, Cheng L, Kedl RM, Ju C. Mechanism of T Cell Tolerance Induction by Murine Hepatic Kupffer Cells. *Hepato Baltim Md* 2008;48:978–90. <https://doi.org/10.1002/hep.22395>.
- [38] Diehl L, Schurich A, Grochtmann R, Hegenbarth S, Chen L, Knolle PA. Tolerogenic maturation of liver sinusoidal endothelial cells promotes B7-homolog 1-dependent CD8+ T cell tolerance. *Hepato Baltim Md* 2008;47:296–305. <https://doi.org/10.1002/hep.21965>.

- [39] Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 2000;6:1348–54. <https://doi.org/10.1038/82161>.
- [40] Breous E, Somanathan S, Vandenberghe LH, Wilson JM. Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver. *Hepatology* 2009;50:612–21. <https://doi.org/10.1002/hep.23043>.
- [41] Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007;45:475–85. <https://doi.org/10.1002/hep.21498>.
- [42] Warren A, Couteur DGL, Fraser R, Bowen DG, McCaughan GW, Bertolino P. T lymphocytes interact with hepatocytes through fenestrations in murine liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* 2006;44:1182–90. <https://doi.org/10.1002/hep.21378>.
- [43] Holz LE, Benseler V, Bowen DG, Bouillet P, Strasser A, O'Reilly L, et al. Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology* 2008;135:989–97. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.078>.
- [44] Herkel J, Jagemann B, Wiegand C, Lazaro JFG, Lueth S, Kanzler S, et al. MHC class II-expressing hepatocytes function as antigen-presenting cells and activate specific CD4 T lymphocytes. *Hepatology* 2003;37:1079–85. <https://doi.org/10.1053/jhep.2003.50191>.
- [45] Wiegand C, Wolint P, Frenzel C, Cheruti U, Schmitt E, Oxenius A, et al. Defective T helper response of hepatocyte-stimulated CD4 T cells impairs antiviral CD8 response and viral clearance. *Gastroenterology* 2007;133:2010–8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.09.007>.
- [46] Bamboat ZM, Stableford JA, Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Welles AP, et al. Human liver dendritic cells promote T cell hyporesponsiveness. *J Immunol* 2009;182:1901–11. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803404>.
- [47] Tokita D, Sumpter TL, Raimondi G, Zahorchak AF, Wang Z, Nakao A, et al. Poor allostimulatory function of liver plasmacytoid DC is associated with pro-apoptotic activity, dependent on regulatory T cells. *J Hepatol* 2008;49:1008–18. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.028>.
- [48] Winau F, Hegasy G, Weiskirchen R, Weber S, Cassan C, Sieling PA, et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 2007;26:117–29. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.11.011>.
- [49] Ichikawa S, Mucida D, Tyznik AJ, Kronenberg M, Cheroutre H. Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders. *J Immunol* 2011;186:5549–55. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003917>.
- [50] Dunham RM, Thapa M, Velazquez VM, Elrod EJ, Denning TL, Pulendran B, et al. Hepatic stellate cells preferentially induce Foxp3+ regulatory T cells by production of retinoic acid. *J Immunol* 2013;190:2009–16. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201937>.
- [51] Schildberg FA, Wojtalla A, Siegmund SV, Endl E, Diehl L, Abdullah Z, et al. Murine hepatic stellate cells veto CD8 T cell activation by a CD54-dependent mechanism. *Hepatology* 2011;54:262–72. <https://doi.org/10.1002/hep.24352>.
- [52] Yu M-C, Chen C-H, Liang X, Wang L, Gandhi CR, Fung JJ, et al. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004;40:1312–21. <https://doi.org/10.1002/hep.20488>.
- [53] Inverso D, Iannacone M. Spatiotemporal dynamics of effector CD8+ T cell responses within the liver. *J Leukoc Biol* 2016;99:51–5. <https://doi.org/10.1189/jlb.4MR0415-150R>.
- [54] Ficht X, Iannacone M. Immune surveillance of the liver by T cells. *Sci Immunol* 2020;5:eaba2351. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba2351>.

- [55] Bénéchet AP, De Simone G, Di Lucia P, Cilenti F, Barbiera G, Le Bert N, et al. Dynamics and genomic landscape of CD8+ T cells undergoing hepatic priming. *Nature* 2019;574:200–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1620-6>.
- [56] Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, Fazekas de St Groth B. Antigen-specific primary activation of CD8+ T cells within the liver. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;166:5430–8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5430>.
- [57] Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in Distinct Stages of Functional Impairment. *J Virol* 2003;77:4911–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.8.4911-4927.2003>.
- [58] Benseler V, Warren A, Vo M, Holz LE, Tay SS, Le Couteur DG, et al. Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:16735–40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112251108>.
- [59] Mühlbauer M, Fleck M, Schütz C, Weiss T, Froh M, Blank C, et al. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 2006;45:520–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.05.007>.
- [60] Berg M, Wingender G, Djandji D, Hegenbarth S, Momburg F, Hämmerling G, et al. Cross-presentation of antigens from apoptotic tumor cells by liver sinusoidal endothelial cells leads to tumor-specific CD8+ T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2006;36:2960–70. <https://doi.org/10.1002/eji.200636033>.
- [61] Horst AK, Neumann K, Diehl L, Tiegs G. Modulation of liver tolerance by conventional and nonconventional antigen-presenting cells and regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol* 2016;13:277–92. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.112>.
- [62] Katz SC, Pillarisetty VG, Bleier JI, Kingham TP, Chaudhry UI, Shah AB, et al. Conventional liver CD4 T cells are functionally distinct and suppressed by environmental factors. *Hepatology* 2005;42:293–300. <https://doi.org/10.1002/hep.20795>.
- [63] Zeller JC, Panoskaltzis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, et al. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol Baltim Md 1950* 1999;163:3684–91.
- [64] Chen Y, Jiang G, Yang H-R, Gu X, Wang L, Hsieh C-C, et al. Distinct response of liver myeloid dendritic cells to endotoxin is mediated by IL-27. *J Hepatol* 2009;51:510–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.04.026>.
- [65] Carambia A, Frenzel C, Bruns OT, Schwinge D, Reimer R, Hohenberg H, et al. Inhibition of inflammatory CD4 T cell activity by murine liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2013;58:112–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.09.008>.
- [66] Derkow K, Müller A, Eickmeier I, Seidel D, Rust Moreira MV, Kruse N, et al. Failure of CD4 T-cells to respond to liver-derived antigen and to provide help to CD8 T-cells. *PloS One* 2011;6:e21847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021847>.
- [67] Tay SS, Wong YC, Roediger B, Sierro F, Lu B, McDonald DM, et al. Intrahepatic activation of naive CD4+ T cells by liver-resident phagocytic cells. *J Immunol Baltim Md 1950* 2014;193:2087–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400037>.
- [68] Perrin GQ, Zolotukhin I, Sherman A, Biswas M, de Jong YP, Terhorst C, et al. Dynamics of antigen presentation to transgene product-specific CD4+ T cells and of Treg induction upon hepatic AAV gene transfer. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2016;3:16083. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.83>.
- [69] Khanna A, Morelli AE, Zhong C, Takayama T, Lu L, Thomson AW. Effects of Liver-Derived Dendritic Cell Progenitors on Th1- and Th2-Like Cytokine Responses In Vitro and In Vivo. *J Immunol* 2000;164:1346–54. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.3.1346>.
- [70] Klugewitz K, Blumenthal-Barby F, Schrage A, Knolle PA, Hamann A, Crispe IN. Immunomodulatory Effects of the Liver: Deletion of Activated CD4+ Effector Cells and Suppression of IFN-γ-Producing Cells After Intravenous Protein Immunization. *J Immunol* 2002;169:2407–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.5.2407>.

- [71] Neumann K, Rudolph C, Neumann C, Janke M, Amsen D, Scheffold A. Liver sinusoidal endothelial cells induce immunosuppressive IL-10-producing Th1 cells via the Notch pathway. *Eur J Immunol* 2015;45:2008–16. <https://doi.org/10.1002/eji.201445346>.
- [72] Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, et al. Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 1999;116:1428–40. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70508-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70508-1).
- [73] Carambia A, Freund B, Schwinge D, Heine M, Laschtowitz A, Huber S, et al. TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 2014;61:594–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.04.027>.
- [74] Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P, et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatol Baltim Md* 2015;62:279–91. <https://doi.org/10.1002/hep.27793>.
- [75] Kruse N, Neumann K, Schrage A, Derkow K, Schott E, Erben U, et al. Priming of CD4<sup>+</sup> T cells by liver sinusoidal endothelial cells induces CD25<sup>low</sup> forkhead box protein 3-regulatory T cells suppressing autoimmune hepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2009;50:1904–13. <https://doi.org/10.1002/hep.23191>.
- [76] Xu X, Zhang S, Jin R, Wang K, Li P, Lin L, et al. Retention and tolerance of autoreactive CD4<sup>+</sup> recent thymic emigrants in the liver. *J Autoimmun* 2015;56:87–97. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2014.10.006>.
- [77] Xu X, Jin R, Li M, Wang K, Zhang S, Hao J, et al. Liver sinusoidal endothelial cells induce tolerance of autoreactive CD4<sup>+</sup> recent thymic emigrants. *Sci Rep* 2016;6:19861. <https://doi.org/10.1038/srep19861>.
- [78] Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol* 2009;10:1178–84. <https://doi.org/10.1038/ni.1791>.
- [79] Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013;14:996–1006. <https://doi.org/10.1038/ni.2691>.
- [80] Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, et al. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005;79:3016–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.5.3016-3027.2005>.
- [81] Das A, Hoare M, Davies N, Lopes AR, Dunn C, Kennedy PTF, et al. Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2008;205:2111–24. <https://doi.org/10.1084/jem.20072076>.
- [82] Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, et al. Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 2007;45:588–601. <https://doi.org/10.1002/hep.21541>.
- [83] Wedemeyer H, He X-S, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, et al. Impaired Effector Function of Hepatitis C Virus-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol* 2002;169:3447–58. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3447>.
- [84] Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, et al. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010;138:682–93, 693.e1-4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.052>.
- [85] Park S-H, Veerapu NS, Shin E-C, Biancotto A, McCoy JP, Capone S, et al. Subinfectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infection. *Nat Med* 2013;19:1638–42. <https://doi.org/10.1038/nm.3408>.
- [86] Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, et al. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C

- Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. *J Virol* 2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.00639-09>.
- [87] Mohammadizad H, Shahbazi M, Hasanjani Roushan MR, Soltanzadeh-Yamchi M, Mohammadnia-Afrouzi M. TIM-3 as a marker of exhaustion in CD8+ T cells of active chronic hepatitis B patients. *Microb Pathog* 2019;128:323–8. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.026>.
- [88] Mengshol JA, Golden-Mason L, Arikawa T, Smith M, Niki T, McWilliams R, et al. A Crucial Role for Kupffer Cell-Derived Galectin-9 in Regulation of T Cell Immunity in Hepatitis C Infection. *PLOS ONE* 2010;5:e9504. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009504>.
- [89] Kared H, Fabre T, Bédard N, Bruneau J, Shoukry NH. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003422. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003422>.
- [90] Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Panther E, Urbani S, Ferrari C, et al. T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005;79:7860–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7860-7867.2005>.
- [91] Langhans B, Nischalke HD, Krämer B, Hausen A, Dold L, van Heteren P, et al. Increased peripheral CD4+ regulatory T cells persist after successful direct-acting antiviral treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2017;66:888–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.12.019>.
- [92] Li W, Han J, Wu H. Regulatory T-cells promote hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma progression. *Chronic Dis Transl Med* 2016;2:67–80. <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2016.09.001>.
- [93] Jung MK, Shin E-C. Regulatory T Cells in Hepatitis B and C Virus Infections. *Immune Netw* 2016;16:330–6. <https://doi.org/10.4110/in.2016.16.6.330>.
- [94] Raziourrouh B, Ulsenheimer A, Schraut W, Heeg M, Kurktschiev P, Zachoval R, et al. Inhibitory molecules that regulate expansion and restoration of HCV-specific CD4+ T cells in patients with chronic infection. *Gastroenterology* 2011;141:1422–31, 1431.e1-6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.07.004>.
- [95] Fahey LM, Wilson EB, Elsaesser H, Fistonich CD, McGavern DB, Brooks DG. Viral persistence redirects CD4 T cell differentiation toward T follicular helper cells. *J Exp Med* 2011;208:987–99. <https://doi.org/10.1084/jem.20101773>.
- [96] Smits M, Zoldan K, Ishaque N, Gu Z, Jechow K, Wieland D, et al. Follicular T helper cells shape the HCV-specific CD4+ T cell repertoire after virus elimination. *J Clin Invest* 2020;130:998–1009. <https://doi.org/10.1172/JCI129642>.
- [97] Osokine I, Snell LM, Cunningham CR, Yamada DH, Wilson EB, Elsaesser HJ, et al. Type I interferon suppresses de novo virus-specific CD4 Th1 immunity during an established persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:7409–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401662111>.
- [98] Snell LM, Osokine I, Yamada DH, De la Fuente JR, Elsaesser HJ, Brooks DG. Overcoming CD4 Th1 cell fate restrictions to sustain antiviral CD8 T cells and control persistent virus infection. *Cell Rep* 2016;16:3286–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.065>.
- [99] Ge J, Wang K, Meng Q-H, Qi Z-X, Meng F-L, Fan Y-C. Implication of Th17 and Th1 cells in patients with chronic active hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010;30:60–7. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9328-2>.
- [100] Bonthuis DJ. Lymphocytic choriomeningitis virus: An under-recognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin Pediatr Neurol* 2012;19:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2012.02.002>.
- [101] Crawford A, Angelosanto JM, Kao C, Doering TA, Odorizzi PM, Barnett BE, et al. Molecular and transcriptional basis of CD4+ T cell dysfunction during chronic infection. *Immunity* 2014;40:289–302. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.005>.

- [102] Parish IA, Marshall HD, Staron MM, Lang PA, Brüstle A, Chen JH, et al. Chronic viral infection promotes sustained Th1-derived immunoregulatory IL-10 via BLIMP-1. *J Clin Invest* 2014;124:3455–68. <https://doi.org/10.1172/JCI66108>.
- [103] Sandu I, Cerletti D, Oetiker N, Borsa M, Wagen F, Spadafora I, et al. Landscape of Exhausted Virus-Specific CD8 T Cells in Chronic LCMV Infection. *Cell Rep* 2020;32:108078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108078>.
- [104] Llovet JM, Kelley RK, Villanueva A, Singal AG, Pikarsky E, Roayaie S, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 2021;7:1–28. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00240-3>.
- [105] Fujiwara K, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Kobayashi Y, Uemura M, et al. Decreased expression of B7 costimulatory molecules and major histocompatibility complex class-I in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:1121–7. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2004.03467.x>.
- [106] Shalpour S, Lin X-J, Bastian IN, Brain J, Burt AD, Aksenov AA, et al. Inflammation-induced IgA+ cells dismantle anti-liver cancer immunity. *Nature* 2017;551:340–5. <https://doi.org/10.1038/nature24302>.
- [107] Thimme R, Neagu M, Boettler T, Neumann-Haefelin C, Kersting N, Geissler M, et al. Comprehensive analysis of the alpha-fetoprotein-specific CD8+ T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008;48:1821–33. <https://doi.org/10.1002/hep.22535>.
- [108] Dolina JS, Van Braeckel-Budimir N, Thomas GD, Salek-Ardakani S. CD8+ T Cell Exhaustion in Cancer. *Front Immunol* 2021;12:715234. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.715234>.
- [109] Zheng C, Zheng L, Yoo J-K, Guo H, Zhang Y, Guo X, et al. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 2017;169:1342–1356.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.035>.
- [110] Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi R-Z, Liu Z-W, Zhang J-Y, et al. PD-1 and PD-L1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 2011;128:887–96. <https://doi.org/10.1002/ijc.25397>.
- [111] Zhou G, Sprengers D, Boor PPC, Doukas M, Schutz H, Mancham S, et al. Antibodies Against Immune Checkpoint Molecules Restore Functions of Tumor-Infiltrating T Cells in Hepatocellular Carcinomas. *Gastroenterology* 2017;153:1107–1119.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.017>.
- [112] Kim H-D, Song G-W, Park S, Jung MK, Kim MH, Kang HJ, et al. Association Between Expression Level of PD1 by Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells and Features of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 2018;155:1936–1950.e17. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.030>.
- [113] Witkowski M, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, Büttner N, Breous E, Kersting N, et al. Lack of ex vivo peripheral and intrahepatic  $\alpha$ -fetoprotein-specific CD4+ responses in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011;129:2171–82. <https://doi.org/10.1002/ijc.25866>.
- [114] Jia Y, Zeng Z, Li Y, Li Z, Jin L, Zhang Z, et al. Impaired Function of CD4+ T Follicular Helper (Tfh) Cells Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression. *PLOS ONE* 2015;10:e0117458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117458>.
- [115] Qin S, Ma S, Huang X, Lu D, Zhou Y, Jiang H. Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chin J Cancer Res* 2014;26:135–41. <https://doi.org/10.3978/j.issn.1000-9604.2014.02.14>.
- [116] Fu J, Xu D, Liu Z, Shi M, Zhao P, Fu B, et al. Increased Regulatory T Cells Correlate With CD8 T-Cell Impairment and Poor Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients. *Gastroenterology* 2007;132:2328–39. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.102>.

- [117] Yang XH, Yamagiwa S, Ichida T, Matsuda Y, Sugahara S, Watanabe H, et al. Increase of CD4+CD25+ regulatory T-cells in the liver of patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006;45:254–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2006.01.036>.
- [118] Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, et al. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatol Baltim Md* 2005;41:722–30. <https://doi.org/10.1002/hep.20644>.
- [119] Wu H, Chen P, Liao R, Li Y-W, Yi Y, Wang J-X, et al. Intratumoral regulatory T cells with higher prevalence and more suppressive activity in hepatocellular carcinoma patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1555–64. <https://doi.org/10.1111/jgh.12202>.
- [120] Prieto J, Melero I, Sangro B. Immunological landscape and immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;12:681–700. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.173>.
- [121] Sangro B, Sarobe P, Hervás-Stubbs S, Melero I. Advances in immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021;18:525–43. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00438-0>.
- [122] Roth GS, Decaens T. Liver immunotolerance and hepatocellular carcinoma: Pathophysiological mechanisms and therapeutic perspectives. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2017;87:101–12. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.010>.
- [123] Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med* 2019;70:273–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-012017-043332>.
- [124] Maestro S, Weber ND, Zabaleta N, Aldabe R, Gonzalez-Aseguinolaza G. Novel vectors and approaches for gene therapy in liver diseases. *JHEP Rep Innov Hepatol* 2021;3:100300. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2021.100300>.
- [125] Nienhuis AW, Nathwani AC, Davidoff AM. Gene Therapy for Hemophilia. *Mol Ther* 2017;25:1163–7. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.033>.
- [126] Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EGD, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371:1994–2004. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407309>.
- [127] Cao O, Dobrzynski E, Wang L, Nayak S, Mingle B, Terhorst C, et al. Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* 2007;110:1132–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-073304>.
- [128] Markusic DM, Hoffman BE, Perrin GQ, Nayak S, Wang X, LoDuca PA, et al. Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies. *EMBO Mol Med* 2013;5:1698–709. <https://doi.org/10.1002/emmm.201302859>.
- [129] Hoffman BE, Martino AT, Sack BK, Cao O, Liao G, Terhorst C, et al. Nonredundant Roles of IL-10 and TGF- $\beta$  in Suppression of Immune Responses to Hepatic AAV-Factor IX Gene Transfer. *Mol Ther* 2011;19:1263–72. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.33>.
- [130] Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, Russo F, Sanvito F, Naldini L, et al. Insulin B chain 9-23 gene transfer to hepatocytes protects from type 1 diabetes by inducing Ag-specific FoxP3+ Tregs. *Sci Transl Med* 2015;7:289ra81. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa3032>.
- [131] Keeler GD, Kumar S, Palaschak B, Silverberg EL, Markusic DM, Jones NT, et al. Gene Therapy-Induced Antigen-Specific Tregs Inhibit Neuro-inflammation and Reverse Disease in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther* 2018;26:173–83. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.001>.
- [132] Cunningham EC, Tay SS, Wang C, Rtshiladze M, Wang ZZ, McGuffog C, et al. Gene Therapy for Tolerance: High-Level Expression of Donor Major Histocompatibility Complex in the Liver Overcomes Naive and Memory Alloresponses to Skin Grafts. *Transplantation* 2013;95:70. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318278d39a>.
- [133] Le Guen V, Judor J-P, Boeffard F, Gauttier V, Ferry N, Souillou J-P, et al. Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to pancreatic islet graft by inducing

- CD8(+) regulatory T cells. *J Hepatol* 2017;66:765–77. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.11.019>.
- [134] De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomedicine* 2008;3:133–49.
- [135] Zhang Y-N, Poon W, Tavares AJ, McGilvray ID, Chan WCW. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J Control Release Off J Control Release Soc* 2016;240:332–48. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.020>.
- [136] Liu Q, Wang X, Liu X, Kumar S, Gochman G, Ji Y, et al. Use of Polymeric Nanoparticle Platform Targeting the Liver To Induce Treg-Mediated Antigen-Specific Immune Tolerance in a Pulmonary Allergen Sensitization Model. *ACS Nano* 2019;13:4778–94. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01444>.
- [137] Yu X, Chen L, Liu J, Dai B, Xu G, Shen G, et al. Immune modulation of liver sinusoidal endothelial cells by melittin nanoparticles suppresses liver metastasis. *Nat Commun* 2019;10:574. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08538-x>.
- [138] Oršolić N. Bee venom in cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2012;31:173–94. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9339-3>.
- [139] Umeshappa CS, Singha S, Blanco J, Shao K, Nanjundappa RH, Yamanouchi J, et al. Suppression of a broad spectrum of liver autoimmune pathologies by single peptide-MHC-based nanomedicines. *Nat Commun* 2019;10:2150. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09893-5>.
- [140] Umeshappa CS, Mbongue J, Singha S, Mohapatra S, Yamanouchi J, Lee JA, et al. Ubiquitous antigen-specific T regulatory type 1 cells variably suppress hepatic and extrahepatic autoimmunity. *J Clin Invest* 2020;130:1823–9. <https://doi.org/10.1172/JCI130670>.
- [141] Sahebjam F, Vierling JM. Autoimmune hepatitis. *Front Med* 2015;9:187–219. <https://doi.org/10.1007/s11684-015-0386-y>.
- [142] Sucher E, Sucher R, Gradistanac T, Brandacher G, Schneeberger S, Berg T. Autoimmune Hepatitis-Immunologically Triggered Liver Pathogenesis-Diagnostic and Therapeutic Strategies. *J Immunol Res* 2019;2019:9437043. <https://doi.org/10.1155/2019/9437043>.
- [143] Stiemsma LT, Reynolds LA, Turvey SE, Finlay BB. The hygiene hypothesis: current perspectives and future therapies. *Immunotargets Ther* 2015;4:143–57. <https://doi.org/10.2147/ITT.S61528>.
- [144] Cardon A, Conchon S, Renand A. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2021;37:79–85. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000704>.
- [145] Hennes EM, Zeniya M, Czaja AJ, Parés A, Dalekos GN, Krawitt EL, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2008;48:169–76. <https://doi.org/10.1002/hep.22322>.
- [146] Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51:2193–213. <https://doi.org/10.1002/hep.23584>.
- [147] Marcén R. Immunosuppressive Drugs in Kidney Transplantation. *Drugs* 2009;69:2227–43. <https://doi.org/10.2165/11319260-000000000-00000>.
- [148] Francque S, Vonghia L, Ramon A, Michielsen P. Epidemiology and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatic Med Evid Res* 2012;4:1–10. <https://doi.org/10.2147/HMER.S16321>.
- [149] Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2010;34:7–14. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.08.010>.
- [150] Eskandari-Nasab E, Tahmasebi A, Hashemi M. Meta-analysis: the relationship between CTLA-4 +49 A/G polymorphism and primary biliary cirrhosis and type I autoimmune hepatitis. *Immunol Invest* 2015;44:331–48. <https://doi.org/10.3109/08820139.2014.1003651>.

- [151]Qin B, Li J, Liang Y, Yang Z, Zhong R. The association between Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, Fas, tumour necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphisms and autoimmune hepatitis: a meta-analysis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2014;46:541–8. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2014.02.003>.
- [152]Tang J, Zhou C, Zhang Z-J, Zheng S-S. Association of polymorphisms in non-classic MHC genes with susceptibility to autoimmune hepatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int HBPD INT* 2012;11:125–31. [https://doi.org/10.1016/s1499-3872\(12\)60136-2](https://doi.org/10.1016/s1499-3872(12)60136-2).
- [153]Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009;9:246–58. <https://doi.org/10.1038/nri2527>.
- [154]Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, Manns MP, Krawitt EL, Vierling JM, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primer* 2018;4:18017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.17>.
- [155]Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Cell Mol Immunol* 2022;19:158–76. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00768-8>.
- [156]Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *Eur J Intern Med* 2018;48:35–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.10.006>.
- [157]Stefanini GF, Meliconi R, Miglio F, Mazzetti M, Baraldini M, Facchini A, et al. Lymphocytotoxicity against autologous hepatocytes and membrane-bound IgG in viral and autoimmune chronic active hepatitis. *Liver* 1983;3:36–45. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1983.tb00848.x>.
- [158]Vergani D, Mieli-Vergani G, Mondelli M, Portmann B, Eddleston ALWF. Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver* 1987;7:307–15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0676.1987.tb00361.x>.
- [159]Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, Martinez OM, Krams SM. Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis. *Liver* 2001;21:272–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0676.2001.021004272.x>.
- [160]Renand A, Habes S, Mosnier J-F, Aublé H, Judor J-P, Vince N, et al. Immune Alterations in Patients With Type 1 Autoimmune Hepatitis Persist Upon Standard Immunosuppressive Treatment. *Hepatol Commun* 2018;2:968–81. <https://doi.org/10.1002/hep4.1202>.
- [161]You Z, Li Y, Wang Q, Zhao Z, Li Y, Qian Q, et al. The Clinical Significance of Hepatic CD69+ CD103+ CD8+ Resident-Memory T Cells in Autoimmune Hepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2021;74:847–63. <https://doi.org/10.1002/hep.31739>.
- [162]Lapierre P, Lamarre A. Regulatory T Cells in Autoimmune and Viral Chronic Hepatitis. *J Immunol Res* 2015;2015:479703. <https://doi.org/10.1155/2015/479703>.
- [163]Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, Wilms A, Baumann AK, Schlue J, et al. Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol* 2014;61:1106–14. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.034>.
- [164]Xu B, Broome U, Uzunel M, Nava S, Ge X, Kumagai-Braesch M, et al. Capillarization of hepatic sinusoid by liver endothelial cell-reactive autoantibodies in patients with cirrhosis and chronic hepatitis. *Am J Pathol* 2003;163:1275–89. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63487-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63487-6).
- [165]Łotowska JM, Sobaniec-Łotowska ME, Sobaniec P, Lebensztejn DM. Liver sinusoidal endothelial cells in morphogenesis of pediatric autoimmune hepatitis. Ultrastructural characteristics - a novel report. *Pol J Pathol Off J Pol Soc Pathol* 2018;69:327–34. <https://doi.org/10.5114/pjp.2018.81691>.

- [166]Khedr MA, Adawy NM, Salim TA, Salem ME, Ghazy RM, Elharoun AS, et al. Kupffer Cell Hyaline Globules in Children With Autoimmune Hepatitis. *J Clin Exp Hepatol* 2022;12:20–8. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2021.04.013>.
- [167]Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Daniluk U, Lebensztejn DM. Glassy droplet inclusions within the cytoplasm of Kupffer cells: A novel ultrastructural feature for the diagnosis of pediatric autoimmune hepatitis. *Dig Liver Dis Off J Ital Soc Gastroenterol Ital Assoc Study Liver* 2017;49:929–33. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2017.04.001>.
- [168]Tucker SM, Jonas MM, Perez-Atayde AR. Hyaline droplets in Kupffer cells: a novel diagnostic clue for autoimmune hepatitis. *Am J Surg Pathol* 2015;39:772–8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000395>.
- [169]Lin R, Zhang J, Zhou L, Wang B. Altered function of monocytes/macrophages in patients with autoimmune hepatitis. *Mol Med Rep* 2016;13:3874–80. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.4998>.
- [170]Maia JM de C, Maranhão H de S, Sena LV de, Rocha LRM da, Medeiros IA de, Ramos AM de O. Hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis in children with type 1 autoimmune hepatitis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies before treatment and after clinical remission. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010;22:264–9. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e328326cab6>.
- [171]Brandão DF, Ramalho FS, Martinelli ALC, Zucoloto S, Ramalho LNZ. Relationship between plasma cells and hepatic stellate cells in autoimmune hepatitis. *Pathol Res Pract* 2010;206:800–4. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2010.08.002>.
- [172]Wies I, Brunner S, Henninger J, Herkel J, Kanzler S, Meyer zum Büschenfelde KH, et al. Identification of target antigen for SLA/LP autoantibodies in autoimmune hepatitis. *Lancet Lond Engl* 2000;355:1510–5. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)02166-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(00)02166-8).
- [173]Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, Heinrich E, Hallensleben M, Manns MP, et al. Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2015;62:1524–35. <https://doi.org/10.1002/hep.27983>.
- [174]Mix H, Weiler-Normann C, Thimme R, Ahlenstiel G, Shin E-C, Herkel J, et al. Identification of CD4 T Cell Epitopes in Soluble Liver Antigen / Liver Pancreas Autoantigen in Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:2107–18. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.029>.
- [175]Renand A, Cervera-Marzal I, Gil L, Dong C, Garcia A, Kervagoret E, et al. Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2020;73:1379–90. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.053>.
- [176]Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, et al. Antigen-Reactive T Cell Enrichment for Direct, High-Resolution Analysis of the Human Naive and Memory Th Cell Repertoire. *J Immunol* 2013;190:3967–76. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202221>.
- [177]Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Anti-liver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159:542–7. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)90027-2).
- [178]Lapierre P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Formiminotransferase cyclodeaminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999;116:643–9. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(99\)70186-1](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(99)70186-1).
- [179]Christen U, Hintermann E. Autoantibodies in Autoimmune Hepatitis: Can Epitopes Tell Us about the Etiology of the Disease? *Front Immunol* 2018;9.
- [180]Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, et al. Cytochrome P450D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003;170:1481–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1481>.
- [181]Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP, Quaglia A, Mieli-Vergani G, Ma Y, et al. Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in

- autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007;46:472–84. <https://doi.org/10.1002/hep.21658>.
- [182] Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, Underhill J, Bansal S, Longhi MS, et al. Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 2006;130:868–82. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.12.020>.
- [183] Muratori L, Sztul E, Muratori P, Gao Y, Ripalti A, Ponti C, et al. Distinct epitopes on formiminotransferase cyclodeaminase induce autoimmune liver cytosol antibody type 1. *Hepatology* 2001;34:494–501. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.27179>.
- [184] Lapierre P, Johanet C, Alvarez F. Characterization of the B cell response of patients with anti-liver cytosol autoantibodies in type 2 autoimmune hepatitis. *Eur J Immunol* 2003;33:1869–78. <https://doi.org/10.1002/eji.200323857>.
- [185] Behfarjam F, Nasserri-Moghaddam S, Jadali Z. Enhanced Th17 Responses in Patients with Autoimmune Hepatitis. *Middle East J Dig Dis* 2019;11:98–103. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2018.134>.
- [186] Bovensiepen CS, Schakat M, Sebode M, Zenouzi R, Hartl J, Peiseler M, et al. TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis. *J Immunol* 2019;203:3148–56. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900124>.
- [187] Liang M, Liwen Z, Yun Z, Yanbo D, Jianping C. The Imbalance between Foxp3+Tregs and Th1/Th17/Th22 Cells in Patients with Newly Diagnosed Autoimmune Hepatitis. *J Immunol Res* 2018;2018:e3753081. <https://doi.org/10.1155/2018/3753081>.
- [188] Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, et al. Interleukin-17 Contributes to the Pathogenesis of Autoimmune Hepatitis through Inducing Hepatic Interleukin-6 Expression. *PLOS ONE* 2011;6:e18909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018909>.
- [189] Kimura N, Yamagiwa S, Sugano T, Setsu T, Tominaga K, Kamimura H, et al. Possible involvement of chemokine C-C receptor 7- programmed cell death-1+ follicular helper T-cell subset in the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2018;33:298–306. <https://doi.org/10.1111/jgh.13844>.
- [190] Liang M, Liwen Z, Juan D, Yun Z, Yanbo D, Jianping C. Dysregulated TFR and TFH cells correlate with B-cell differentiation and antibody production in autoimmune hepatitis. *J Cell Mol Med* 2020;24:3948–57. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14997>.
- [191] Ma L, Qin J, Ji H, Zhao P, Jiang Y. Tfh and plasma cells are correlated with hypergammaglobulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2014;34:405–15. <https://doi.org/10.1111/liv.12245>.
- [192] Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 2017;542:110–4. <https://doi.org/10.1038/nature20810>.
- [193] Caielli S, Veiga DT, Balasubramanian P, Athale S, Domic B, Murat E, et al. A CD4+ T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med* 2019;25:75–81. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0254-9>.
- [194] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 2019;20:928–42. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0378-1>.
- [195] Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* 2019;4:130062. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130062>.
- [196] Marks KE, Rao DA. T peripheral helper cells in autoimmune diseases. *Immunol Rev* 2022;307:191–202. <https://doi.org/10.1111/imr.13069>.

- [197]Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* 2019;50:302–16. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.020>.
- [198]Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004;41:31–7. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.03.008>.
- [199]Grant CR, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatol Baltim Md* 2014;59:1007–15. <https://doi.org/10.1002/hep.26583>.
- [200]Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2006;176:4484–91. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4484>.
- [201]Liberal R, Grant CR, Holder BS, Cardone J, Martinez-Llordella M, Ma Y, et al. In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatol Baltim Md* 2015;62:863–75. <https://doi.org/10.1002/hep.27884>.
- [202]Oo YH, Ackrill S, Cole R, Jenkins L, Anderson P, Jeffery HC, et al. Liver homing of clinical grade Tregs after therapeutic infusion in patients with autoimmune hepatitis. *JHEP Rep Innov Hepatol* 2019;1:286–96. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2019.08.001>.
- [203]Peiseler M, Sebode M, Franke B, Wortmann F, Schwinge D, Quaas A, et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012;57:125–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.02.029>.
- [204]Ferri S, Longhi MS, De Molo C, Lalanne C, Muratori P, Granito A, et al. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;52:999–1007. <https://doi.org/10.1002/hep.23792>.
- [205]Diestelhorst J, Junge N, Schlue J, Falk CS, Manns MP, Baumann U, et al. Pediatric autoimmune hepatitis shows a disproportionate decline of regulatory T cells in the liver and of IL-2 in the blood of patients undergoing therapy. *PloS One* 2017;12:e0181107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181107>.
- [206]Yachida M, Kurokohchi K, Arima K, Nishioka M. Increased bcl-2 expression in lymphocytes and its association with hepatocellular damage in patients with autoimmune hepatitis. *Clin Exp Immunol* 1999;116:140–5. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00861.x>.
- [207]Liberal R, Grant CR, Holder BS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway. *Hepatol Baltim Md* 2012;56:677–86. <https://doi.org/10.1002/hep.25682>.
- [208]Longhi MS, Liberal R, Holder B, Robson SC, Ma Y, Mieli-Vergani G, et al. Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25<sup>+</sup> cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2012;142:1526-1535.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.02.041>.
- [209]Liberal R, Grant CR, Yuksel M, Graham J, Kalbasi A, Ma Y, et al. Regulatory T-cell conditioning endows activated effector T cells with suppressor function in autoimmune hepatitis/autoimmune sclerosing cholangitis. *Hepatol Baltim Md* 2017;66:1570–84. <https://doi.org/10.1002/hep.29307>.
- [210]Vuerich M, Harshe R, Frank LA, Mukherjee S, Gromova B, Csizmadia E, et al. Altered aryl-hydrocarbon-receptor signalling affects regulatory and effector cell immunity in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2021;74:48–57. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.06.044>.
- [211]Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196–203. <https://doi.org/10.1172/JCI115836>.

- [212]Tiegs G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastro-Enterol Belg* 1997;60:176–9.
- [213]Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190–8. [https://doi.org/10.1016/0270-9139\(95\)90428-x](https://doi.org/10.1016/0270-9139(95)90428-x).
- [214]Knolle PA, Gerken G, Loser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, et al. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1996;24:824–9. <https://doi.org/10.1002/hep.510240413>.
- [215]March S, Garcia-Pagán J-C, Massaguer A, Pizcueta P, Panés J, Engel P, et al. P-selectin mediates leukocyte rolling in concanavalin-A-induced hepatitis. *Liver Int Off J Int Assoc Study Liver* 2005;25:1053–60. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2005.01137.x>.
- [216]Massaguer A, Perez-Del-Pulgar S, Engel P, Serratos J, Bosch J, Pizcueta P. Concanavalin-A-induced liver injury is severely impaired in mice deficient in P-selectin. *J Leukoc Biol* 2002;72:262–70.
- [217]Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, et al. TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol Baltim Md* 1950 2001;166:1300–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1300>.
- [218]Ajuebor MN, Hogaboam CM, Le T, Proudfoot AEI, Swain MG. CCL3/MIP-1alpha is pro-inflammatory in murine T cell-mediated hepatitis by recruiting CCR1-expressing CD4(+) T cells to the liver. *Eur J Immunol* 2004;34:2907–18. <https://doi.org/10.1002/eji.200425071>.
- [219]Okamoto S, Yokohama S, Yoneda M, Haneda M, Nakamura K. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  plays a crucial role in concanavalin A-induced liver injury through induction of proinflammatory cytokines in mice. *Hepatology* 2005;32:38–45. <https://doi.org/10.1016/j.hepres.2005.03.002>.
- [220]Küsters S, Gantner F, Künstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* 1996;111:462–71. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v111.pm8690213>.
- [221]Nicoletti F, Di Marco R, Zacccone P, Salvaggio A, Magro G, Bendtzen K, et al. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. *Hepatology* 2000;32:728–33. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.17701>.
- [222]Wang J, Cao X, Zhao J, Zhao H, Wei J, Li Q, et al. Critical roles of conventional dendritic cells in promoting T cell-dependent hepatitis through regulating natural killer T cells. *Clin Exp Immunol* 2017;188:127–37. <https://doi.org/10.1111/cei.12907>.
- [223]Toyabe S, Seki S, Iai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, et al. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol Baltim Md* 1950 1997;159:1537–42.
- [224]Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol* 2012;90:421–8. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.59>.
- [225]Wu H, Tang S, Zhou M, Xue J, Yu Z, Zhu J. Tim-3 suppresses autoimmune hepatitis via the p38/MKP-1 pathway in Th17 cells. *FEBS Open Bio* 2021;11:1406–16. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13148>.
- [226]Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27:647–59. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.023>.
- [227]Wei H-X, Chuang Y-H, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol Baltim Md* 1950 2008;181:7221–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7221>.

- [228] Ju Y, Shang X, Liu Z, Zhang J, Li Y, Shen Y, et al. The Tim-3/galectin-9 pathway involves in the homeostasis of hepatic Tregs in a mouse model of concanavalin A-induced hepatitis. *Mol Immunol* 2014;58:85–91. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.11.001>.
- [229] Lv K, Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q. Galectin-9 Ameliorates Con A-Induced Hepatitis by Inducing CD4+CD25low/int Effector T-Cell Apoptosis and Increasing Regulatory T Cell Number. *PLOS ONE* 2012;7:e48379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048379>.
- [230] Kido M, Watanabe N, Okazaki T, Akamatsu T, Tanaka J, Saga K, et al. Fatal autoimmune hepatitis induced by concurrent loss of naturally arising regulatory T cells and PD-1-mediated signaling. *Gastroenterology* 2008;135:1333–43. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.06.042>.
- [231] Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, et al. IFN- $\gamma$  is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity* 2012;45:186–98. <https://doi.org/10.3109/08916934.2011.616559>.
- [232] Turner SJ, Olivas E, Gutierrez A, Diaz G, Doherty PC. Disregulated influenza A virus-specific CD8+ T cell homeostasis in the absence of IFN-gamma signaling. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;178:7616–22. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7616>.
- [233] Tewari K, Nakayama Y, Suresh M. Role of direct effects of IFN-gamma on T cells in the regulation of CD8 T cell homeostasis. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007;179:2115–25. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.4.2115>.
- [234] Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Tanaka J, et al. Dysregulated generation of follicular helper T cells in the spleen triggers fatal autoimmune hepatitis in mice. *Gastroenterology* 2011;140:1322-1333.e1-5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.002>.
- [235] Iwamoto S, Kido M, Aoki N, Nishiura H, Maruoka R, Ikeda A, et al. TNF- $\alpha$  is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression. *Clin Immunol Orlando Fla* 2013;146:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.10.008>.
- [236] Mukherjee SK, Wilhelm A, Antoniadou CG. TAM receptor tyrosine kinase function and the immunopathology of liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;310:G899-905. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00382.2015>.
- [237] Qi N, Liu P, Zhang Y, Wu H, Chen Y, Han D. Development of a spontaneous liver disease resembling autoimmune hepatitis in mice lacking tyro3, axl and mer receptor tyrosine kinases. *PloS One* 2013;8:e66604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066604>.
- [238] Derkow K, Loddenkemper C, Mintern J, Kruse N, Klugewitz K, Berg T, et al. Differential priming of CD8 and CD4 T-cells in animal models of autoimmune hepatitis and cholangitis. *Hepatology Baltim Md* 2007;46:1155–65. <https://doi.org/10.1002/hep.21796>.
- [239] An Haack I, Derkow K, Riehn M, Rentinck M-N, Kühl AA, Lehnardt S, et al. The Role of Regulatory CD4 T Cells in Maintaining Tolerance in a Mouse Model of Autoimmune Hepatitis. *PloS One* 2015;10:e0143715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143715>.
- [240] Buxbaum J, Qian P, Allen PM, Peters MG. Hepatitis resulting from liver-specific expression and recognition of self-antigen. *J Autoimmun* 2008;31:208–15. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2008.04.015>.
- [241] Zierden M, Kühnen E, Odenthal M, Dienes H-P. Effects and Regulation of Autoreactive CD8+ T Cells in a Transgenic Mouse Model of Autoimmune Hepatitis. *Gastroenterology* 2010;139:975-986.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.05.075>.
- [242] Dywicky J, Noyan F, Misslitz AC, Hapke M, Galla M, Schlue J, et al. Hepatic T Cell Tolerance Induction in An Inflammatory Environment. *Dig Dis Basel Switz* 2018;36:156–66. <https://doi.org/10.1159/000481341>.

- [243] Chu VT, Weber T, Graf R, Sommermann T, Petsch K, Sack U, et al. Efficient generation of Rosa26 knock-in mice using CRISPR/Cas9 in C57BL/6 zygotes. *BMC Biotechnol* 2016;16:4. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0234-4>.
- [244] Casola S. Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2010;667:145–63. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-811-9\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-811-9_10).
- [245] Hardtke-Wolenski M, Fischer K, Noyan F, Schlue J, Falk CS, Stahlhut M, et al. Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatology* 2013;58:718–28. <https://doi.org/10.1002/hep.26380>.
- [246] Holdener M, Hintermann E, Bayer M, Rhode A, Rodrigo E, Hintereder G, et al. Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med* 2008;205:1409–22. <https://doi.org/10.1084/jem.20071859>.
- [247] Ehser J, Holdener M, Christen S, Bayer M, Pfeilschifter JM, Hintermann E, et al. Molecular mimicry rather than identity breaks T-cell tolerance in the CYP2D6 mouse model for human autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013;42:39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.11.001>.
- [248] Lapierre P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: Xenoimmunization with human antigens. *Hepatology* 2004;39:1066–74. <https://doi.org/10.1002/hep.20109>.
- [249] Scott-Taylor TH, Axinia S-C, Amin S, Pettengell R. Immunoglobulin G; structure and functional implications of different subclass modifications in initiation and resolution of allergy. *Immun Inflamm Dis* 2018;6:13–33. <https://doi.org/10.1002/iid3.192>.
- [250] Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 2005;23:447–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115643>.
- [251] Aubin A-M, Lombard-Vadnais F, Collin R, Aliesky HA, McLachlan SM, Lesage S. The NOD Mouse Beyond Autoimmune Diabetes. *Front Immunol* 2022;13.
- [252] Mo R, Feng X-X, Wu Y-N, Wang H, He Y-P, Sun H-H, et al. Hepatocytes paradoxically affect intrahepatic IFN- $\gamma$  production in autoimmune hepatitis due to Gal-9 expression and TLR2/4 ligand release. *Mol Immunol* 2020;123:106–15. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.05.014>.
- [253] Chi G, Feng X-X, Ru Y-X, Xiong T, Gao Y, Wang H, et al. TLR2/4 ligand-amplified liver inflammation promotes initiation of autoimmune hepatitis due to sustained IL-6/IL-12/IL-4/IL-25 expression. *Mol Immunol* 2018;99:171–81. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.05.005>.
- [254] Liu Q, Muruve DA. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther* 2003;10:935–40. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302036>.
- [255] Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* 2004;10:616–29. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>.
- [256] Mendonça SA, Lorincz R, Boucher P, Curiel DT. Adenoviral vector vaccine platforms in the SARS-CoV-2 pandemic. *NPJ Vaccines* 2021;6:97. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00356-x>.
- [257] Gebre MS, Brito LA, Tostanoski LH, Edwards DK, Carfi A, Barouch DH. Novel approaches for vaccine development. *Cell* 2021;184:1589–603. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.030>.
- [258] Nakayama T. An inflammatory response is essential for the development of adaptive immunity-immunogenicity and immunotoxicity. *Vaccine* 2016;34:5815–8. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.051>.
- [259] Manibur Rahman T, Hodgson. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81:145–57. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2000.00144.x>.

- [260] Barbier L, Tay SS, McGuffog C, Triccas JA, McCaughan GW, Bowen DG, et al. Two lymph nodes draining the mouse liver are the preferential site of DC migration and T cell activation. *J Hepatol* 2012;57:352–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.03.023>.
- [261] Bartolo L, Li Chung Tong S, Chappert P, Urbain D, Collaud F, Colella P, et al. Dual muscle-liver transduction imposes immune tolerance for muscle transgene engraftment despite preexisting immunity. *JCI Insight* 2019;4:127008. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.127008>.
- [262] Poupiot J, Costa Verdera H, Hardet R, Colella P, Collaud F, Bartolo L, et al. Role of Regulatory T Cell and Effector T Cell Exhaustion in Liver-Mediated Transgene Tolerance in Muscle. *Mol Ther - Methods Clin Dev* 2019;15:83–100. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.08.012>.
- [263] Billeskov R, Wang Y, Solaymani-Mohammadi S, Frey B, Kulkarni S, Andersen P, et al. Low Antigen Dose in Adjuvant-Based Vaccination Selectively Induces CD4 T Cells with Enhanced Functional Avidity and Protective Efficacy. *J Immunol Baltim Md 1950* 2017;198:3494–506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600965>.
- [264] Collins KA, Brod F, Snaith R, Ulaszewska M, Longley RJ, Salman AM, et al. Ultra-low dose immunization and multi-component vaccination strategies enhance protection against malaria in mice. *Sci Rep* 2021;11:10792. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90290-8>.
- [265] Oling V, Geubtner K, Ilonen J, Reijonen H. A low antigen dose selectively promotes expansion of high-avidity autoreactive T cells with distinct phenotypic characteristics: a study of human autoreactive CD4+T cells specific for GAD65. *Autoimmunity* 2010;43:573–82. <https://doi.org/10.3109/08916930903540424>.
- [266] Ploquin MJ-Y, Eksmond U, Kassiotis G. B cells and TCR avidity determine distinct functions of CD4+ T cells in retroviral infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 2011;187:3321–30. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101006>.
- [267] Roncarolo MG, Gregori S, Bacchetta R, Battaglia M, Gagliani N. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity* 2018;49:1004–19. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.001>.
- [268] Castro-Dopico T, Clatworthy MR. IgG and Fcγ Receptors in Intestinal Immunity and Inflammation. *Front Immunol* 2019;10.
- [269] Hazenbos WL, Heijnen IA, Meyer D, Hofhuis FM, Renardel de Lavalette CR, Schmidt RE, et al. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol Baltim Md 1950* 1998;161:3026–32.
- [270] Nimmerjahn F, Lux A, Albert H, Woigk M, Lehmann C, Dudziak D, et al. FcγRIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:19396–401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1014515107>.
- [271] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood* 2012;119:5640–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-380121>.
- [272] Kaufman DR, Liu J, Carville A, Mansfield KG, Havenga MJE, Goudsmit J, et al. Trafficking of antigen-specific CD8+ T lymphocytes to mucosal surfaces following intramuscular vaccination. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;181:4188–98. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4188>.
- [273] Lang Kuhs KA, Toporovski R, Ginsberg AA, Olsen AL, Shedlock DJ, Morrow MP, et al. Peripheral immunization induces functional intrahepatic hepatitis C specific immunity following selective retention of vaccine-specific CD8 T cells by the liver. *Hum Vaccin* 2011;7:1326–35. <https://doi.org/10.4161/hv.7.12.18279>.
- [274] Silveira-Mattos PS, Narendran G, Akrami K, Fukutani KF, Anbalagan S, Nayak K, et al. Differential expression of CXCR3 and CCR6 on CD4+ T-lymphocytes with distinct memory phenotypes characterizes tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *Sci Rep* 2019;9:1502. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37846-3>.

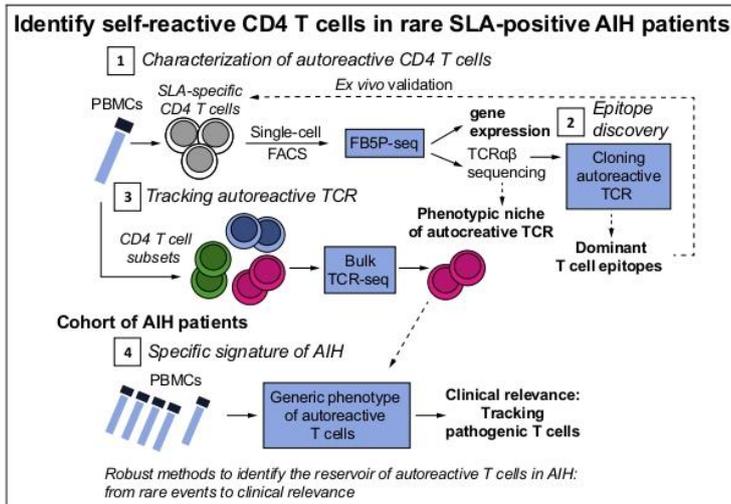
- [275]Mandai Y, Takahashi D, Hase K, Obata Y, Furusawa Y, Ebisawa M, et al. Distinct Roles for CXCR6(+) and CXCR6(-) CD4(+) T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. *PLoS One* 2013;8:e65488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065488>.
- [276]Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB Agonists: Multi-Potent Potentiators of Tumor Immunity. *Front Oncol* 2015;5.
- [277]Tian J, Zhang B, Rui K, Wang S. The Role of GITR/GITRL Interaction in Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2020;11.
- [278]Croft M, So T, Duan W, Soroosh P. The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease. *Immunol Rev* 2009;229:173–91. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x>.
- [279]Zhang X, Xiao X, Lan P, Li J, Dou Y, Chen W, et al. OX40 Costimulation Inhibits Foxp3 Expression and Treg Induction via BATF3-Dependent and Independent Mechanisms. *Cell Rep* 2018;24:607–18. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.052>.
- [280]Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 2001;15:445–55. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00191-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00191-1).
- [281]Wang A, Patterson S, Marwaha A, Tan R, Levings M. CCL3 and CCL4 secretion by T regulatory cells attracts CD4+ and CD8+ T cells (P1077). *J Immunol* 2013;190:121.10-121.10.
- [282]Castellino F, Huang AY, Altan-Bonnet G, Stoll S, Scheinecker C, Germain RN. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell–dendritic cell interaction. *Nature* 2006;440:890–5. <https://doi.org/10.1038/nature04651>.
- [283]Aldinucci D, Colombatti A. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators Inflamm* 2014;2014:e292376. <https://doi.org/10.1155/2014/292376>.
- [284]Shadidi KR, Aarvak T, Henriksen JE, Natvig JB, Thompson KM. The chemokines CCL5, CCL2 and CXCL12 play significant roles in the migration of Th1 cells into rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol* 2003;57:192–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2003.01214.x>.
- [285]Hu J-Y, Zhang J, Cui J-L, Liang X-Y, Lu R, Du G-F, et al. Increasing CCL5/CCR5 on CD4+ T cells in peripheral blood of oral lichen planus. *Cytokine* 2013;62:141–5. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.01.020>.
- [286]Bakos E, Thaiss CA, Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, et al. CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol* 2017;198:4659–71. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601458>.
- [287]Chu HX, Arumugam TV, Gelderblom M, Magnus T, Drummond GR, Sobey CG. Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014;34:1425–9. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.120>.
- [288]Huang H, Wang S, Jiang T, Fan R, Zhang Z, Mu J, et al. High levels of circulating GM-CSF+CD4+ T cells are predictive of poor outcomes in sepsis patients: a prospective cohort study. *Cell Mol Immunol* 2019;16:602–10. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0164-2>.
- [289]Loffi N, Thome R, Rezaei N, Zhang G-X, Rezaei A, Rostami A, et al. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front Immunol* 2019;10.
- [290]Schreiner D, King CG. CD4+ Memory T Cells at Home in the Tissue: Mechanisms for Health and Disease. *Front Immunol* 2018;9.
- [291]Ng SS, De Labastida Rivera F, Yan J, Corvino D, Das I, Zhang P, et al. The NK cell granule protein NKG7 regulates cytotoxic granule exocytosis and inflammation. *Nat Immunol* 2020;21:1205–18. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0758-6>.
- [292]Chauvin J-M, Zarour HM. TIGIT in cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* 2020;8:e000957. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000957>.

- [293] Barsheshet Y, Wildbaum G, Levy E, Vitenshtein A, Akinseye C, Griggs J, et al. CCR8+FOXP3+ Treg cells as master drivers of immune regulation. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114:6086–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.1621280114>.
- [294] Kuehnemuth B, Piseddu I, Wiedemann GM, Lauseker M, Kuhn C, Hofmann S, et al. CCL1 is a major regulatory T cell attracting factor in human breast cancer. *BMC Cancer* 2018;18:1278. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5117-8>.
- [295] Cullen SP, Martin SJ. Caspase activation pathways: some recent progress. *Cell Death Differ* 2009;16:935–8. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.59>.
- [296] Fu S-H, Yeh L-T, Chu C-C, Yen BL-J, Sytwu H-K. New insights into Blimp-1 in T lymphocytes: a divergent regulator of cell destiny and effector function. *J Biomed Sci* 2017;24:49. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0354-8>.
- [297] Martins G, Calame K. Regulation and functions of Blimp-1 in T and B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2008;26:133–69. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090241>.
- [298] King CG, Kobayashi T, Cejas PJ, Kim T, Yoon K, Kim GK, et al. TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nat Med* 2006;12:1088–92. <https://doi.org/10.1038/nm1449>.
- [299] Muto G, Kotani H, Kondo T, Morita R, Tsuruta S, Kobayashi T, et al. TRAF6 Is Essential for Maintenance of Regulatory T Cells That Suppress Th2 Type Autoimmunity. *PLOS ONE* 2013;8:e74639. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074639>.
- [300] Tai X, Van Laethem F, Pobezinsky L, Guintert T, Sharrow SO, Adams A, et al. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4+ T cells. *Blood* 2012;119:5155–63. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-388918>.
- [301] Pot C. Aryl hydrocarbon receptor controls regulatory CD4+ T cell function. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13592. <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13592>.
- [302] Guittard G, Dios-Esponera A, Palmer DC, Akpan I, Barr VA, Manna A, et al. The Cish SH2 domain is essential for PLC- $\gamma$ 1 regulation in TCR stimulated CD8+ T cells. *Sci Rep* 2018;8:5336. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23549-2>.
- [303] Yoshimura A, Ito M, Chikuma S, Akanuma T, Nakatsukasa H. Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018;10:a028571. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028571>.
- [304] Zhai Y, Moosavi R, Chen M. Immune Checkpoints, a Novel Class of Therapeutic Targets for Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 2021;12.

# **ANNEXES**

# Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune hepatitis

## Graphical abstract



## Authors

Amédée Renand, Iñaki Cervera-Marzal, Laurine Gil, ..., Jérôme Gournay, Pierre Milpied, Sophie Conchon

## Correspondence

[sophie.conchon@univ-nantes.fr](mailto:sophie.conchon@univ-nantes.fr) (S. Conchon).

## Lay summary

One principal characteristic of the autoimmune hepatitis (AIH), like for many other autoimmune diseases, is the accumulation of autoantibodies produced by B lymphocytes following their interaction with autoreactive CD4 T lymphocytes. In this study, we identified and characterised with high resolution these CD4 T cells. This will be essential to track, delineate, and potentially target them during AIH.

## Highlights

- Soluble liver antigen (SLA)-specific CD4 T cells have a pro-inflammatory/B-helper profile (*IL21*, *IFNG*, and *TIGIT*).
- SLA<sub>81-100</sub> and SLA<sub>177-204</sub> contain dominant T-cell epitopes.
- Autoreactive T-cell receptor clonotypes are restricted to the memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells.
- PD-1 and CD38 co-expression by T cells reflects disease activity.
- This work will be essential to track, delineate, and target pathogenic T cells in AIH.



## Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune hepatitis

Amédée Renand<sup>1</sup>, Iñaki Cervera-Marzal<sup>2,†</sup>, Laurine Gil<sup>2,†</sup>, Chuang Dong<sup>2,†</sup>, Alexandra Garcia<sup>1</sup>, Erwan Kervagoret<sup>1</sup>, Hélène Aublé<sup>3</sup>, Sarah Habes<sup>4</sup>, Caroline Chevalier<sup>3</sup>, Fabienne Vavasseur<sup>3</sup>, Béatrice Clémenceau<sup>5</sup>, Anaïs Cardon<sup>1</sup>, Jean-Paul Judor<sup>1</sup>, Jean-François Mosnier<sup>1,6</sup>, Florence Tanné<sup>7</sup>, David-Axel Laplaud<sup>1,8</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup>, Jérôme Gournay<sup>4,9</sup>, Pierre Milpied<sup>2,‡</sup>, Sophie Conchon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, Nantes, France; <sup>2</sup>Aix Marseille Université, CNRS, Inserm, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, CIML, Marseille, France; <sup>3</sup>Centre d'Investigation Clinique gastro-nutrition, CHU Nantes, Nantes, France; <sup>4</sup>Service Hepato-gastro-entérologie et Assistance Nutritionnelle, CHU Nantes, Nantes, France; <sup>5</sup>Université de Nantes, CHU Nantes, Inserm, CRCINA, Nantes, France; <sup>6</sup>Service Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Nantes, Nantes, France; <sup>7</sup>Service d'hépatologie gastroentérologie, CHU Cavale Blanche, Brest, France; <sup>8</sup>Service de Neurologie et CIC 1413, CHU Nantes, Nantes, France; <sup>9</sup>Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, IMAD, CHU Nantes, Nantes, France

**Background & Aims:** In most autoimmune disorders, crosstalk of B cells and CD4 T cells results in the accumulation of autoantibodies. In autoimmune hepatitis (AIH), the presence of anti-soluble liver antigen (SLA) autoantibodies is associated with reduced overall survival, but the associated autoreactive CD4 T cells have not yet been characterised. Herein, we isolated and deeply characterised SLA-specific CD4 T cells in patients with AIH. **Methods:** We used brief *ex vivo* restimulation with overlapping SLA peptides to isolate and phenotype circulating SLA-specific CD4 T cells, and integrative single-cell RNA-seq (scrRNA-seq) to characterise their transcriptome and T-cell receptor (TCR) repertoire. Autoreactive TCRs were cloned and used to identify dominant SLA-derived epitopes. SLA-specific CD4 T cells were tracked in peripheral blood through TCR sequencing to identify their phenotypic niche. We further characterised disease-associated peripheral blood T cells by high-content flow cytometry in 42 patients with AIH and 17 controls with non-alcoholic steatohepatitis.

**Results:** Autoreactive SLA-specific CD4 T cells were only detected in patients with anti-SLA autoantibodies and had a memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> phenotype. ScrRNA-seq revealed their pro-inflammatory/B-helper profile. SLA<sub>81-100</sub> and SLA<sub>177-204</sub> contain dominant T-cell epitopes. Autoreactive TCR clonotypes were predominantly found in the memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4 T cells, which were significantly increased in the blood of patients with AIH and supported B-cell differentiation through IL-21. Finally, we identified specific T-cell phenotypes linked to disease activity and IgG level during AIH.

**Conclusions:** We provide a deep characterisation of rare circulating autoreactive CD4 T cells and identify their peripheral

reservoir in AIH. We also propose a specific phenotype of autoreactive T cells related to AIH disease activity, which will be essential to track, delineate, and potentially target these pathogenic cells.

**Lay summary:** One principal characteristic of autoimmune hepatitis (AIH), like for many other autoimmune diseases, is the accumulation of autoantibodies produced by B lymphocytes following their interaction with autoreactive CD4 T lymphocytes. In this study, we identified and characterised with high resolution these CD4 T cells. This will be essential to track, delineate, and potentially target them during AIH.

© 2020 European Association for the Study of the Liver. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### Introduction

The main feature of autoimmune disorders is an abnormal reactivity of the adaptive immune system against self-antigens. The detection of the resulting self-reactive autoantibodies is one of the main criteria for the diagnosis of autoimmune diseases. Antibody production results from a crosstalk between cognate antigen-specific B cells and CD4 T cells in response to a specific antigen. The CD4 T follicular helper (TFH) cell population, characterised by the expression of the chemokine receptor CXCR5 and the activation marker programmed cell death 1 (PD-1), has been identified as the main subset of CD4 T cells responsible for B-cell help in antibody responses through a cognate interaction and the production of the cytokine IL-21.<sup>1,2</sup> However, the implication of TFH cells in human autoimmune activation is not yet well characterised, and whether those cells carry self-antigen-reactive T-cell receptors (TCRs) has not been studied in many human autoimmune diseases.<sup>3-5</sup>

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare disease with an incidence range from 1 to 2 per 100,000 individuals in Europe. Like other autoimmune liver diseases, AIH is characterised by an immune attack targeting the liver, a hypergammaglobulinaemia, and the accumulation of autoantibodies. The presence of some specific autoantibodies (e.g. anti-soluble liver antigen [anti-SLA],

Keywords: Autoimmune hepatitis; Autoreactive CD4 T cells; Single-cell RNA-seq; Soluble liver antigen; Autoreactive TCR clonotypes.

Received 20 December 2019; received in revised form 25 May 2020; accepted 27 May 2020; available online 8 July 2020

\* Corresponding author. Address: CRTI Inserm UMR1064, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France. Tel.: +33 2400 87507, fax: +33 2400 87411.

E-mail address: [sophie.conchon@univ-nantes.fr](mailto:sophie.conchon@univ-nantes.fr) (S. Conchon).

<sup>†</sup> Equal contribution.

<sup>‡</sup> Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.053>



ELSEVIER

anti-liver/kidney microsomal type 1, and anti-liver cytosol type 1 autoantibodies), which are relevant for diagnosis, and a genetic predisposition linked to HLA class II alleles<sup>6</sup> suggests a predominant role of CD4 T-cell subsets in driving autoantibody accumulation and disease progression. Indeed, in AIH, CD4 T cells infiltrate the liver;<sup>7</sup> yet, it is still debated whether those autoreactive CD4 T cells are related to TH17 cells,<sup>8,9</sup> TFH cells,<sup>4</sup> or tumour necrosis factor (TNF)-producing cells.<sup>10</sup> In fact, the molecular signature of self-antigen-specific CD4 T cells in AIH has remained elusive because of the difficulty to track such rare cells,<sup>10,11</sup> like in other autoimmune liver diseases and many autoimmune disorders.

Recent studies have identified B-helper PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell populations, named T peripheral helper (TPH) or TH10 cells, which support antibody accumulation in rheumatoid arthritis (RA) through IL-21, or in systemic lupus erythematosus (SLE) through IL-10 production.<sup>12–15</sup> However, although phenotypes are similar, the transcriptomic signatures of identified pathogenic PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells are different in RA<sup>12</sup> and in systemic lupus erythematosus,<sup>13</sup> and not known in AIH. Moreover, it is still unknown whether these pathogenic PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells carry self-antigen-specific TCRs, a defining characteristic of autoreactive T cells.

In AIH, immunosuppressive treatments induce complete remission, but more than 70% of patients relapse when treatment withdrawal is attempted, suggesting a persistence of pathogenic cells, such as autoreactive CD4 T cells.<sup>7,16</sup> We previously observed that patients with AIH under immunosuppressive treatments persist to have immune dysregulation in their blood, and residual CD4 T-cell infiltrate is observed in their liver.<sup>17</sup> Moreover, the presence of anti-SLA (or SepSecs) autoantibodies in the blood of patients with AIH is associated with significantly reduced overall survival.<sup>18</sup> This suggests a link between autoantigen-specific adaptive immunity (autoreactive CD4 T-cell response) and the prognosis of AIH. Thus, there is an urgent clinical need to identify new therapeutic options targeting both the persistence and function of self-reactive T cells in AIH.

Here, we have used *ex vivo* restimulation assays based on the upregulation of CD154 (CD40 ligand) and 5'-end single-cell RNA-seq (scRNA-seq) to define the surface phenotype, gene expression profile, and TCR $\alpha\beta$  repertoire of a total of 546 self-reactive CD4 T cells in 5 distinct patients with AIH with anti-SLA autoantibodies. We report that circulating autoantigen-specific CD4 T cells invariably carry a memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> phenotype and a pro-inflammatory B-helper molecular and functional profile with close similarity with the reported TPH CD4 cell subset. By cloning autoreactive TCRs, we also identify 2 dominant CD4 T-cell epitopes derived from SLA. Our study further identifies a specific T-cell phenotypic signature, CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>, which correlates with disease activity in patients with AIH, and thus could be used to track and/or target pathogenic T cells in AIH.

## Materials and methods

Methods are described in the [Supplementary file](#).

## Results

### Detection of SLA-specific CD4 T cells with a central memory CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> phenotype in the blood of seropositive (anti-SLA+) patients with AIH

To directly identify autoreactive CD4 T cells based on their antigen specificity, we performed an *ex vivo* short stimulation assay

(3 h) on peripheral blood mononuclear cell with a pool of antigen-derived overlapping peptides. Rare antigen-specific CD4 T cells are activated by cognate peptide-major histocompatibility complex-II, leading to the rapid and specific upregulation of the surface activation marker CD154. The magnetic enrichment step significantly increased the detection of CD154<sup>+</sup> antigen-specific CD4 T cells, which can be analysed and sorted by FACS (Fig. S2).<sup>19–21</sup> We analysed CD4 T cells from patients with AIH with (SLA-pos; n = 8) and without (SLA-neg; n = 8) anti-SLA autoantibodies (Tables 1 and S2) for their capacity to respond to overlapping SLA peptides (Table S3). Peptides derived from the *Candida albicans* mannoprotein MP65 (C.Alb) were used as positive control (Fig. 1A and C). Compared with the condition without antigen, CD154<sup>+</sup> SLA-specific CD4 T cells were detected only in SLA-pos patients (Fig. 1A and B). These antigenic responses (SLA and C.Alb) were stable in a longitudinal analysis, supporting the robustness of our restimulation assay (Fig. S3).

The analysis of surface markers related to memory status revealed that both SLA- and C.Alb-specific CD4 T cells exhibited a memory phenotype characterised by low levels of CD45RA, but high levels of CD27 and CD45RO (Fig. 1D and E). Classically, the CD4 T-cell compartment can be divided into 4 subsets, with distinct memory status, based on the expression of CD45RA and CD27.<sup>22</sup> Contrary to the heterogeneous distribution of total CD4 T cells, the vast majority of CD154<sup>+</sup> SLA-specific and CD154<sup>+</sup> C.Alb-specific CD4 T cells exhibited a central memory T-cell profile (Fig. 1F). The frequency of SLA-specific memory CD45RA<sup>-</sup> CD4 T cells was significantly higher in the group of patients with AIH with anti-SLA autoantibodies compared with seronegative patients, whereas C.Alb-specific memory CD45RA<sup>-</sup> CD4 T-cell frequency was similar in both groups, as expected (Fig. 1G).

We further analysed the surface expression of CCR6, a chemokine receptor expressed by TH17 cells;<sup>23</sup> CXCR5, a chemokine receptor expressed by TFH cells;<sup>1</sup> and PD-1, recently described to be expressed by pathogenic CD4 T cells in autoimmune disorders.<sup>12,13,15,24</sup> (Fig. 1H and I). C.Alb-specific CD4 T cells were PD-1<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>, consistent with their expected TH17 phenotype,<sup>21,23,25</sup> whereas autoreactive SLA-specific CD4 T cells were PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>. Neither SLA- nor C.Alb-specific CD4 T cells showed high CXCR5 expression, suggesting they were distinct from circulating TFH cells.

In conclusion, SLA-specific CD4 T cells were detected in the blood of patients with AIH with anti-SLA autoantibodies, and those cells had a central memory CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> phenotype.

### scRNA-seq analysis reveals a TPH profile of autoreactive CD4 T cells

Next, we submitted FACS-sorted *ex vivo* activated CD154<sup>+</sup> C.Alb-specific and SLA-specific memory CD4 T cells from 5 SLA-pos patients with AIH to 5'-end scRNA-seq analysis for parallel analysis of gene expression and TCR $\alpha\beta$  sequence with the FB5P-seq method<sup>26</sup> (Fig. 2A and Tables S2 and S4). Unsupervised analysis of the single-cell gene expression profiles with principal component analysis revealed a clear distinction between the 2 antigen-specific CD154<sup>+</sup> memory T-cell subsets, with SLA- and C.Alb-specific T cells segregating along the first principal component (Fig. 2B, left). In 2-dimensional embeddings of the first 40 principal components with Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP), the distinction between SLA- and C.Alb-specific T cells was evident despite sample-specific batch

**Table 1. Clinical characteristics of patients for SLA-specific CD4 T-cell reactivity tracking (Fig. 1A–C), expressed as mean (range or percentage).**

	SLA-neg AIH	SLA-pos AIH	Adjusted <i>p</i> value
Number (n)	8	8	–
Age (yr)	60 (39–74)	37 (19–72)	n.s.
Female, n (%)	7 (87)	7 (87)	n.s.
Disease duration (yr)	4 (0–10)	11 (0–23)	n.s.
IgG (g/L)	14 (9.07–22.01)	17 (8.27–32.69)	n.s.
AST (IU/L)	343 (23–2,527)	98 (18.5–518.2)	n.s.
ALT (IU/L)	347 (14–2,889)	140 (10–809)	n.s.
Active AIH	3/8	4/8	–

AIH, autoimmune hepatitis; neg, negative; pos, positive; SLA, soluble liver antigen. The Mann-Whitney *U* test and the Bonferroni multiple test correction were used.

effects (Fig. S4A and B). Removal of sample-specific batch effects through bioinformatic integration confirmed the segregation in UMAP embedding (Fig. 2B [right] and S4A and B). A total of 313 genes were differentially expressed between C.Alb- and SLA-specific CD4 T cells (Table S5 and Fig. 2C and D). The molecular profiles of C.Alb- and SLA-specific CD4 T cells were robust and stable in a longitudinal analysis of samples from 1 patient collected at 3 time points over a 6-month period (samples 018-10, 018-13, and 018-14; Fig. 2C).

One advantage of the short restimulation assay is to allow transcriptomic characterisation of the cytokine expression profile of antigen-specific CD4 T cells<sup>19</sup> (Fig. 2D and E). C.Alb-specific CD4 T cells showed typical TH17 cytokine and transcription factor profiles,<sup>25</sup> with high expression of *IL-17A*, *IL-23A*, *CCL20*, *CSF2* (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), *IL-2*, and *TNF*, as well as *FOSL2*, *MYC*, and *EGR2* among other genes (Fig. 2D and E and Table S5). These cells also expressed genes encoding the surface immune markers *CD200*, *ICOS*, *IL-7R* (*CD127*), and *TNFRSF4* (*OX40*). By contrast, restimulated circulating autoreactive SLA-specific CD4 T cells had a distinct B-helper (*IL21*) and pro-inflammatory (*IFNG* and *TNF*) gene signature (Fig. 2D and E and Table S5). This B-helper profile was also conferred by the expression of the transcription factor *MAF* and by the expression of genes encoding surface immune markers, such as *ICOS*, *TIGIT*, *CTLA4*, and *SLAMF6*, which were previously found to be elevated on both TFH and TPH cells.<sup>12,15,27</sup> SLA-specific CD4 T cells did not express *CXCR5* (Fig. 1H) and expressed *IFNG*, suggesting their molecular signature was closer to the reported TPH signature (*CD200*, *IL-21*, *IFNG*, *ICOS*, *TIGIT*, *CTLA4*, *ITM2A*, *SLAMF6*, and *MAF*) than to a TFH signature.<sup>12,14</sup> However, SLA-specific CD4 T cells specifically expressed some additional genes not previously reported in studies of human autoimmune TPH or TFH cells: the transcription factor *NR3C1*, a glucocorticoid receptor involved in immune-regulation processes;<sup>28</sup> *CD109*, involved in the regulation of inflammation;<sup>29</sup> and *CLEC2D* and *KLRB1*, involved in the regulation of the innate immune response.<sup>30</sup>

With the 5'-end scRNA-seq method, we were able to reconstruct paired variable TCR $\alpha$ /TCR $\beta$  sequences *in silico*, and link them to the transcriptome of antigen-specific CD4 T cells. In all patients, SLA- and C.Alb-specific CD4 T cells were polyclonal; yet, we consistently identified some highly frequent TCR $\alpha\beta$  clonotypes indicative of antigen-specific clonal expansions (Fig. 2F and Table S6). We found no evidence for public TCR rearrangements in SLA- and C.Alb-specific CD4 T cells from these 5 patients with AIH (Table S6). T cells from the same TCR $\alpha\beta$  clonotype were

transcriptionally diverse within the overall molecular profile associated with their antigen specificity (Fig. 2G).

#### SLA<sub>81-100</sub> and SLA<sub>177-204</sub> sequences contain dominant T-cell epitopes driving the SLA-specific reactivity of CD4 T cells in AIH

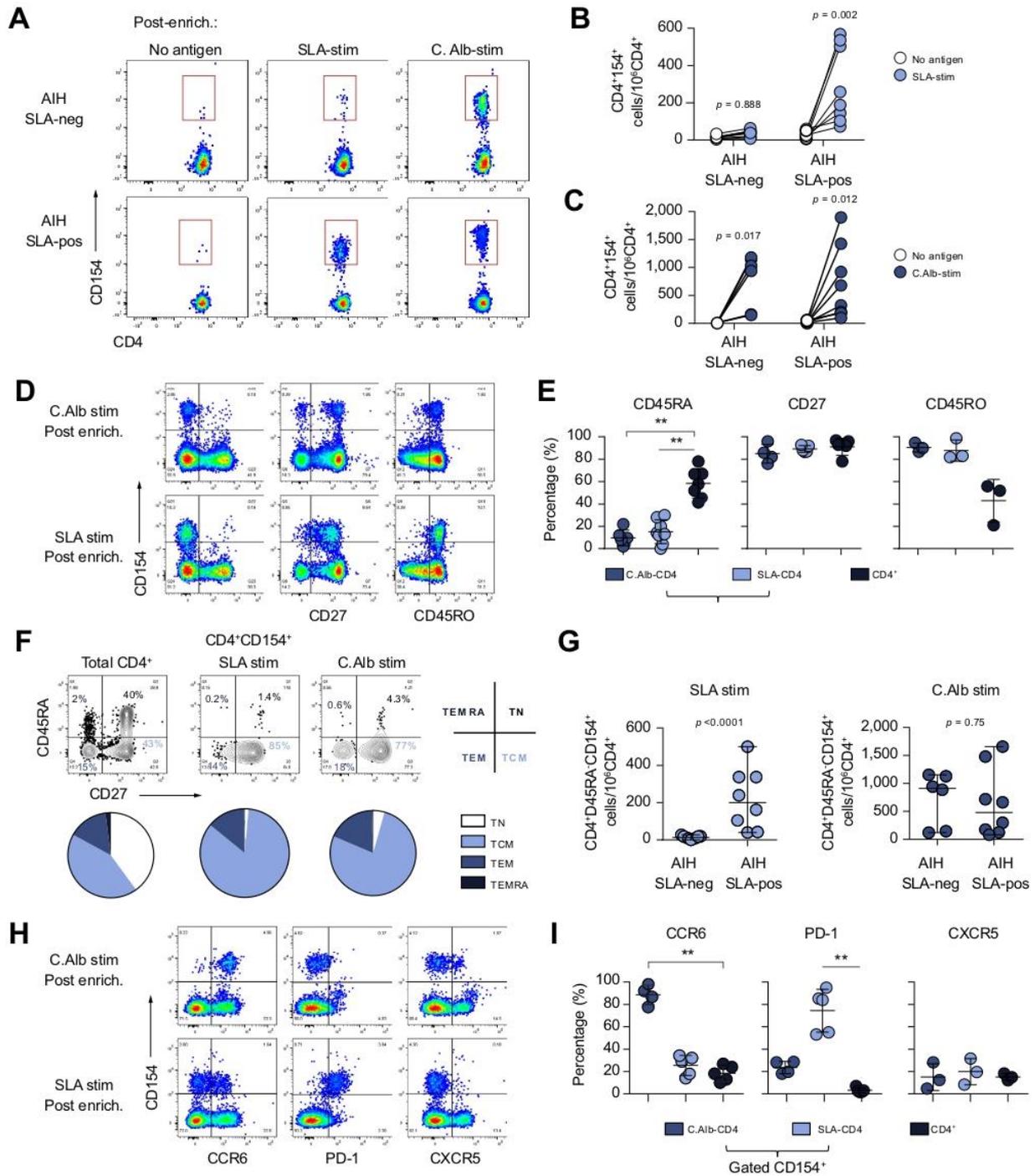
We picked 4 of the top 10 expanded TCR clonotypes of CD154<sup>+</sup> SLA-specific CD4 T cells from patient 018, which cumulatively represented a quarter of total CD154<sup>+</sup> SLA-specific CD4 T cells (Fig. 3A and Table S6), and expressed the corresponding recombinant TCR $\alpha\beta$  in the murine T-cell hybridoma 58<sup>2-B</sup> (Fig. S1).<sup>31,32</sup> The tested TCR cell lines reacted strongly to the SLA peptide pool 2, 3, and/or 5 in the presence of antigen-presenting cells, which were either an autologous immortalised B-cell line (1064) or an HLA-DR-match (HLA-DR3<sup>+/+</sup>) immortalised B-cell line (FEB) (Fig. 3B and Table S1). Peptides from pool 2, 3, and 5 were tested individually, and peptide p23 (SLA<sub>177-196</sub>), p24 (SLA<sub>185-204</sub>), and p11 (SLA<sub>81-100</sub>) were identified as reactive (Fig. 3C). The *ex vivo* peripheral blood mononuclear cell restimulation assay in 3 distinct HLA-DR3<sup>+</sup> SLA-pos patients with SLA peptides p23 and p24, or with p23, p24, and p11, or with all SLA overlapping peptides as a positive control, resulted in similar frequencies of stimulated CD154<sup>+</sup> CD4 T cells (Fig. 3D and E). These results showed that the CD4 T-cell reactivity against SLA targeted dominant T-cell epitopes, shared by several patients, and recognised by multiple TCR $\alpha\beta$  clonotypes.

#### PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population is the main reservoir of autoreactive CD4 T cells in AIH

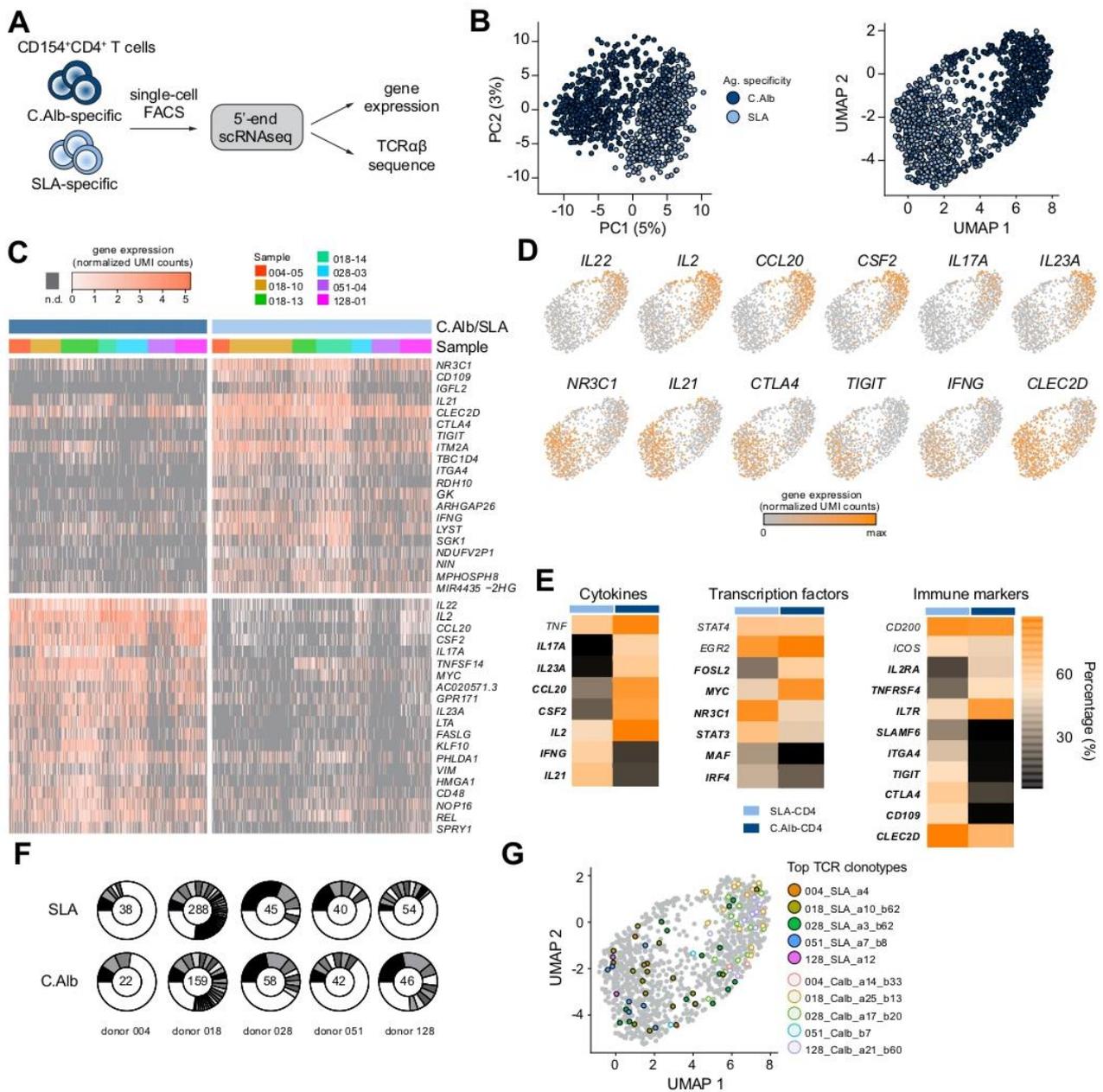
Given the B-helper molecular profile (with TPH similarities) and PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> surface phenotype of *ex vivo* activated SLA-specific CD4 T cells, we set out to identify the phenotypic niche of untouched autoreactive CD4 T cells in the peripheral blood of patients with AIH. We performed bulk TCR $\beta$  sequencing on DNA from sorted memory CD45RA<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> (CXCR5<sup>+</sup>), CD45RA<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> (PD-1<sup>+</sup>), CD45RA<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> (CCR6<sup>+</sup>), and CD45RA<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> (PD-1<sup>-</sup>) CD4 T-cell subsets from 3 SLA-pos patients with AIH (Fig. 4A and Table S2). SLA-specific TCR $\beta$  clonotypes identified in the scRNA-seq data were tracked and found highly enriched in the PD-1<sup>+</sup>CD4 T-cell subset (Fig. 4B and Table S7). In contrast, C.Alb-specific TCR $\beta$  clonotypes were mainly found in the CCR6<sup>+</sup>CD4 T-cell subset (Fig. 4C and Table S7). These results clearly demonstrated that the CD45RA<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD4 T-cell population was the major peripheral reservoir of autoreactive CD4 T cells in AIH, distinct from the classical TFH CD45RA<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4 T-cell population.

#### Memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells with a TPH profile are enriched in the blood of patients with AIH

Given that the PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population was the source of SLA-specific autoreactive CD4 T cells, we tracked this subset in a group of patients with active AIH regardless of anti-SLA antibody serology (n = 27; treated or not; elevated level of transaminase and/or elevated level of serum IgG) (Tables 2 and S2). The proportion of PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> cells amongst the memory CD3 T-cell population was increased in patients with active AIH compared with patients with non-alcoholic steatohepatitis (NASH; n = 17; control group with hepatic inflammation, but with no sign of autoimmunity) (Fig. 5A and B). The PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> TFH population was not significantly increased, and its frequency was low compared



**Fig. 1. Detection of SLA-specific CD4 T cells with a central memory CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> phenotype in the blood of seropositive (anti-SLA<sup>+</sup>) patients with AIH.** (A) Dot plots and (B–C) frequencies of CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, after short stimulation with SLA (SLA-stim) or MP65 (C.Alb-stim) peptides, or without antigen (no antigen), from AIH SLA-neg, (B) n = 8 and (C) n = 6, and AIH SLA-pos, (B–C) n = 8 patients. (D) Dot plot and (E) frequency of CD45RA<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, and CD45RO<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells after peptide stimulation (C.Alb-CD4; SLA-CD4). (F) Dot plot and graphic repartition of TN (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), TCM (CD45RA<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>), TEM (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>), and TEMRA (CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>) on total CD4<sup>+</sup> T cells, and CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells. (G) Normalised frequency of memory CD45RA<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells in AIH SLA-neg and AIH SLA-pos patients after peptide stimulation. (H) Dot plot and (I) frequency of CCR6<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>, and CXCR5<sup>+</sup> CD154<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells after peptide stimulation (C.Alb-CD4; SLA-CD4). The (G) Mann-Whitney U test, (E, I) Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison test, and (B–C) Sidak's multiple comparisons test were used. \*\*p < 0.01. AIH, autoimmune hepatitis; C.Alb, *Candida albicans*; neg, negative; pos, positive; SLA, soluble liver antigen; stim, stimulation; enrich, enrichment; PD-1, programmed cell death 1; TN, naive T cell; TCM, central memory T cell; TEM, effector memory T cell; TEMRA, effector memory T cell expressing the CD45RA. (This figure appears in color on the web.)

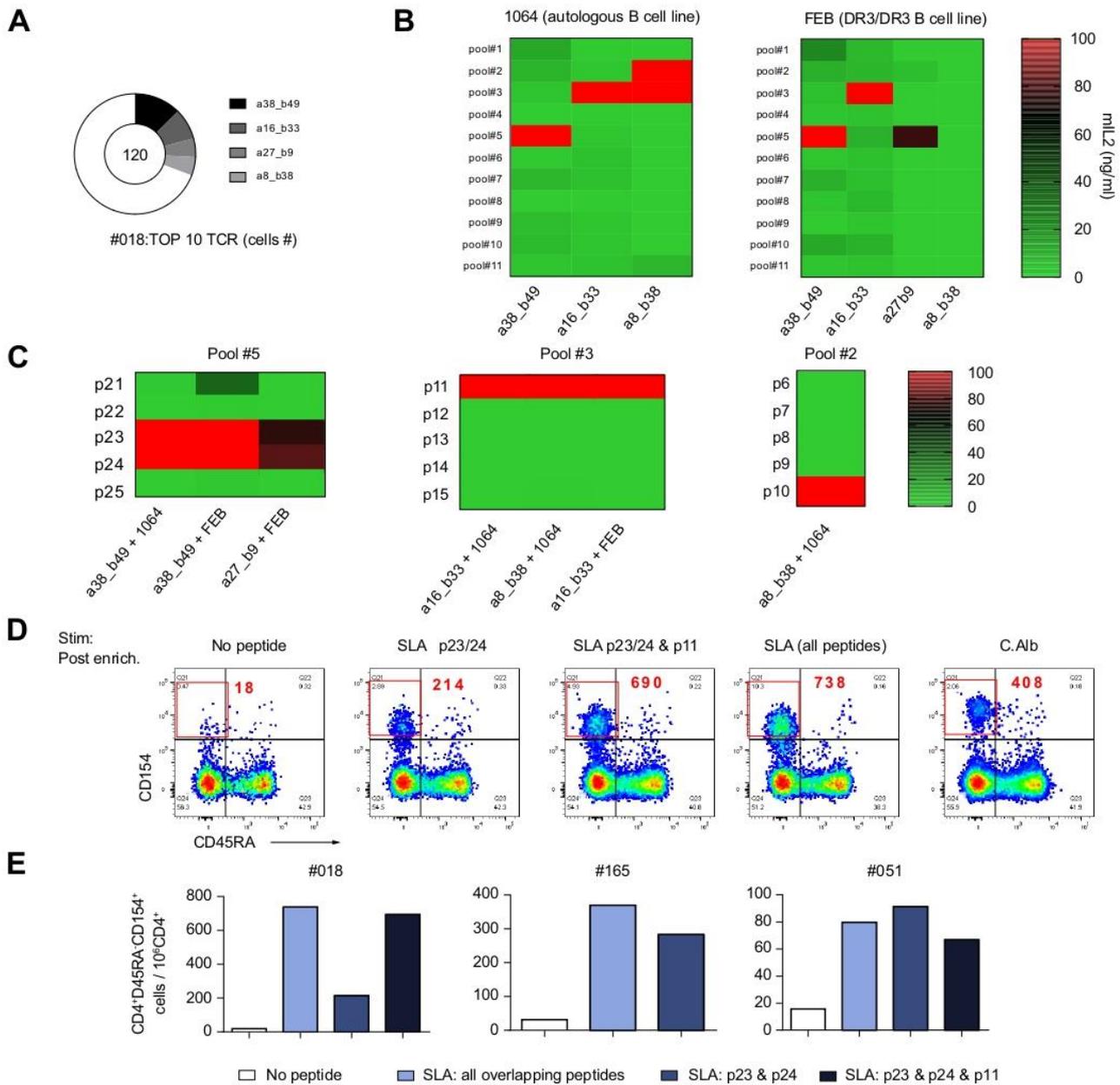


**Fig. 2. ScRNA-seq analysis reveals a TPH profile of autoreactive CD4 T cells.** (A) Experimental design. (B) PCA projection on PC1 and PC2 (percentage of total variability, along axis) before batch effect removal (left), and UMAP projection after batch effect removal (right) of single-cell transcriptomes of 546 SLA-specific and 493 C.Alb.-specific CD4 T cells isolated from 5 distinct patients with AIH. (C) Heat map representation of the top 20 genes differentially expressed. (D) Single-cell gene expression UMAP plots showing expression levels of specific marker genes. (E) Heat map representation of gene expression related to cytokines, transcription factors, or immune markers from SLA-specific and C.Alb.-specific CD4 T cells. Bold genes are significantly different between groups. (F) Distribution of TCR $\alpha\beta$  clones among each patient's antigen-specific T cells. Numbers indicate the number of single cells analysed per patient. Black and grey sectors indicate the proportion of TCR $\alpha\beta$  clones expressed by  $\geq 2$  cells; white sector: unique clonotypes. (G) Same UMAP plot as in (B) with the top TCR $\alpha\beta$  clones identified per patient overlaid (full circle, SLA specific; empty circle, C.Alb. specific). AIH, autoimmune hepatitis; C.Alb, *Candida albicans*; PCA, principal component analysis; scRNA-seq, single-cell RNA-seq; SLA, soluble liver antigen; TCR, T-cell receptor; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection. (This figure appears in color on the web.)

with the PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population in active AIH (Fig. 5C and D).

In patients with AIH, both PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> and PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> TFH CD4 cells were TIGIT<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>CD49d<sup>high</sup> (Fig. 5E) and

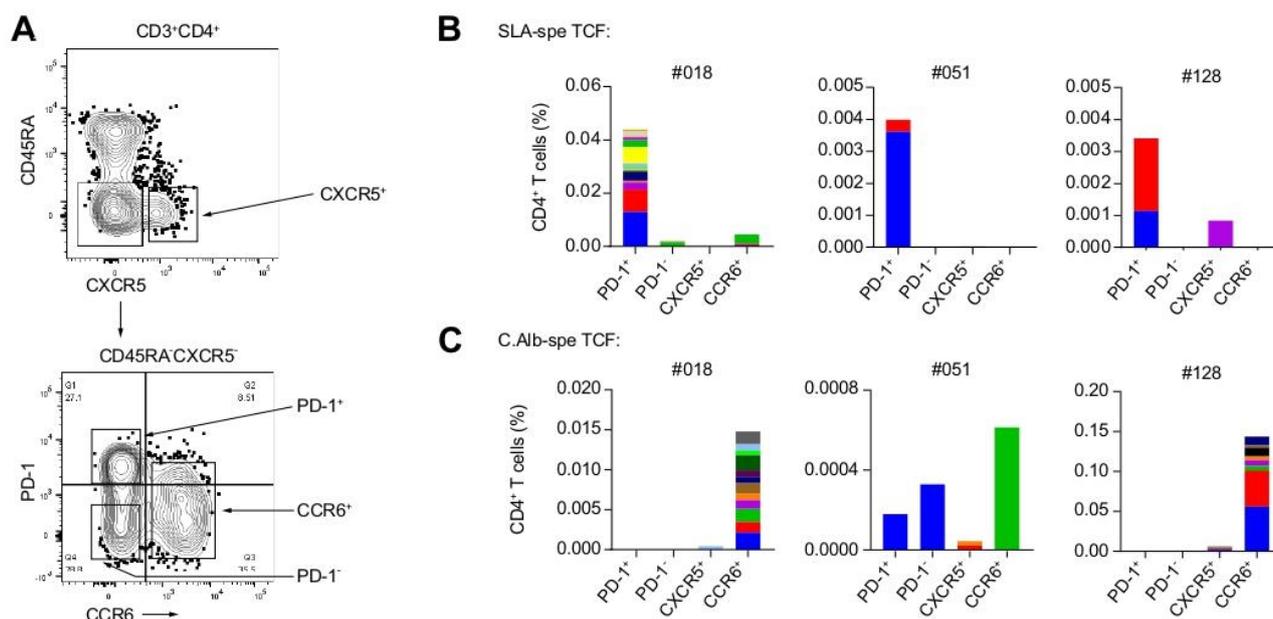
expressed ICOS and CTLA4 (Fig. 5F), similar to SLA-specific CD4 T cells (Fig. 2). Regarding their capacity to produce interferon gamma (IFN $\gamma$ ) and IL-21 upon *ex vivo* restimulation, PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells were mainly IFN $\gamma$ -producing cells, and more than half



**Fig. 3.** SLA<sub>81-100</sub> and SLA<sub>177-204</sub> sequences contain dominant T-cell epitopes driving the SLA-specific reactivity of CD4 T cells in AIH. (A) Distribution of the 4 tested TCR $\beta$  clonotypes among the 120 SLA-specific T cells expressing the top 10 most frequent clonotypes from patient 018. Sectors indicate the proportion of cells with tested TCR $\beta$  clonotypes. (B–C) heat-map representation of murine IL-2 production after stimulation of the selected TCR $\beta$  clone lines (columns) with (B) SLA-peptide pools or (C) individual peptides (derived from the indicated pool) (rows) presented by autologous (1064) or DR3 homozygous (FEB) immortalised B-cell lines. (D) Dot plot of the CD154 expression on CD4 T cells, after stimulation with identified peptides and controls. The number of CD154<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells per million total CD4 T cells is indicated in red in the dot plots for patient 018, and (E) in the bar graphs for 3 distinct HLA-DR3<sup>+</sup> patients with AIH (018, 165, and 051). AIH, autoimmune hepatitis; C.Alb, *Candida albicans*; SLA, soluble liver antigen. (This figure appears in color on the web.)

of IL-21-producing cells also produced IFN $\gamma$ . In contrast, only  $10.8 \pm 5.2\%$  of PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> TFH produced IFN $\gamma$ , and most IL-21-producing TFH cells did not produce IFN $\gamma$  (Fig. 5G). These results are consistent with the TPH profile of PD1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4 T cells<sup>12</sup> and SLA-specific CD4 T cells. TPH are known to induce B-cell differentiation; thus, PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> memory CD4 T cells from patients with AIH were tested for their B-helper capacity

(Fig. 5H–J). Memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4 T cells from patients with AIH were more potent than PD-1<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4 T cells at inducing the differentiation of B cells into CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> plasmablasts (Fig. 5H) and IgG secretion (Fig. 5J). We could not test the B-helper activity of PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4 T cells because of insufficient cell number of that subset. Blocking soluble IL-21 with decoy IL-21R drastically reduced the proportion



**Fig. 4. PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population is the reservoir of autoreactive CD4 T cells in AIH.** (A) Gating strategy to isolate CXCR5<sup>+</sup>, PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> (PD-1<sup>+</sup>), PD-1<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> (CCR6<sup>+</sup>), and PD-1<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> (PD-1<sup>-</sup>) CD4 memory T cells in the blood of patients with AIH. (B–C) Frequency, among bulk sequencing TCRβ clonotypes from indicated subsets defined in (A), (B) of the major TCRβ clonotypes of SLA-CD4 T cells, and (C) of C.Alb-CD4 T cells identified at the single-cell level (Fig. 2) in 3 patients with AIH. Each colour in the bars represents a distinct TCRβ clonotype. AIH, autoimmune hepatitis; C.Alb, *Candida albicans*; SLA, soluble liver antigen; TCR, T-cell receptor. (This figure appears in color on the web.)

**Table 2. Clinical patterns of patients with AIH and NASH (Fig. 6), expressed as mean (± SD or percentage).**

	Active AIH	Remission AIH	NASH
Number (n)	27	15	17
Age (yr)	58 ± 19	54 ± 18	57 ± 15
Female, n (%)	20 (74)	9 (60)	6 (35)
Disease duration (yr)	1 ± 3	7 ± 6	5 ± 4
IgG (g/L)	28 ± 15	11 ± 2	n.a.
AST (IU/L)	583 ± 629	27 ± 10	44 ± 20
ALT (IU/L)	573 ± 602	25 ± 12	60 ± 40
Untreated, n (%)	19 (70)	1 (7)	9 (53)
Under treatment (IS), n (%)	8 (30)	14 (93)	0
At diagnosis, n (%)			
ANA ≥ 1/80	25/26 (96)	10/14 (71)	4/9 (44)
SMA ≥ 1/80	18/27 (67)	10/15 (67)	0/9 (0)
SLA+	1/27 (4)	4/15 (27)	0/7 (0)
LKM1+	0/27 (0)	1/15 (7)	0/4 (0)
LC1+	0/17 (0)	1/10 (10)	n.a.
Seronegative	0/27 (0)	0/15 (0)	5/9 (55)

AIH, autoimmune hepatitis; ANA, anti-nuclear antibody; IS, immunosuppression; LC1, liver cytosol type 1 antibody; LKM1, liver/kidney microsomal type 1 antibody; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; SLA, soluble liver antigen; SMA, smooth muscle antibody.

of differentiated plasmablasts (Fig. 5I), suggesting that the B-helper capacity was mostly IL-21 dependent.

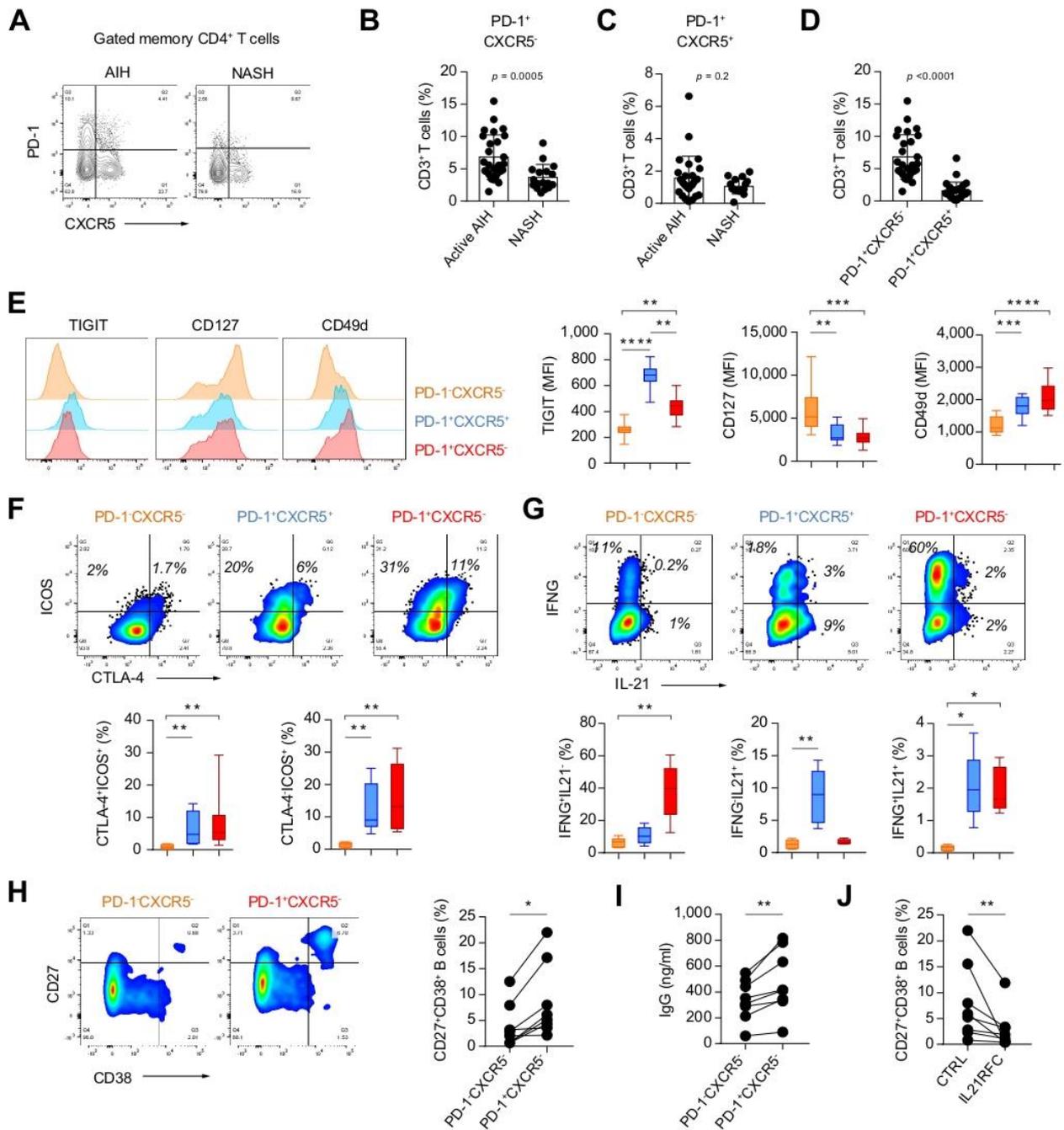
Altogether, these data demonstrated that patients with AIH, independently of the presence of anti-SLA autoantibodies, presented in their blood an increased frequency of a CD4 T-cell subset expressing PD-1 but not CXCR5, and that this subset presented a strong similarity with the TPH population, reported to be involved in other autoimmune diseases.<sup>12,14,15</sup>

**PD-1 and CD38 co-expression by memory CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> T cells is an immune correlate of AIH activity**

In a parallel effort to determine the clinical relevance of tracking the autoreactive CD4 T-cell population and to delineate its specific phenotypic, we performed 11-colour flow cytometry on peripheral blood T cells from 11 patients with active AIH vs. 11 patients with NASH (Fig. 6A and Table S2), monitoring markers identified in the scRNA-seq data or in previous phenotypic observations (Figs. 1, 2, and 5), with a focus on activation and differentiation markers (CD38, CD127, and CD27). Unsupervised analysis of these data with self-organising maps and hierarchical clustering identified 14 phenotypic T-cell metaclusters (Figs. 6A and S5 and S6). Three metaclusters were significantly increased in patients with AIH compared with patients with NASH (Fig. 6B). They were, respectively, memory CD4<sup>+</sup> (cluster 5), CD8<sup>+</sup> (cluster 8), and double-negative (cluster 12) T cells, and all shared the CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> phenotype (Figs. 6C and S7).

Next, we set out to analyse the link between these identified T-cell subsets (clusters 5, 8, and 12) and the clinical status of patients with AIH in a group of 27 patients with active AIH, a group of 15 patients with AIH under remission (treated), and a group of 17 patients with NASH (Tables 2, S2, and S8 and Fig. S8). The cluster 5 and cluster 8 T-cell subsets were the most significantly enriched subsets in the active AIH group compared with the NASH group (Fig. 5D and E and Table S8).

Interestingly, cluster 5 cells remained significantly enriched in the group of patients with AIH under remission compared with the NASH group, whereas cluster 8 cells were significantly decreased during remission compared with the active AIH group (Fig. 5D and E and Table S8).



**Fig. 5. Memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T cells with a TPH profile are enriched in the blood of patients with AIH.** (A–D) Representative dot plots and graph of the (B and D) CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> and the (C and D) CD45RA<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-cell populations in patients with active AIH (n = 27) and NASH (n = 17). (E) Median of fluorescence intensity for indicated markers in indicated CD4 T-cell subsets in patients with AIH (n = 12). (F and G) Percentage of cells expressing ICOS and/or CTLA4 (F; n = 8), and IFNG and/or IL-21 (G; n = 5) in indicated CD4 T-cell subsets in patients with AIH. (H and J) Percentage of plasma cells (H, J; CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) and (I) concentration of IgG after a 7-day co-culture with autologous B cells and indicated memory CD4 T-cell subsets with IL-21RFC or without (CTRL) (J). Each point represents a duplicate experiment per patient (n = 8). The (B–D) Mann-Whitney U test, (E–G) Kruskal-Wallis test and Dunn’s multiple comparison test, or the (H–J) Wilcoxon matched-pairs signed-rank test were used. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001; \*\*\*\*p < 0.0001. AIH, autoimmune hepatitis; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PD-1, programmed cell death 1; TPH, T peripheral helper. (This figure appears in color on the web.)

Only the frequency of clusters 5 and 8 T-cell subsets correlated with biological markers of disease (Fig. 5F and Table S9). Cluster 5 CD4 T-cell subset frequency correlated with serum IgG levels, and cluster 8 CD8 T-cell subset frequency correlated with transaminase activity.

Thus, fine immuno-phenotyping based on the characterisation of autoreactive CD4 T cells identified T-cell subsets significantly associated with AIH disease activity. Our data suggested that the clinical relevance of monitoring autoreactive TPH cells could be enhanced by analysing additional markers, such as

CD27, CD127, and CD38. Finally, the co-expression of PD-1 and CD38 by CD45RA<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> CD4 and/or CD8 T cells may be essential to track, delineate, and potentially target pathogenic T cells involved in AIH pathogenesis.

## Discussion

The combination of *ex vivo* restimulation with 5'-end scRNA-seq, further confirmed by bulk TCR $\beta$  sequencing, provided strong evidence that the central memory CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> CD4 T-cell population, with B-helper function and a pro-inflammatory signature, is the major reservoir of autoreactive CD4 T cells in AIH. This subset supports B-cell differentiation through the production of IL-21, which constitutes a new possible therapeutic target for AIH treatment. It was previously reported that IL-21 could play an important role in AIH pathogenesis.<sup>4,33-35</sup> The authors reported the principal source of IL-21 as the classical TFH cell population (PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>). Our data strongly suggest that the CD45RA<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population could be another major source of IL-21 participating to AIH pathogenesis.

Results presented in our study confirm the idea that autoreactive CD4 T cells supporting B-cell differentiation in multiple autoimmune disorders share a similar phenotype characterised by the expression of PD-1 and the absence of CXCR5, comparable with the recently described gluten-specific CD4 T cells in celiac disease,<sup>24</sup> and TPH cells or TH10 cells in RA and in lupus.<sup>12-14</sup> By tracking autoreactive TCR $\beta$  in blood CD4 T-cell subsets, we confirmed that autoreactive CD4 T cells are PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> and are distinct from the classical TFH cell population.<sup>12-14,24</sup> The PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> memory CD4 T-cell population identified in patients with AIH in our study expressed CD27, but did not express CCR6, suggesting that these cells might be phenotypically distinct from pathogenic CD4 T cells identified in previous studies on gluten-specific CD4 T cells (CD27<sup>+</sup>),<sup>24</sup> autoreactive CD4 T cell described in infants with autoimmune diabetes (CCR6<sup>+</sup>),<sup>36</sup> and expanded effector CD4 T cells in RA (CD27<sup>-</sup>).<sup>37</sup>

For the first time, we propose a complete transcriptomic analysis of autoreactive (SLA-specific) CD4 T cells in AIH, and we reveal their specific molecular signature characterised by an *IL21* and *IFNG* cytokine signature. In autoimmune disorders, distinct autoreactive CD4 T-cell molecular signatures have been reported, including a TFH and TPH signature,<sup>3,5,12,14,15,24,38</sup> a TH10 and Tr1/Treg (regulatory T cell) signature,<sup>13,39</sup> and a TH17-like signature.<sup>23,36,40</sup> Here, we have shown that SLA-specific CD4 T cells had a transcriptomic signature close to the TPH signature, although *CXCL13*, one of the major genes characterising TPH cells, was only detected in a small fraction of SLA-specific T cells. Overall, SLA-specific CD4 T cells express a specific transcriptomic signature characterised by the transcription factors *NR3C1*, *EGR2*, *STAT4*, *STAT3*, *IRF4*, and *MAF*; the cytokines *IL-21*, *IFNG*, and *TNF*; and the immune-regulatory molecules *CLEC2D*, *CTLA4*, *TIGIT*, *KLRB1*, and *CD109*. These observations suggest a disease-dependent immune signature of autoreactive CD4 T cells. Thus, the direct characterisation of the transcriptomic signature of autoreactive CD4 T cells in diverse autoimmune disorders is primordial to elucidate the physiopathology of these cells.

The expression of PD-1 and the overexpression of genes related to immune regulation (*NR3C1*, *TIGIT*, and *CTLA4*) could result from the chronic activation of autoreactive CD4 T cells.

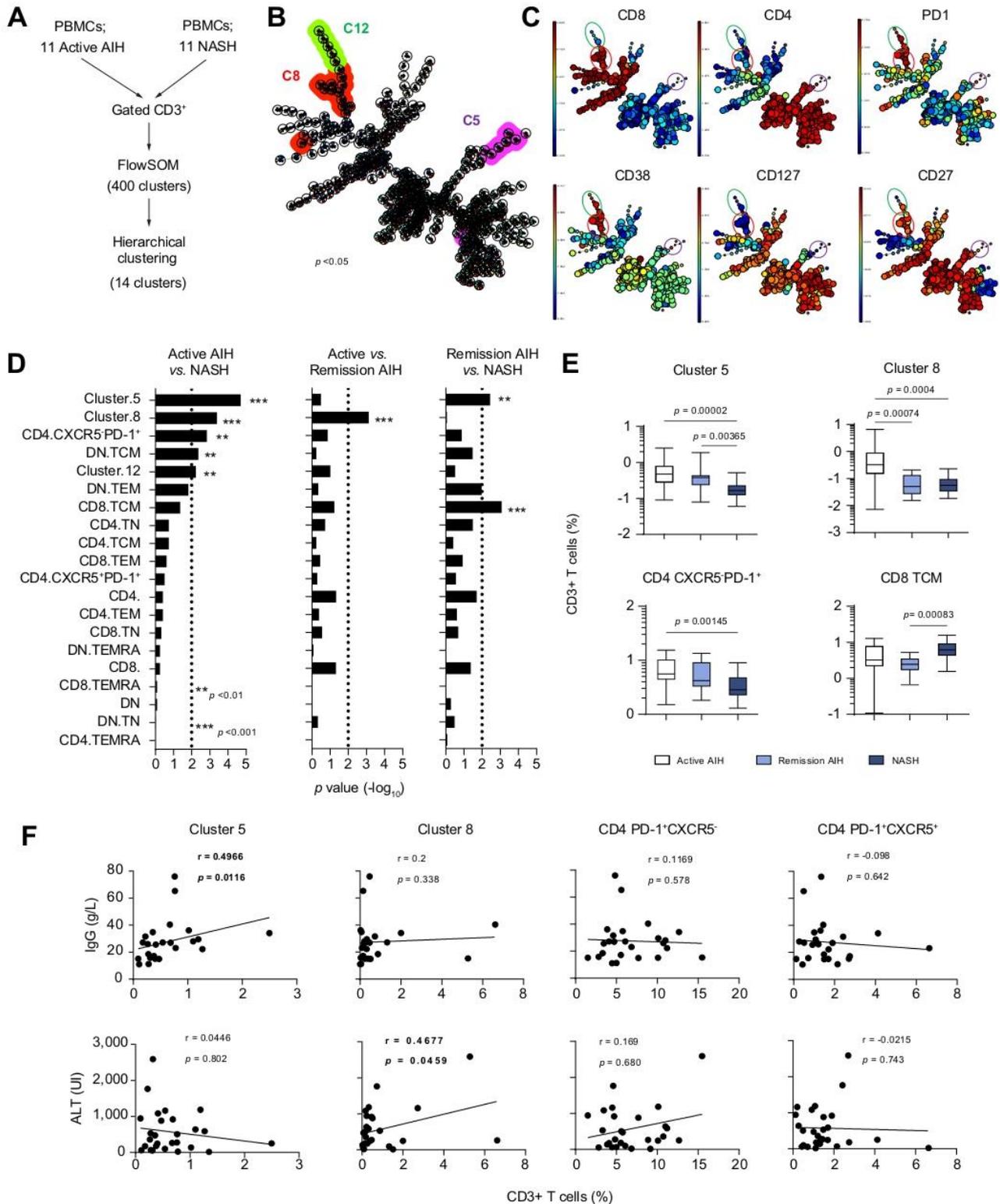
However, those autoreactive CD4 T cells persist with a pro-inflammatory profile (*IFNG* and *TNF*), which suggests a form of resistance or adaptation, rather than functional exhaustion. Thus, targeting regulatory pathways, including CD109, CLEC2D, or KLRB1, may be interesting new therapeutic options. Natural killer (NK) cells are enriched in the liver compared with blood,<sup>41</sup> and a recent study has shown the presence of high numbers of KLRB1<sup>+</sup>CD4 T cells with a pro-inflammatory cytokine signature (*TNF* and *IFNG*) in the inflamed liver.<sup>42</sup> This suggests that the NK-like signature we observed for autoreactive CD4 T cells in AIH may be imprinted by liver-specific factors.

After reconstitution of autoreactive TCR $\alpha\beta$  in T-cell hybridoma, we were able to perform T-cell epitope discovery and to validate the data *ex vivo* with our restimulation assay. The T-cell epitopes for the SLA antigen we identified here had been previously described in a transgenic mouse model,<sup>11</sup> and our study highlights their relevance for autoimmune activation in patients with AIH. This may drive new clinical therapeutic strategies by offering the possibility to target autoreactive CD4 T cells.

Finally, based on the data generated from the scRNA-seq and from the phenotypic analysis of circulating PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD4 T cells in patients with AIH, we have identified a more specific phenotype of memory CD4 and CD8 T cells (CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>) associated with an active AIH disease. We showed a direct association between the frequency of CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD8 T cells and transaminase levels, suggesting its potential involvement in the destruction of the liver parenchyma. This subset was down-regulated during remission, suggesting a sensibility to immunosuppressive treatment. Because the level of AST/ALT in the group of patients with NASH was low, we cannot exclude that this T-cell subset was linked to the degree of liver inflammation, and additional control disease groups will be needed to conclude on the AIH specificity. We also observed that the frequency of CD45RA<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup>CD4 T cells correlated with serum IgG levels during active AIH, and remained high during remission. In agreement with our previous study,<sup>17</sup> the persistence of this subset during remission suggests residual autoimmune activity under treatment. The high rate of relapse is a major challenge when wishing to limit long-term immunosuppression and associated side effects in patients with AIH. It will therefore be most interesting to investigate whether a higher frequency of this subset in the blood of patients in remission can be predictive of relapse after treatment withdrawal. Thus, the tracking of autoreactive T-cell activity in patients' blood will be of interest for better treatment management in the clinic.

## Abbreviations

AIH, autoimmune hepatitis; AILD, autoimmune liver disease; C.Alb, *Candida albicans*; IFN $\gamma$ , interferon gamma; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; NK, natural killer; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PD-1, programmed cell death 1; RA, rheumatoid arthritis; scRNA-seq, single-cell RNA-seq; SLA, soluble liver antigen; SLE, systemic lupus erythematosus; TCR, T-cell receptor; TFH, T follicular helper; TNF, tumour necrosis factor; TPH, T peripheral helper; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection.



**Fig. 6. PD-1 and CD38 co-expression by memory CD45RA<sup>-</sup>CXCR5<sup>-</sup>CD127<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> T cells is an immune correlate of AIH activity.** (A) Strategy of the flow cytometry analysis of the combined T-cell population from 11 patients with active AIH and 11 patients with NASH. (B) Self-organising map visualisation of the phenotypic analysis, highlighting the 3 metaclusters (C5, C8, and C12) expanded in patients with AIH ( $p < 0.05$ ) after hierarchical clustering with FlowSOM. (C) Expression of indicated markers visualised within the self-organising map. (D-E) Graph representation of the (D) adjusted  $p$  value and (E) of the frequency amongst CD3<sup>+</sup> T cells for T-cell subsets indicated after comparisons between patients with active AIH ( $n = 27$ ), remission AIH ( $n = 15$ ), and NASH ( $n = 17$ ), as

### Financial support

This work was supported by institutional grants from Inserm and Nantes Université to the Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, and from Inserm, CNRS and Aix-Marseille University to the Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE17-0024-01). It was carried out in the context of the IHU-Cesti project (ANR-10-IBHU-005) and the LabEx IGO programme (ANR-11-LABX-0016-01). The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Métropole and the Région Pays de la Loire. This work was also supported by the patient association Association pour la lutte contre les maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires (ALBI), Association Française pour l'Etude du Foie-Société Française d'Hépatologie (AFEF), and Société Nationale Française de Gastro-Entérologie (SNFGE). This work was granted access to the high performance computing resources of Aix-Marseille Université financed by the project Equip@Meso (ANR-10-EQPX-29-01) of the programme 'Investissements d'Avenir'.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest that pertain to this work.

Please refer to the accompanying [ICMJE disclosure](#) forms for further details.

### Authors' contributions

Conceptualisation, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, resources, supervision, validation, visualisation, writing of original draft, and review and editing: Amédée Renand. Formal analysis, methodology, and visualisation: Iñaki Cervera-Marzal, Laurine Gil, Chuang Dong. Investigation: Erwan Kervagoret, Alexandra Garcia, Anais Cardon, Jean-Paul Judor. Project administration and resources: Hélène Auble, Fabienne Vavasseur. Formal analysis, investigation, resources, and validation: Sarah Habes. Resources: Caroline Chevalier, Florence Tanné. Methodology and resources: Béatrice Clémenceau, David Laplaud. Formal analysis and resources: Jean-François Mosnier. Funding acquisition, writing, and review and editing: Sophie Brouard. Conceptualisation, investigation, methodology, resources, supervision, writing, and review and editing: Jérôme Gournay. Conceptualisation, data curation, formal analysis, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, visualisation, writing of original draft, and review and editing: Pierre Milpied. Conceptualisation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, supervision, validation, writing of original draft, and review and editing: Sophie Conchon.

### Acknowledgements

The authors thank the Bioinformatics and Genomics Core Facilities of Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy and the BIRD Core facility of the SFR Santé F. Bonamy (Université de Nantes, Inserm UMS016, CNRS UMS3556) for helpful discussions and

comments. The authors acknowledge HalioDx and the UCAGE-nomiX platform for sequencing single-cell RNA-seq libraries. The authors also thank Dr K Dornmair for providing the 58 $\alpha$  $\beta$ <sup>-</sup> T-cell hybridoma, and the Laboratoire HLA EFS Centre Pays de la Loire for human leucocyte antigen typing.

### Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.053>.

### References

*Author names in bold designate shared co-first authorship*

- [1] Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 2009;30:324–335.
- [2] Yu D, Vinuesa CG. The elusive identity of T follicular helper cells. *Trends Immunol* 2010;31:377–383.
- [3] Wang L, Sun Y, Zhang Z, Jia Y, Zou Z, Ding J, et al. CXCR5+ CD4+ T follicular helper cells participate in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2015;61:627–638.
- [4] Kimura N, Yamagiwa S, Sugano T, Setsu T, Tominaga K, Kamimura H, et al. Possible involvement of CCR7(-) PD-1(+) follicular helper T cell subset in the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2017;33:298–306.
- [5] Weinstein JS, Hernandez SG, Craft J. T cells that promote B-cell maturation in systemic autoimmunity. *Immunol Rev* 2012;247:160–171.
- [6] Sebode M, Weiler-Normann C, Liwinski T, Schramm C. Autoantibodies in autoimmune liver disease—clinical and diagnostic relevance. *Front Immunol* 2018;9:609.
- [7] Taubert R, Hupa-Breier KL, Jaekel E, Manns MP. Novel therapeutic targets in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2018;95:34–46.
- [8] Grant CR, Liberal R, Holder BS, Cardone J, Ma Y, Robson SC, et al. Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2014;59:1007–1015.
- [9] Zhao L, Tang Y, You Z, Wang Q, Liang S, Han X, et al. Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS One* 2011;6:e18909.
- [10] Bovensiepen CS, Schakat M, Sebode M, Zenouzi R, Hartl J, Peiseler M, et al. TNF-producing Th1 cells are selectively expanded in liver infiltrates of patients with autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2019;203:3148–3156.
- [11] Mix H, Weiler-Normann C, Thimme R, Ahlenstiel G, Shin E-C, Herkel J, et al. Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2008;135:2107–2118.
- [12] Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, Slowikowski K, Fonseka CY, Liu Y, et al. Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 2017;542:110–114.
- [13] Caielli S, Veiga DT, Balasubramanian P, Athale S, Domic B, Murat E, et al. A CD4<sup>+</sup> T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med* 2018;25:75–81.
- [14] Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseka CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 2019;20:928–942.
- [15] Bocharnikov AV, Keegan J, Wacleche VS, Cao Y, Fonseka CY, Wang G, et al. PD-1hiCXCR5-T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* 2019;4:e130062.
- [16] Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS. Autoimmune hepatitis. *Lancet* 2013;382:1433–1444.
- [17] Renand A, Habes S, Mosnier J-F, Aublé H, Judor J-P, Vince N, et al. Immune alterations in patients with type 1 autoimmune hepatitis persist upon standard immunosuppressive treatment. *Hepatology* 2018;2:968–981.

indicated. (F) Spearman correlation of the frequency of indicated T-cell subsets with the serum IgG and ALT levels in patients with active AIH (n = 27). The Shapiro-Wilk normality test and the Bonferroni multiple test correction were used. \*\*p <0.01; \*\*\*p <0.001. AIH, autoimmune hepatitis; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PD-1, programmed cell death 1. (This figure appears in color on the web.)

- [18] Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, Heinrich E, Hallensleben M, Manns MP, et al. Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2015;62:1524–1535.
- [19] Renand A, Archila LD, McGinty J, Wambre E, Robinson D, Hales BJ, et al. Chronic cat allergen exposure induces a TH2 cell-dependent IgG4 response related to low sensitization. *J Allergy Clin Immunol* 2015;136:1627–1635.e13.
- [20] Renand A, Farrington M, Whalen E, Wambre E, Bajzik V, Chinthrajah S, et al. Heterogeneity of Ara h component-specific CD4 T cell responses in peanut-allergic subjects. *Front Immunol* 2018;9:1408.
- [21] Bacher P, Schink C, Teutschbein J, Kniemeyer O, Assenmacher M, Brakhage AA, et al. Antigen-reactive T cell enrichment for direct, high-resolution analysis of the human naive and memory Th cell repertoire. *J Immunol* 2013;190:3967–3976.
- [22] **Cossarizza A, Chang H-D, Radbruch A**, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol* 2019;49:1457–1973.
- [23] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445–489.
- [24] Christophersen A, Lund EG, Snir O, Solà E, Kanduri C, Dahal-Koirala S, et al. Distinct phenotype of CD4+ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med* 2019;25:734–737.
- [25] Conti HR, Gaffen SL. IL-17-mediated immunity to the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *J Immunol* 2015;195:780–788.
- [26] **Attaf N, Cervera-Marzal I**, Dong C, Gil L, Renand A, Spinelli L, et al. FB5P-seq: FACS-based 5-prime end single-cell RNA-seq for integrative analysis of transcriptome and antigen receptor repertoire in B and T cells. *Front Immunol* 2020;11:216.
- [27] Locci M, Havenar-Daughton C, Landais E, Wu J, Kroenke MA, Arlehamn CL, et al. Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells are highly functional and correlate with broadly neutralizing HIV antibody responses. *Immunity* 2013;39:758–769.
- [28] Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* 2017;17:233–247.
- [29] Song G, Feng T, Zhao R, Lu Q, Diao Y, Guo Q, et al. CD109 regulates the inflammatory response and is required for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2019;78:1632–1641.
- [30] Llibre A, Klenerman P, Willberg CB. Multi-functional lectin-like transcript-1: a new player in human immune regulation. *Immunol Lett* 2016;177:62–69.
- [31] Letourneur F, Malissen B. Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin. *Eur J Immunol* 1989;19:2269–2274.
- [32] Blank U, Boitel B, Mège D, Ermonval M, Acuto O. Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *Eur J Immunol* 1993;23:3057–3065.
- [33] Abe K, Takahashi A, Imaizumi H, Hayashi M, Okai K, Kanno Y, et al. Interleukin-21 plays a critical role in the pathogenesis and severity of type I autoimmune hepatitis. *Springerplus* 2016;5:777.
- [34] **Ma L, Qin J**, Ji H, Zhao P, Jiang Y. Tfh and plasma cells are correlated with hypergammaglobulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2014;34:405–415.
- [35] Liang M, Liwen Z, Juan D, Yun Z, Yanbo D, Jianping C. Dysregulated TFR and TFH cells correlate with B-cell differentiation and antibody production in autoimmune hepatitis. *J Cell Mol Med* 2020;24:3948–3957.
- [36] Heninger A-K, Eugster A, Kuehn D, Buettner F, Kuhn M, Lindner A, et al. A divergent population of autoantigen-responsive CD4+ T cells in infants prior to  $\beta$  cell autoimmunity. *Sci Transl Med* 2017;9:eaa8848.
- [37] **Fonseka CY, Rao DA**, Teslovich NC, Korsunsky I, Hannes SK, Slowikowski K, et al. Mixed-effects association of single cells identifies an expanded effector CD4+ T cell subset in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med* 2018;10:eaaq0305.
- [38] Kenefleck R, Wang CJ, Kapadi T, Wardzinski L, Attridge K, Clough LE, et al. Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2015;125:292–303.
- [39] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)/CD25(+) FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2010;10:849–859.
- [40] **Cao Y, Goods BA**, Raddassi K, Nepom GT, Kwok WW, Love JC, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2015;7:287ra74.
- [41] Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:88–110.
- [42] Truong K-L, Schlickeiser S, Vogt K, Boës D, Stanko K, Appelt C, et al. Killer-like receptors and GPR56 progressive expression defines cytokine production of human CD4+ memory T cells. *Nat Commun* 2019;10:2263.



# Mechanisms of autoimmune hepatitis

Anaïs Cardon, Sophie Conchon\*, and Amédée Renand\*

## Purpose of review

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic disease characterized by a lymphocyte infiltrate in the liver. For decades, nonspecific immunosuppression has been used to limit chronic liver inflammation. The high risk of relapse, the treatments side effects, and the significant number of refractory patients are the main clinical issues that require efforts to understand AIH immune mechanisms.

## Recent findings

The balance between regulatory CD4 T cells, known to control autoimmunity, and effector CD4 T cells, that recognize liver self-antigens and mediate the liver inflammation, appears central in AIH immune mechanisms. Recent advances in the identification of pathogenic auto-reactive CD4 T cells, and of new mechanisms of immune regulatory defects in AIH patients, give new insights into the pathophysiology of this disease.

## Summary

In this review, we propose an overview of the central role of CD4 T cells (both regulatory and pathogenic) in mechanisms of AIH, with a focus on recent advances regarding defective regulatory mechanisms and immune profile of auto-reactive CD4 T cells. These findings may have implication for the orientation of new therapeutic strategies to treat AIH, such as regulatory T-cell infusion or targeting B cells and cytokines released by pathogenic CD4 T cells.

## Keywords

autoimmune hepatitis, autoimmunity, autoreactive CD4 T cells, regulatory T cells

## INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease affecting the liver, with a female predisposition. This disease is characterized by the presence of autoantibodies, elevated immunoglobulin (Ig) G rate and interface hepatitis, with a massive hepatic lymphocytic infiltration composed of CD4 and CD8 T cells and B cells. AIH is divided into two types, based on the autoantibodies present in patients' blood: Anti-Nuclear Antibodies (ANA) and anti-Smooth Muscle Antibodies (SMA) in type 1 AIH (AIH-1); and anti-Liver Kidney Microsomal type 1 (LKM-1); and anti-Liver Cytosol (LC-1) antibodies in type 2 AIH (AIH-2). Environmental factors, such as molecular mimicry, viral infections or drug exposition, seem to play a role in both AIH subtypes initiation [1,2] (Fig. 1a). The efficacy of immunosuppressive drugs [prednisolone associated with azathioprine] [3] to induce remission demonstrates the role of immune cells in the pathogenesis of AIH.

The predisposition MHC-II genes [*HLA-DR3* and *HLA-DR4* for type 1 AIH (AIH-1); *HLA-DR7* for type 2 AIH (AIH-2)] [4–6], involved in the antigen presentation to CD4 T cells, and the accumulation of

autoantibodies, resulting from the cognate interaction between CD4 T cells and B cells, support the general idea that an uncontrolled self-antigen reactivity of CD4 T cells is involved in the mechanisms of AIH (Fig. 1b). Defective regulatory mechanisms have been involved in the amplification of this phenomenon, and are the ones that have been first investigated, historically (Fig. 1c and d). This article will first describe the concept of defective regulatory mechanisms, with a focus on the regulatory CD4 T cell (Treg) population, known to modulate immune responses by inhibiting effector/pathogenic T-cell activity (secretion of suppressive cytokines, direct cytotoxic activity...). Then it will review recent

Université de Nantes, Inserm, Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, Nantes, France

Correspondence to Sophie Conchon, CRTI, INSERM UMR1064 30 Bd J Monnet, 44093 Nantes cedex 1, France. Tel: +33 2 40 08 75 07; e-mail: sophie.conchon@univ-nantes.fr

\*Sophie Conchon and Amédée Renand equally contributed to the writing of this article.

*Curr Opin Gastroenterol* 2021, 37:79–85

DOI:10.1097/MOG.0000000000000704

## KEY POINTS

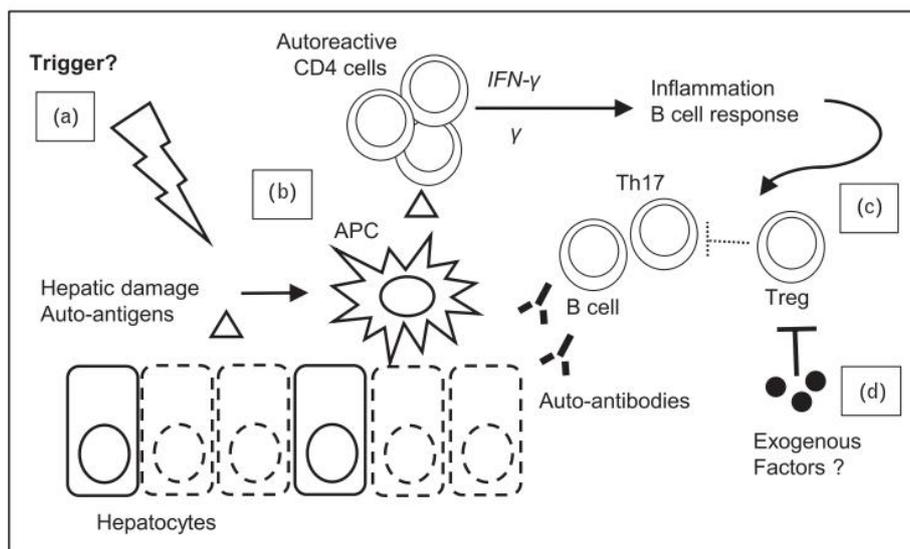
- Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease caused by defective regulatory mechanisms, with a possible alteration of the regulatory CD4 T cell (Treg) population, and by a pathogenic role of self-antigen-specific CD4 T cells.
- Molecular mimicry under inflammatory conditions associated with autoreactive CD4 T cells appear to be critical in AIH mouse models.
- Several populations of autoreactive CD4 T lymphocytes with distinct phenotypes are involved at different stages in the pathogenesis of AIH.
- Self-antigen-specific CD4 T cells with a proinflammatory/B helper profile have been isolated in HAI patients, they are comparable with the peripheral helper T cells (Tph, memory PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup>), identified in other autoimmune disorders.

results on the pathogenic role of the self-antigen-specific CD4 T cells, involved in AIH by having a direct (secretion of inflammatory molecules) or indirect (induction of B-cell differentiation) role in its development and progression. Finally, it will give an overview of suggested profiles of pathogenic CD4 T cells in AIH. The role of other T-cell populations, such as CD8 T cells, NKT, MAIT and  $\gamma\delta$  T cells in AIH has also been described and reviewed recently [7–11] and will not be detailed here.

## DEFECTIVE REGULATORY MECHANISMS IN AUTOIMMUNE HEPATITIS

The CD4 Treg cells are a key population involved in the regulation of autoimmunity. It is characterized by the high expression of the IL-2 receptor alpha CD25 and of the transcription factor FOXP3, and by a low expression of the IL-7 receptor alpha CD127 [12,13]. This complete phenotype has not been investigated in all studies, and additional markers, such as CD39 or Galectin-9 (Gal-9) have also been used to delineate functional Treg cells; this could explain the persistent debate around the defective role of Treg cells in AIH.

Quantitative defect of Treg cells has first been observed in the blood of children with AIH, leading to qualitative defects (incapacity to control CD8 T cells, low production of TGF $\beta$ ...) [14,15]. In adult patients, the low number of Treg cells with a reduced production of the immunoregulatory cytokine IL-10 has also been reported [16,17]. It has also been proposed that Treg cells expressing CD39 were reduced in number and less effective to suppress IL-17 production by CD4 T cells. These CD39-positive Treg cells displayed also a pro-inflammatory profile, which could contribute to their limited regulatory function [18]. However, the quantitative defect of Treg cells in the blood of patients is debated as other studies have shown a normal number of these cells in the blood [19,20] with normal regulatory function [19,21].



**FIGURE 1.** Possible mechanisms of autoimmune hepatitis: extrinsic triggers initiate auto-antigen presentation by APC to naïve CD4 T cells (a). This leads to an expansion of Th1/Tph-like autoreactive CD4 cells (b). IFN- $\gamma$ , TNF and IL-21 produced by autoreactive CD4 cells initiate liver inflammation by recruiting Th17 cells and favouring B-cell differentiation to produce auto-antibodies (c). Treg cells are also recruited but unable to suppress effector T cells, probably because of exogenous inhibitory factors (d).

In the liver of AIH patients, high Foxp3 expression has been reported, and it was decreased under therapy, pointing to a recruitment of Treg cells during the acute phase of the disease, both in adults and children [16,19,22,23]. The recruitment of Treg cells in the inflamed liver results from a general inflammatory mechanism rather than an AIH-specific immune mechanism and relies on their expression of CXCR3 and of CCR4, two chemokine receptors implicated in T-cell migration, and on the secretion of CCR4 ligands by dendritic cells present in the liver during inflammation [21<sup>■</sup>,24,25]. In AIH, although Treg cells appear potentially functional and recruited to the liver, they are not sufficient to stop inflammation (Fig. 1c). On the basis of this observation, a recent work reported on the possibility of using infusion of autologous fully functional GMP (good manufacturing practice)-grade Treg cells with liver homing capacity to treat AIH [21<sup>■</sup>]. Increasing Treg cell number in the inflamed liver to control autoimmunity is a potential therapeutic option.

The defective regulatory mechanisms in AIH are more complex than just a defective function of Treg cells and involve also refractory mechanisms of effector CD4 T cells to regulatory signalling. The Gal-9/Tim-3 axis inducing immune regulation has been shown to be dysregulated in AIH, and patients presented low number of CD4 T cells expressing Tim-3 [26]. It has been also proposed that the increase of the IL-17 pathway in AIH reduced the capacity of effector CD4 T cells to differentiate into regulatory cells [27]. More precisely, the effector Th1/Th17 CD4 cell population seemed unable to fully differentiate into suppressive T regulatory 1 (Tr1) cells in an inflammatory environment in AIH [28]. More recently, a dysfunction of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) pathway on Treg and Th17 cells in AIH patients has been identified to be responsible for the defective CD39 upregulation, the lack of suppressive activity of Treg cells and the unresponsiveness of effector CD4 T cells to immunoregulation [29<sup>■</sup>]. This dual lack of suppressive activity of Treg cells and resistance to immunoregulation of effector T cells points to the complexity of regulatory mechanisms (Fig. 1d).

### SELF-ANTIGENS' REACTIVITY AT THE ORIGIN OF HEPATIC DAMAGE

The presence of autoantibodies targeting hepatocyte antigens is a key feature of AIH. Anti-LKM-1 antibodies and anti-LC-1 antibodies target the cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) and the formimino-transferase cyclodeaminase (FTCD) on hepatocytes, respectively [30]. Anti-SLA antibodies target the

SepSecs protein; they are detected in 20–50% of AIH patients and are the only AIH-specific antibodies [31]. These antibodies, as well as antiliver-specific membrane lipoprotein (LSP) antibodies, antiasialoglycoprotein receptor (ASGPR) antibodies and anti-alcohol dehydrogenase (ADH) antibodies, correlate with disease severity [4]. Finally, hepatocytes isolated from AIH patients are coated with IgG, associated with an increased risk of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) leading to liver damage [32,33].

To get insight into the immuno-pathogenesis of a disease, such as AIH and identify the immune populations involved, clinical investigations on patients who have had the disease for a certain time can be complemented with preclinical models that allow to study the early events. AIH murine models have been developed and have brought interesting results. Some of these, related to autoreactive CD4 T cells in AIH are summarized below.

### Antigen-specific immunization mouse models

To study antigen-specific responses in AIH, mice have been immunized against the two known autoantigens of AIH-2: CYP2D6 and FTCD. Several studies presented here have demonstrated that the adaptive immune responses against CYP2D6 and FTCD were sufficient to induce chronic liver inflammation, and that both autoantibodies and T cells participated to liver damage.

Lapierre *et al.* [34] performed a DNA immunization in C57BL/6 mice by injecting a plasmid encoding a chimeric protein containing the human CYP2D6 (hCYP2D6) and human FTCD (hFTCD) proteins. This led to an increase of AST/ALT levels and hepatic infiltration (mostly CD4 T cells, but also CD8 T cells and B cells), inflammation and necrosis. They also found anti-LKM-1 and anti-LC-1 antibodies with a predominance of IgG2 subclass, representative of a Th1 response, and liver-infiltrating lymphocytes had in-vitro antigen-specific cytotoxic activity. Likewise, Hardtke-Wolenski *et al.* immunized mice with an adenoviral vector encoding for hFTCD (Ad-hFTCD) causing chronic AIH [35]. Adoptive transfer experiments demonstrated the role of CD4 T cells in hepatitis. After in-vitro stimulation with murine FTCD (mFTCD), T cells from Ad-hFTCD-injected mice produced more IFN- $\gamma$ , IL-12 and IL-17 than T cells from control mice, representative of Th1 and Th17 responses. Comparable results have been obtained in another mouse model, with the human/murine CYP2D6 [36,37]. These studies showed that in mice, molecular mimicry, rather than molecular identity, could induce AIH.

Interestingly, the virus-mediated expression of hCYP2D6 seemed to be instrumental, as immunization with Freund's adjuvant and recombinant hCYP2D6 was not sufficient to induce autoimmunity [37]. Recent work in murine models showed that a strong chemical or viral hepatic inflammation together with the presence of a self-mimicking antigen (hCYP2D6) could lead to AIH because of an inhibition of the regulatory pathway [38,39]. The release of TLR2/4 ligands and the secretion of IL-6 and IL-12 during hepatic inflammation attenuated the Tim-3/Gal-9 regulatory pathway and the Treg cell activity; this led to an increase of the Th1 response.

Globally, molecular mimicry under inflammatory conditions seems to be a key feature in AIH mouse models, and these studies support the idea of a central role of autoreactive CD4 T cells with Th1/Th17 profile in AIH mechanisms in these models.

### Recent studies in patients

Immunoglobulin class switch, affecting auto-antibody accumulation, is mediated mainly by an antigen-specific CD4 T-cell-dependent reactivity. However, little is known about the biology of autoreactive CD4 T cells in AIH as they are difficult to detect, and potential dominant self-antigens are not known. Nevertheless, reactivity against some liver self-antigens involved in AIH has been described in patients.

In AIH-2, auto-epitopes of CYP2D6 have been identified and shown to be recognized by both T cells (CD4 and CD8) and B cells (anti-LKM-1 antibodies) [40,41]. Moreover, polyclonal CYP2D6-specific T-cell responses are associated with disease severity [42,43]. CYP2D6-specific CD4 T cells are skewed to a pro-inflammatory IFN- $\gamma$ -secreting profile [42,44] and CYP2D6-specific CD8 T cells also produce IFN- $\gamma$  and display cytotoxicity [43].

The second most described self-antigen reactivity is against SepSecs in AIH patients with anti-SLA antibodies, who present a more aggressive form of the disease [45]. Mix *et al.* [46] identified two HLA-DRB1\*0301-restricted SLA epitopes (SLA<sub>186-197</sub> and SLA<sub>373-386</sub>), which induced IFN- $\gamma$  production by reactive CD4 T cells. In another study, Zhao *et al.* [47] observed also a high IFN- $\gamma$  secretion by CD4 T cells reacting to SLA peptides in Chinese AIH patients with anti-SLA antibodies. Bovensiepen *et al.* [48] confirmed the relationship between anti-SLA antibodies and the CD4 reactivity against SepSecs; this reactivity was characterized by the production of TNF and IFN- $\gamma$  but not IL-17. Our recent work followed the same observation and we provided a detailed transcriptomic analysis of SLA-

specific CD4 T cells, which have a pro-inflammatory/pro-B helper profile defined by the production of TNF, IFNG and IL21 but not IL17, and by the expression of ICOS, TIGIT and CTLA4 [49]. The single cell transcriptomic analysis demonstrated that this population was homogeneous and the SLA reactivity was principally mediated by two dominant CD4 T-cell epitopes derived from the SLA antigen: SLA<sub>81-100</sub> and SLA<sub>177-204</sub>. Surprisingly, these SLA-specific CD4 T cells expressed the programmed cell death protein 1 (PD-1), TIGIT, CTLA-4, CD109 and the transcription factor NR3C1, an armada of immunoregulatory molecules [50-53]. However, probably because of chronic self-antigen stimulation, these autoreactive T cells were fully effector cells as they produced IFN- $\gamma$  and IL-21, suggesting their potential resistance to immunoregulation [49].

Reactivity against ASGPR has also been described to be involved in AIH pathogenesis [54]. However, there has been very few information provided regarding T-cell reactivity against ASGPR [55].

These studies support the idea that autoantibodies participate actively to liver damage in AIH and that this process is mediated by self-antigen-specific CD4 T cells with a pro-inflammatory profile characterized by TNF, IFN- $\gamma$  and IL-21 but not IL-17 production (Fig. 1b). Although two types of AIH are defined based on the autoantibody profiles, whether there are type-specific mechanisms remains to be established. Thus, a deep characterization of those specific CD4 T cells could be a necessary step to better understand general mechanisms of AIH and to understand potential divergence between AIH 1 and AIH 2.

### WHAT IS THE PROFILE OF PATHOGENIC CD4 T CELLS INVOLVED IN AUTOIMMUNE HEPATITIS PATHOGENESIS?

A clear phenotype/profile of autoreactive CD4 T cells in AIH is difficult to define as all hepatocyte-derived self-antigens are still not identified and triggers could be different between the two AIH types. Work published until now seems to implicate different populations that could be involved at different stages in the pathogenesis of AIH.

#### The Th17 profile

Th17 cells could appear as good candidates. Indeed, exacerbated Th17 cell response has been observed in AIH [56] and Th17 cells from AIH patients have been described to be refractory to immunosuppression stimulus and turnover, as described above. Moreover, IL-17 produced by Th17 CD4 T cells has been

involved in the antigen-specific immunization mouse models of AIH. However, in patients, there has been no evidence that autoreactive CD4 T cells produced IL-17 and the recruitment of IL-17<sup>+</sup> cells to the liver did not seem to be specific of AIH but rather the consequence of chronic liver inflammation [57] (Fig. 1c).

### The Th1-pro-inflammatory signature

The analysis of cytokines produced by liver infiltrating CD4 T cells has revealed an increase of TNF and IFN- $\gamma$  producing cells in AIH [48<sup>■</sup>,58,59]. This has been clearly demonstrated by Bovensiepen *et al.* [48<sup>■</sup>] who observed an accumulation of TNF-producing and IFN- $\gamma$ -producing, but not IL-17-producing CD4 T cells both in the blood and in the liver of AIH patients. These results are consistent with the capacity of SLA-specific CD4 T cells in AIH to produce IFN- $\gamma$  and TNF but not IL-17.

### The Tfh CD4 cells

One major characteristic of AIH is the accumulation of autoantibodies that normally results from a CD4 T-cell-dependent immunoglobulin class switch. The follicular helper CD4 T-cell population (Tfh, CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>) has been described as the major subset that supports B-cell differentiation, in a IL-21-dependent manner, both in normal adaptive immunity and autoimmunity [60–62]. It has been shown that AIH patients' blood and liver are enriched in Tfh cells and have less follicular regulatory T (Tfr) cells (in the blood), the latter inhibiting B-cell-mediated antibody production [63–66]. This imbalance between Tfh and Tfr cell frequencies could cause the hypergammaglobulinemia and autoantibody production detected in AIH, by enhancing the Tfh-mediated antibody production by B cells through IL-21 production. However, at this time, self-antigen reactivity of Tfh cells in AIH has not been demonstrated yet.

### Pro-inflammatory/pro-B helper profile

Recently, we have identified a specific CD4<sup>+</sup> T-cell phenotypic signature, CD45RA<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD127<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> that correlated with disease activity in AIH patients and persisted during remission [49<sup>■</sup>]. These cells had a B-helper function, supporting B-cell differentiation through IL-21 production, and a pro-inflammatory signature (IFN- $\gamma$ ). This PD-1<sup>+</sup>CXCR5<sup>-</sup> CD4 T-cell population represented the main reservoir of SLA-specific TCR; it was significantly increased in the blood of AIH patients and was more frequent than

the PD-1<sup>+</sup> Tfh cell population. CD4 T cells expressing PD-1 but not CXCR5, with the capacity to support B-cell differentiation through IL-21, have also recently been observed in other autoimmune disorders and named 'peripheral helper' CD4 T cells (Tph) [67–71]. The fact that autoreactive CD4 T cells produced IFN- $\gamma$ , TNF and IL-21 (SLA-specific CD4 T cells) supports the idea that this pro-inflammatory/pro-B helper profile (Tph-like) could be involved both in liver inflammation and autoantibodies accumulation.

## CONCLUSION

In conclusion, evidence has been provided for the pathogenic role of the adaptive immune response (autoantibodies and CD4 T cells) in AIH, which is amplified by defective regulatory mechanisms. AIH triggering event in the form of a hepatic inflammation induced by a viral infection, associated with a molecular mimicry event, for example, could lead to the differentiation of naïve autoreactive CD4 T cells into a pro-inflammatory memory population, with a predominant secretion of TNF, IFN- $\gamma$  and IL-21 (Fig. 1a and b). At this level, different triggers between AIH-1 and AIH-2 could lead to different cytokine profiles of autoreactive CD4 T cells. The implication of autoreactive Th17 cells remains to be demonstrated, although the IL-17 pathway seems to be involved in the hepatic damage, and Th17 cells are probably recruited into the liver after inflammation (Fig. 1c). CD4 Treg cells are massively recruited into the inflamed liver but they are unable to control inflammation (Fig. 1c). Environmental factors linked to AHR and estrogen receptor (ER $\alpha$ ) signalling have a potential role in the defective regulatory mechanisms, including both the lack of acquisition of suppressive capacity and the resistance to immunoregulatory signalling (Fig. 1d).

### Acknowledgements

None.

### Financial support and sponsorship

*This work was supported by institutional grants from INSERM and Nantes Université to the Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie. This work is supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-19-CE17-0024-01). It was carried out in the context of the IHU-Cesti project (ANR-10-IBHU-005) and of the LabEX IGO program (ANR-11-LABX-0016-01). The IHU-Cesti project was also supported by Nantes Métropole and the Région Pays de la Loire. This work was also supported by the patient association ALBI (Association pour la lutte contre les maladies inflammatoires du foie*

*et des voies biliaires*), by AFEF-Société Française d'Hépatologie, and by SNFGE-Société Française de Gastro-Entérologie.

### Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

## REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Rigopoulou EI, Zachou K, Gatselis N, *et al.* Autoimmune hepatitis in patients with chronic HBV and HCV infections: patterns of clinical characteristics, disease progression and outcome. *Ann Hepatol* 2013; 13:127–135.
2. Herkel J, Carambia A, Lohse AW. Autoimmune hepatitis: possible triggers, potential treatments. *J Hepatol* 2020; 73:446–448.
3. Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, *et al.* Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 51:2193–2213.
4. Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2010; 34:7–14.
5. van Gerven NMF, de Boer YS, Zwiars A, *et al.* HLA-DRB1\*03:01 and HLA-DRB1\*04:01 modify the presentation and outcome in autoimmune hepatitis type-1. *Genes Immun* 2015; 16:247–252.
6. de Boer YS, van Gerven NMF, Zwiars A, *et al.*, Dutch Autoimmune Hepatitis Study Group, LifeLines Cohort Study, Study of Health in Pomerania. Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology* 2014; 147:443.e5–452.e5.
7. Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, *et al.* Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4:18017.
8. Taubert R, Hupa-Breier KL, Jaeckel E, Manns MP. Novel therapeutic targets in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2018; 95:34–46.
9. Mattner J. Natural killer T (NKT) cells in autoimmune hepatitis. *Curr Opin Immunol* 2013; 25:697–703.
10. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver—from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 13:88–110.
11. Doherty DG. Immunity, tolerance and autoimmunity in the liver: a comprehensive review. *J Autoimmun* 2016; 66:60–75.
12. Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cell heterogeneity and function in autoimmunity and cancer. *Immunity* 2019; 50:302–316.
13. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4<sup>+</sup> T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30:899–911.
14. Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, *et al.* Effect of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 25:63–71.
15. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, *et al.* Functional study of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176:4484–4491.
16. Ferri S, Longhi MS, De Molo C, *et al.* A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010; 52:999–1007.
17. Liberal R, Grant CR, Holder BS, *et al.* In autoimmune hepatitis type 1 or the autoimmune hepatitis-sclerosing cholangitis variant defective regulatory T-cell responsiveness to IL-2 results in low IL-10 production and impaired suppression. *Hepatology* 2015; 62:863–875.
18. Grant CR, Liberal R, Holder BS, *et al.* Dysfunctional CD39(POS) regulatory T cells and aberrant control of T-helper type 17 cells in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2014; 59:1007–1015.
19. Peiseler M, Sebode M, Franke B, *et al.* FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012; 57:125–132.
20. Renand A, Habes S, Mosnier J-F, *et al.* Immune alterations in patients with type 1 autoimmune hepatitis persist upon standard immunosuppressive treatment. *Hepatol Commun* 2018; 2:968–981.
21. Oo YH, Ackrill S, Cole R, *et al.* Liver homing of clinical grade Tregs after therapeutic infusion in patients with autoimmune hepatitis. *JHEP Rep* 2019; 1:286–296.  
Expanded autologous Treg cells from AIH patients are functional and have the capacity to migrate to the inflamed liver. Authors show evidence of possible use of Treg cells infusion to treat AIH.
22. Taubert R, Hardtke-Wolenski M, Noyan F, *et al.* Intrahepatic regulatory T cells in autoimmune hepatitis are associated with treatment response and depleted with current therapies. *J Hepatol* 2014; 61:1106–1114.
23. Diestelhorst J, Junge N, Schlue J, *et al.* Pediatric autoimmune hepatitis shows a disproportionate decline of regulatory T cells in the liver and of IL-2 in the blood of patients undergoing therapy. *PLoS One* 2017; 12:e0181107.
24. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, *et al.* Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol* 2010; 184:2886–2898.
25. Oo YH, Adams DH. Regulatory T cells and autoimmune hepatitis: what happens in the liver stays in the liver. *J Hepatol* 2014; 61:973–975.
26. Liberal R, Grant CR, Holder BS, *et al.* The impaired immune regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway. *Hepatology* 2012; 56:677–686.
27. Longhi MS, Liberal R, Holder B, *et al.* Inhibition of interleukin-17 promotes differentiation of CD25<sup>+</sup> cells into stable T regulatory cells in patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2012; 142:1526.e6–1535.e6.
28. Liberal R, Grant CR, Yuksel M, *et al.* Regulatory T-cell conditioning endows activated effector T cells with suppressor function in autoimmune hepatitis/autoimmune sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2017; 66:1570–1584.
29. Vuerich M, Harshe R, Frank LA, *et al.* Altered aryl-hydrocarbon-receptor signalling affects regulatory and effector cell immunity in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2020–doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.044. [Online ahead of print].  
Defective regulatory mechanisms in AIH are multifaceted. Authors propose a new concept of exogenous factors that can influence regulatory mechanisms in AIH.
30. Lapiere P, Hajoui O, Homberg JC, Alvarez F. Forminotransferase cyclo-daminase is an organ-specific autoantigen recognized by sera of patients with autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 1999; 116:643–649.
31. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: a clinical-practice approach. *Eur J Intern Med* 2018; 48:35–43.
32. Stefanini GF, Meliconi R, Miglio F, *et al.* Lymphocytotoxicity against autologous hepatocytes and membrane-bound IgG in viral and autoimmune chronic active hepatitis. *Liver* 1983; 3:36–45.
33. Vergani D, Mieli-Vergani G, Mondelli M, *et al.* Immunoglobulin on the surface of isolated hepatocytes is associated with antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and liver damage. *Liver* 1987; 7:307–315.
34. Lapiere P, Djilali-Saiah I, Vitozzi S, Alvarez F. A murine model of type 2 autoimmune hepatitis: xenoinmunization with human antigens. *Hepatology* 2004; 39:1066–1074.
35. Hardtke-Wolenski M, Fischer K, Noyan F, *et al.* Genetic predisposition and environmental danger signals initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4<sup>+</sup> T cells. *Hepatology* 2013; 58:718–728.
36. Holdener M, Hintermann E, Bayer M, *et al.* Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome P450 2D6 by virus infection. *J Exp Med* 2008; 205:1409–1422.
37. Ehser J, Holdener M, Christen S, *et al.* Molecular mimicry rather than identity breaks T-cell tolerance in the CYP2D6 mouse model for human autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2013; 42:39–49.
38. Mo R, Feng X-X, Wu Y-N, *et al.* Hepatocytes paradoxically affect intrahepatic IFN- $\alpha$  production in autoimmune hepatitis due to Gal-9 expression and TLR2/4 ligand release. *Mol Immunol* 2020; 123:106–115.
39. Chi G, Feng X-X, Ru Y-X, *et al.* TLR2/4 ligand-amplified liver inflammation promotes initiation of autoimmune hepatitis due to sustained IL-6/IL-12/IL-4/IL-25 expression. *Mol Immunol* 2018; 99:171–181.
40. Gueguen M, Yamamoto AM, Bernard O, Alvarez F. Antiliver-kidney microsome antibody type 1 recognizes human cytochrome P450 db1. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:542–547.
41. Kerker N, Choudhuri K, Ma Y, *et al.* Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003; 170:1481–1489.
42. Ma Y, Bogdanos DP, Hussain MJ, *et al.* Polyclonal T-cell responses to cytochrome P450IID6 are associated with disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Gastroenterology* 2006; 130:868–882.
43. Longhi MS, Hussain MJ, Bogdanos DP, *et al.* Cytochrome P450IID6-specific CD8 T cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2. *Hepatology* 2007; 46:472–484.
44. Löhr HF, Schlaak JF, Lohse AW, *et al.* Autoreactive CD4<sup>+</sup> LKM-specific and anticolonotypic T-cell responses in LKM-1 antibody-positive autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996; 24:1416–1421.
45. Kirstein MM, Metzler F, Geiger E, *et al.* Prediction of short- and long-term outcome in patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2015; 62:1524–1535.
46. Mix H, Weiler-Normann C, Thimme R, *et al.* Identification of CD4 T-cell epitopes in soluble liver antigen/liver pancreas autoantigen in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology* 2008; 135:2107–2118.
47. Zhao Y, Zhang Y, Liu Y, *et al.* Identification of T cell epitopes on soluble liver antigen in Chinese patients with auto-immune hepatitis. *Liver Int* 2011; 31:721–729.
48. Bovensiepen CS, Schakat M, Sebode M, *et al.* TNF-producing Th1 cells are selectively expanded in liver infiltrates of patients with autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2019; 203:3148–3156.  
Pathogenic CD4 T-cell infiltrating the inflamed liver and reacting to the SLA autoantigen have a pro-inflammatory Th1 but not Th17 profile.

49. Renand A, Cervera-Marzal I, Gil L, *et al.* Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2020; 73:1379–1390.
- First transcriptomic analysis of auto-reactive CD4 T cells in AIH, which lead to the delineation of a potential pathogenic Tph-like CD4 cell population in AIH.
50. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol* 2018; 18:153–167.
51. Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 2017; 276:112–120.
52. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol* 2017; 17:233–247.
53. Song G, Feng T, Zhao R, *et al.* CD109 regulates the inflammatory response and is required for the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2019; 78:1632–1641.
54. Rigopoulou EI, Roggenbuck D, Smyk DS, *et al.* Asialoglycoprotein receptor (ASGPR) as target autoantigen in liver autoimmunity: lost and found. *Autoimmun Rev* 2012; 12:260–269.
55. Löhr H, Treichel U, Poralla T, *et al.* The human hepatic asialoglycoprotein receptor is a target antigen for liver-infiltrating T cells in autoimmune chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1990; 12:1314–1320.
56. Zhao L, Tang Y, You Z, *et al.* Interleukin-17 contributes to the pathogenesis of autoimmune hepatitis through inducing hepatic interleukin-6 expression. *PLoS ONE* 2011; 6:e18909.
57. Oo YH, Banz V, Kavanagh D, *et al.* CXCR3-dependent recruitment and CCR6-mediated positioning of Th-17 cells in the inflamed liver. *J Hepatol* 2012; 57:1044–1051.
58. Löhr HF, Schlaak JF, Gerken G, *et al.* Phenotypical analysis and cytokine release of liver-infiltrating and peripheral blood T lymphocytes from patients with chronic hepatitis of different etiology. *Liver* 1994; 14:161–166.
59. Cheriňavsky AC, Paladino N, Rubio AE, *et al.* Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Hum Immunol* 2004; 65:683–691.
60. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:185–189.
61. Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 2009; 30:324–335.
62. Kenefeck R, Wang CJ, Kapadi T, *et al.* Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes. *J Clin Invest* 2015; 125:292–303.
63. Liang M, Liwen Z, Juan D, *et al.* Dysregulated TFR and TFH cells correlate with B-cell differentiation and antibody production in autoimmune hepatitis. *J Cell Mol Med* 2020; 24:3948–3957.
64. Kimura N, Yamagiwa S, Sugano T, *et al.* Possible involvement of chemokine C-C receptor 7-programmed cell death-1+ follicular helper T-cell subset in the pathogenesis of autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2018; 33:298–306.
65. Abe K, Takahashi A, Imaizumi H, *et al.* Interleukin-21 plays a critical role in the pathogenesis and severity of type I autoimmune hepatitis. *Springerplus* 2016; 5:777.
66. Ma L, Qin J, Ji H, *et al.* Tfh and plasma cells are correlated with hypergammaglobulinaemia in patients with autoimmune hepatitis. *Liver Int* 2014; 34:405–415.
67. Bochamikov AV, Keegan J, Wacleche VS, *et al.* PD-1hiCXCR5- T peripheral helper cells promote B cell responses in lupus via MAF and IL-21. *JCI Insight* 2019; 4:.
68. Rao DA, Gurish MF, Marshall JL, *et al.* Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 2017; 542:110–114.
69. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, *et al.* Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* 2019; 20:928–942.
70. Christophersen A, Lund EG, Snir O, *et al.* Distinct phenotype of CD4+ T cells driving celiac disease identified in multiple autoimmune conditions. *Nat Med* 2019; 25:734–737.
71. Caielli S, Veiga DT, Balasubramanian P, *et al.* A CD4+ T cell population expanded in lupus blood provides B cell help through interleukin-10 and succinate. *Nat Med* 2019; 25:75–81.

# 1                    **Preclinical model for the study of immune responses** 2                    **specific for a hepatic self-antigen**

3  
4                    Anaïs Cardon<sup>1</sup>, Jean-Paul Judor<sup>1</sup>, Thomas Guinebretière<sup>1</sup>, Richard Danger<sup>1</sup>,  
5                    Arnaud Nicot<sup>1</sup>, Sophie Brouard<sup>1</sup>, Sophie Conchon<sup>1†</sup> and Amédée Renand<sup>1†\*</sup>  
6

7                    <sup>1</sup> Nantes Université, INSERM, CHU Nantes, Center for Research in Transplantation and  
8                    Translational Immunology, UMR 1064, ITUN5, F-44000 Nantes,

9                    <sup>†</sup> Equal contribution

10                    \* Corresponding author : Dr Amédée Renand, INSERM UMR1064 – Center for Research in  
11                    Transplantation and Translational Immunology, CHU Nantes – Hôtel Dieu, 30 boulevard Jean  
12                    Monnet, 44093, Nantes Cedex 01, France. Phone: (+33)240087410. E-mail address:  
13                    [amedee.renand@univ-nantes.fr](mailto:amedee.renand@univ-nantes.fr)  
14  
15

## 16                    **Abstract :**

17                    The liver displays a strong capacity to induce tolerance toward hepatic antigens. However,  
18                    hepatic tolerance can be overcome with the development of local autoimmune diseases such  
19                    as autoimmune hepatitis (AIH). This chronic inflammatory disorder leads to a progressive  
20                    destruction of liver parenchyma if non-treated. Although the CD4<sup>+</sup> T cell response seems a key  
21                    player of this immune disorder, the dynamics and biology of emerging liver antigen-specific  
22                    CD4<sup>+</sup> T cells are poorly described. Here, we developed a new murine model which mimics  
23                    hepatic autoreactivity allowing the study and monitoring of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells from  
24                    their emergence to local immune response. We show that the induction of the expression of  
25                    an antigen in the liver in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance. In inflammatory  
26                    condition, using viral vector transduction, we observe the development of a complete adaptive  
27                    immune response concomitant with the antigen expression in the liver. The presence of  
28                    antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver is associated to transient hepatic damages.  
29                    Interestingly, the neo-antigen expression by hepatocytes after peripheral immunisation  
30                    induces the recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells and hepatic damages. These data  
31                    demonstrate that the recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver is conditioned by  
32                    an immune coordination between surface antigen expression by hepatocytes and peripheral  
33                    immune response and mimics the first step of a local autoreactive process. In the long-term,

34 we observe that the hepatic environment has the capacity to control the local, but not the  
35 systemic, antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. Additional immune events might be involved in the  
36 long-term chronic immune reactivity in the liver, following the first steps described in this study.

37

38

39 **Keywords :**

40 Autoimmune hepatitis, autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells, liver, tolerance

41

42

43 **Key points :**

- 44 • Antigen expression in the liver in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance
- 45 • Antigen expression in the liver in immunization condition (concomitant or pre-existing)
- 46 is sufficient to induce liver recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells and hepatic
- 47 damages
- 48 • This model mimics the first step of an autoreactive process against a liver antigen
- 49 • In the long-term, the hepatic environment induces a local tolerance toward the antigen
- 50 expression and the clearance of liver-infiltrating, but not peripheral, antigen-specific
- 51 CD4<sup>+</sup> T cells
- 52 • This new murine model can be of interest for the analysis of the immunomodulatory
- 53 pathways implicated in liver tolerization of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells and identification
- 54 of potential extrinsic factors implicated in an acute-to-chronic transition as observed
- 55 during autoimmune hepatitis

## 56 Introduction

57

58 The liver displays strong tolerogenic properties mediated by both parenchymal hepatocytes  
59 and non-parenchymal cells (NPCs). These cells, particularly liver sinusoidal endothelial cells,  
60 Kupffer cells and hepatocytes, are able to act as antigen presenting cells to promote activation  
61 of T cells<sup>1</sup>. In normal condition, this activation leads to an anergic phenotype<sup>2,3</sup>, differentiation  
62 into regulatory T cells (Tregs)<sup>4,5</sup> or even apoptosis<sup>6,7</sup>.

63 However, the robust liver capacity to induce tolerance can be overcome leading to the  
64 development of autoimmunity. Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disorder  
65 causing a progressive destruction of liver parenchyma<sup>8</sup>. It is a rare worldwide disease with a  
66 prevalence of 16.9 per 100,000 in Europe and North America and an incidence of 0.1 to 1.9  
67 per 100,000 per year<sup>9</sup>. This pathology is characterized by the presence of autoantibodies,  
68 elevated immunoglobulin G (IgG) level in the sera of patients, and a typical histological feature  
69 in the liver, the interface hepatitis. This important lymphocytic infiltration in the liver is  
70 composed mainly of CD4<sup>+</sup> T cells but also of CD8<sup>+</sup> T cells and B cells<sup>8</sup>. AIH is divided into two  
71 types, depending on autoantibodies present in patients' blood : type 1 AIH (anti-nuclear  
72 antibodies, anti-smooth muscle antibodies and anti-soluble liver antigen – SLA – antibodies)  
73 and type 2 AIH (anti-liver kidney microsomal type 1 – LKM-1 – antibodies and anti-liver cytosol  
74 – LC-1 – antibodies). AIH is a multifactorial disease associating genetic predispositions,  
75 affecting genes coding for class II molecules of the major histocompatibility complex (MHC-II),  
76 and environmental factors, such as drug exposure and molecular mimicry<sup>8</sup>. Patients are  
77 treated with immunosuppressive drugs (prednisolone associated or not with azathioprine) but  
78 struggle to reach long-term remission<sup>10,11</sup>.

79 Preponderance of CD4<sup>+</sup> T cells in the hepatic infiltrate, genetic predisposition affecting  
80 genes coding for MHC-II molecules, involved in antigen presentation to CD4<sup>+</sup> T cells, and  
81 accumulation of autoantibodies, generated after interaction between B cells and CD4<sup>+</sup> T cells,  
82 point toward a major role of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in the immunopathogenesis of AIH. Data  
83 obtained in AIH patients show an enrichment of pro-inflammatory CD4<sup>+</sup> T cells in liver and  
84 blood and defective regulatory mechanisms<sup>8,12</sup>. Particularly, frequencies of pro-inflammatory  
85 Th1 and Th17 cells and their related cytokines (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17) are increased in  
86 patients<sup>13–15</sup>. Whether patients present quantitative and/or qualitative CD4<sup>+</sup> Tregs defects is

87 still debated<sup>15-18</sup>. Recently, our team observed that, despite immunosuppressive treatment,  
88 AIH patients display a persistent immune dysregulation in their blood with a residual CD4<sup>+</sup> T  
89 cell infiltrate in the liver<sup>12</sup>. By tracking SepSecs-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients with anti-SLA  
90 antibodies, we identified and provided a deep characterization of a unique autoreactive CD4<sup>+</sup>  
91 T cell population with a pro-inflammatory/B-helper profile (PD-1<sup>+</sup> CXCR5<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>  
92 IL-21<sup>+</sup>). This subset is enriched in the blood of AIH patients independently of the presence of  
93 the anti-SLA antibodies<sup>19</sup>, and it represents the major reservoir of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in  
94 patients. Therefore, the tracking of these cells associated to the analysis of the mechanisms  
95 involved in their emergence could provide new therapeutical target for AIH treatment.

96 As diagnosis generally occurs quite late after disease onset, and because AIH is a chronic  
97 disease with long-term evolution, the study of the early events implicated in the autoreactive  
98 CD4<sup>+</sup> T cells generation cannot be performed in patients, thus murine models represent  
99 valuable tools for this purpose. Murine models of AIH, based on immunisation using viral  
100 vectors encoding for human CYP2D6 or FTCD proteins<sup>20,21</sup>, have underlined the importance  
101 of molecular mimicry and genetic susceptibility for the development of murine AIH. However,  
102 emergence and biology of antigen-specific autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells involved in the first steps  
103 of the adaptive immune response against an autoantigen expressed in the liver have not been  
104 studied. In this study, we propose a new murine model which mimics hepatic autoreactivity. In  
105 this model, we can induce hepatic expression of a model antigen, hemagglutinin (HA), in  
106 different conditions and follow the emergence of antigen-specific responses, especially  
107 antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.

108 **Methods**

109

110 **Viral vectors**

111 Adenoviral CAG Cre vectors (Ad Cre) were produced with a vector plasmid containing the  
112 Cre recombinase coding sequence inserted behind the CAG promoter and followed by a  
113 poly-A signal. Control adenoviral CMV GFP vector (Ad Ct) consisted of the GFP coding  
114 sequence inserted between the CMV promoter and a poly-A signal.

115 Ad Cre and Ad Ct productions were performed by the INSERM UMR 1089 Centre de  
116 Production de Vecteurs (Nantes, France).

117

118 **Mice**

119 Heterozygous TTR-Cre inducible mice ( $Cre^{ind/+}$ )<sup>22</sup> were back-crossed on a Balb/c  
120 background for at least 10 generations (TAAM, CDTA CNRS Orléans). They were cross-bred  
121 with homozygous Rosa26 HA floxed mice ( $HA^{fl}$ )<sup>23</sup> resulting in  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$   
122 mice. Male and female eight to twelve-week-old mice were used for each experiment. All mice  
123 were housed at the UTE IRS-UN animal facilities (Nantes, France) where they were fed *ad*  
124 *libitum* and allowed continuous access to tap water. Procedures were approved by the regional  
125 ethical committee for animal care and use and by the Ministère de l'enseignement supérieur  
126 et de la recherche (agreements APAFIS #2054 and #28582). All experiments were performed  
127 in accordance with relevant guidelines and regulations.

128 For the induction of HA expression in hepatocytes in non-inflammatory condition, normal  
129 diet of  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice (control) and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice were substituted by tamoxifen dry food  
130 (0.5g/kg tamoxifen + 5% saccharose; Safe, France) for 14 days in free access.

131 For the induction of HA expression in hepatocytes in inflammatory condition,  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$   
132 mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice were injected intravenously with  $3 \times 10^9$  ip (infectious particle) per  
133 mice of the Ad Cre vector or of the Ad Ct vector for the control group.

134 For the peripheral immunization against HA, mice  $HA^{fl}/Cre^{ind-}$  mice and  $HA^{fl}/Cre^{ind+}$  mice  
135 were injected intramuscularly with  $1.5 \times 10^9$  ip per mice of the Ad Cre vector or of the Ad Ct  
136 vector for the control group.

137

138

139 **Genotyping**

140 Small tail biopsies were taken from 3 week-old mice to perform Cre genotyping. Briefly,  
141 samples were digested overnight at 56°C in 100µL of TNT-PK buffer (TNT : Tris HCl pH 8.5  
142 50mM ; NaCl 100mM ; Tween 20 0.5% / proteinase K 0.2mg/mL). PK were inactivated at 95°C  
143 during 15min. 60ng of DNA was used for PCR mix reaction prepared according to the  
144 manufacturer protocol (Herculase II Fusion DNA Polymerase, Agilent). The following Cre  
145 primers were used to carry out the PCR amplification: forward primer  
146 5'-CCTGGAAAATGCTTCTGTCCG-3', reverse primer 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3'.  
147 Amplification program was run on a Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems; Foster City,  
148 USA) and consist of 1 cycle at 95°C for 2min, 35 cycles of 95°C for 20sec, 60°C for 20sec and  
149 72°C for 30sec, followed by 1 cycle at 72°C for 3min. Finally, PCR products are visualized on  
150 Caliper LabChip (PerkinElmer).

151

152 **RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR**

153 Total RNA was extracted from organ tissue using TRIzol™ reagent (ThermoFisher Scientific  
154 #15596026) and purified with the QiagenRNeasy Mini Kit (Qiagen #74106) according to the  
155 manufacturer's protocol.

156 Reverse transcription was performed using 2µg of total RNA mixing with poly-dT24  
157 20µg/mL (Eurofins Genomics), DTT 8mM (ThermoFisher Scientific #18057018) and dNTP  
158 20mM (ThermoFisher Scientific #10297018) and incubated at 70°C during 10min followed by  
159 4°C for 5min. Then, first strand buffer 1X (ThermoFisher Scientific #18057018), M-MLV  
160 reverse transcriptase 200U (ThermoFisher Scientific #18057018) and RNase OUT inhibitor  
161 40U (ThermoFisher Scientific #10777019) were added and incubated at 37°C for 1h, followed  
162 by 15min at 70°C.

163 Real-time RT-PCR was performed using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System and Power  
164 SYBR™ Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific #4368708). Primers for HA (forward  
165 5'-AAACTCTTCGCGGTCTTTCCA-3'; reverse 5'-GATAAGGTAGCTTGGGCTGC-3') and  
166 β-actine (forward 5'-TACCACAGGCATTGTGATGG-3'; reverse  
167 5'-AATAGTGATGACCTGGCCGT-3') were used for detection. Relative gene expressions  
168 were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

169

170 **Western blot**

171 Total proteins were extracted from liver samples via RIPA buffer treatment. 25µg of protein  
172 were denatured at 95°C for 5min in Laemmli Sample Buffer (BIORAD #1610747) with DTT  
173 0.1M. Preparation was separated by SDS-PAGE on Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels  
174 (BIORAD #4561036) in migration buffer (Tris base 15g/l, glycine 72g/l, SDS 10g/l) and  
175 transferred onto a PVDF membrane with the Trans-Blot Turbo Transfer System (BIORAD).  
176 The membrane was blocked using a blocking solution (TBS; Tween 20 0.1%; skim milk 5%)  
177 for 2h then incubated with primary antibodies (1:5000) overnight : anti-HA antibody (rabbit  
178 polyclonal antibody; Sinobiological #11684-T62) and anti-β-actin antibody (mouse monoclonal  
179 antibody; Cell Signaling #3700). The membrane was washed with TBS – Tween 20 0.1%.  
180 HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG (H+L) (1:5000; Cliniscience #E-AB-1080-120) and  
181 HRP-conjugated goat anti-mouse IgG + IgM (H+L) (1:10000; Jackson ImmunoResearch  
182 #115-036-068) were used to detect rabbit and mouse antibodies respectively during 1h.  
183 Secondary antibodies were detected using electrochemiluminescence super signal West Pico  
184 (ThermoFisher Scientific #34577) according to the manufacturer instructions. Imaging and  
185 analysis of western blots were performed on the ChemiDoc MP Imaging System (BIORAD).

186

187 **Cell preparation**

188 Splenocytes were isolated by a mechanical dissociation of spleen in red blood cell lysis  
189 buffer (NH<sub>4</sub>Cl 155mM; KHCO<sub>3</sub> 10mM; EDTA 1mM; Tris 17mM per 1L of sterilized water) before  
190 centrifugation.

191 Liver non-parenchymal cells (NPCs) were isolated as previously described<sup>24</sup>. Briefly, after  
192 perfusion with HBSS 1X buffer (ThermoFisher Scientific #14175129), livers were digested with  
193 collagenase IV (Sigma-Aldrich #C5138) and NPCs enriched by Percoll (Sigma-Aldrich #GE17-  
194 0891-01) density gradient centrifugation and red blood cells lysis.

195

196 **Tetramer enrichment and staining**

197 20.10<sup>6</sup> splenocytes and 3.10<sup>6</sup> NPCs were stained with both I-A<sup>d</sup>-HA peptide  
198 (HNTNGVTAACSHE) and I-E<sup>d</sup>-HA peptide (SFERFEIFPKE) PE-labelled tetramers (NIH  
199 Tetramer Core Facility; Atlanta, USA) at room temperature during 1h. Then, cells were washed  
200 using PBE buffer (PBS 1X; BSA 0.1%; EDTA 2mM) and stained with magnetic anti-PE

201 microbeads (Miltenyi #130-048-801) at 4°C during 15min. Cells were washed and enriched  
202 using magnetic MS columns (Miltenyi #130-042-201). A viability staining was then performed  
203 on the positive fraction containing tetramer-enriched cells by incubating cells with 100µL of  
204 LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain kit (ThermoFisher Scientific #L34957) for 15min  
205 at 4°C, protected from light. Cells were washed and an extracellular staining were performed  
206 using 100µL of fluorescent antibodies for 20min at 4°C, protected from light. For FoxP3  
207 intracellular staining, cells were next permeabilized and fixed for 30min according to the  
208 eBioscience™ Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific  
209 #00-5523-00). Fluorescent antibodies targeting the FoxP3 marker were diluted in the  
210 permeabilization buffer and incubated with the fixed cells for 1h, protected from light.

211 The following antibodies were used to perform an extracellular staining: CD4/PerCP-Cy5.5  
212 (clone RM4-5; BD #550954), CD44/APC (clone IM7; BD #559250), PD-1/BV421 (clone J43;  
213 BD #562584), CD25/PE-Cy7 (clone PC61; BD #552880) and CD19/BV510 (clone ID3;  
214 BD #562956). For the intracellular staining, the FoxP3/AF488 (clone FJK16S, eBioscience  
215 #53-5773-82) antibody was used. HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells were defined as : LIVE/DEAD<sup>-</sup>  
216 CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> tetramers<sup>+</sup> cells.

217 For cell phenotyping, fluorescence was measured with a BD FACS Canto II (BD  
218 Biosciences; Mountain View, USA). FlowJo software was used to analyze data after  
219 eliminating doublets and viability<sup>+</sup> dead cells.

220

## 221 **ELISA test**

222 For the detection of anti-HA antibodies, wells were coated with HA protein 1µg/mL (Sino  
223 Biological #11684-V08H) diluted in coating buffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.05M; NaHCO<sub>3</sub> 0.05M; pH 9.2)  
224 and incubated at 4°C overnight. Wells were then washed with washing buffer (PBS 1X; Tween  
225 20 0.05%; in distilled water) and saturated with dilution buffer (PBS 1X; Tween 20 0.05%; BSA  
226 1%; in distilled water) for 2h at 37°C. After washing, diluted sera samples (1:500) were added  
227 and incubated at 37°C during 2h. Wells were washed and diluted peroxidase goat anti-mouse  
228 IgG+IgM (H+L) detection antibody (1:2000; Jackson ImmunoResearch #115-036-068) was  
229 added before incubating at 37°C for 1h. Finally, wells were incubated with TMB Substrate  
230 Reagent (BD #555214) and reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5M. The absorbance at 450nm  
231 was determined using a Spark® 10M Infinite M200 Pro plate reader (TECAN).

232 **Transaminase dosage and histology**

233 Dosage of plasma levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine  
234 aminotransferase (ALT) was performed by the Centre Hospitalier Universitaire of Nantes  
235 (France).

236 Histological analyses were performed on paraformaldehyde (PFA)-fixed/paraffin-embedded  
237 liver samples. Liver lobes were fixed in PFA 4% for 24h at room temperature. Samples were  
238 then dehydrated in absolute ethanol then cleared in isopropanol and finally included paraffin.  
239 Paraffin-embedded sections (3 $\mu$ m) were stained with hematoxylin-phloxine-saffron (HPS).  
240 Paraffin-embedding and HPS staining were performed by the IBISA MicroPICell facility  
241 (Biogenouest; Nantes, France). Slides were observed using NanoZoomer (HAMAMATSU) and  
242 NDP Scan software.

243

244 **Statistical analysis**

245 Prism (GraphPad version 6.01 Software, Inc.) was used for statistical analyses. Group  
246 comparison analyses were assessed using non-parametric Kruskal-Wallis tests or one-way  
247 ANOVA statistical test. p values < 0.05 were considered statistically significant between two  
248 groups (\* = p < 0.05, \*\* = p < 0.01, \*\*\* = p < 0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001).

249 **Results**

250

251 **Concomitant inflammation and antigen expression in the liver induce a local**  
252 **recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with increased hepatic damages.**

253 In order to analyse the dynamics of the emergence of liver antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells,  
254 we used a liver-restricted HA expression model and tracked HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells with  
255 specific MHC class II tetramers.

256 We developed two strategies of induction of the expression of the HA antigen in the liver,  
257 based on the Cre/LoxP system. Homozygous Rosa26 HA floxed (HA<sup>fl</sup>) mice were crossed with  
258 heterozygous TTR-Cre inducible (Cre<sup>ind</sup>) mice, expressing an inducible Cre recombinase under  
259 the control of the hepatocyte-specific promotor (transthyretin, TTR). Both strains were on  
260 Balb/c (H-2<sup>d</sup>) background. The feeding of the HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> offspring with tamoxifen-mixed dry  
261 food leads to the expression of HA at the surface of the hepatocytes under non-inflammatory  
262 condition. The second strategy consists in the intravenous (i.v.) injection to all offspring  
263 (HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup>) of an adenoviral vector encoding for the Cre recombinase  
264 (Ad Cre), which transduces preferentially hepatocytes due to its strong hepatic tropism. This  
265 results in the expression of HA at the surface of hepatocytes under inflammatory condition,  
266 bypassing the endogenous expression of the inducible Cre in mice. As control, a peripheral  
267 model of immunization by intramuscular (i.m.) injection of Ad Cre which only induces local HA  
268 expression in the muscle was used (Figure 1A).

269 After two weeks, the HA expression restricted to the liver can be detected both in tamoxifen-  
270 fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice and in Ad Cre i.v.-injected HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (termed as  
271 HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice) (Figure 1B, Supplementary figure 1, Supplementary figure 2). Expression of  
272 HA in Ad Cre i.m. mice was restricted to the muscle. In control tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice  
273 and Ad Ct i.v. or i.m. groups, no expression of HA was observed in the liver and in any other  
274 organs (Figure 1B, Supplementary figure 1, Supplementary figure 2).

275 As expected, when mice are immunized by i.m. injection of Ad Cre, the induction of HA  
276 expression in the muscle in this inflammatory condition leads to the generation of a HA-specific  
277 humoral response, as demonstrated by the presence of anti-HA IgG and IgM (81.65 ±  
278 5.72 arbitrary units, a.u.) (Figure 1C, Supplementary figure 2). Interestingly, in Ad Cre i.v. mice,  
279 the hepatic expression of HA under inflammatory condition leads to a comparable HA-specific

280 humoral response ( $89.00 \pm 4.95$  a.u.). On the contrary, tamoxifen fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice did not  
281 develop humoral HA-specific response, despite hepatic expression of HA. No anti-HA specific  
282 antibodies were detected in control mice (tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice and Ad Ct i.v. or i.m.  
283 mice) (Figure 1C, Supplementary figure 2).

284 The HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell response was tracked with MHC class II tetramer loaded with  
285 HA peptides. HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells were detected neither in the spleen nor in the liver of  
286 tamoxifen-fed HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (Figure 1D). However, HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were  
287 detected in the spleen of both Ad Cre i.m. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells:  $6.33 \pm 4.27$ ) and Ad  
288 Cre i.v. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells:  $21.77 \pm 14.68$ ), while none were detected in their  
289 respective control (Ad Ct) (Figure 1D, Supplementary figure 2). Liver HA-specific CD4<sup>+</sup>  
290 CD44<sup>high</sup> T cells were detected only in Ad Cre i.v. mice (frequency per 10<sup>6</sup> cells:  $23.50 \pm 28.38$ )  
291 (Figure 1D, Supplementary figure 2). This data demonstrates that our model allows the  
292 generation of a complete adaptive immune response against a liver antigen under  
293 inflammatory condition with local recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.

294 However, the liver has strong tolerogenic properties, which have been shown to involve the  
295 induction of regulatory T cells. To understand if our model induces the generation/expansion  
296 of regulatory CD4 T cells or of pro-inflammatory CD4 T cells, we performed a comparison of  
297 the immune phenotype of the HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells isolated from Ad Cre i.v. vs  
298 Ad Cre i.m. mice. This analysis revealed that these HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells are CD25<sup>-</sup> FoxP3<sup>-</sup>  
299 in both groups, but that those from Ad Cre i.v. mice contain a higher proportion of PD-1<sup>+</sup>  
300 (CD279) cells (spleen:  $88.98 \pm 13.41\%$ ; liver:  $81.11 \pm 28.29\%$ ) than those isolated from Ad Cre  
301 i.m. mice (spleen:  $41.12 \pm 22.21\%$ ) (Figure 1E, Supplementary figure 3). PD-1<sup>+</sup> cells were  
302 enriched in HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells compared to total memory CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells from the  
303 same condition (Supplementary figure 4). This PD-1 up-regulation, rather the Foxp3  
304 expression, could reflect a high antigen reactivity and suggest the emergence of pro-  
305 inflammatory CD4 T cells.

306 Plasma levels of aminotransferases (AST/ALT) were used to monitor liver damage. In  
307 tamoxifen-fed mice and Ad Ct/Ad Cre i.m. groups, AST/ALT levels remained stable for 14 days  
308 and histological analysis of the liver did not show any sign of lymphocytic infiltration (Figure  
309 1F). When adenoviral vectors (Cre or Ct) are injected intravenously, plasma AST/ALT levels  
310 were increased, with a peak after 7 days reflecting liver inflammation due to viral infection

311 (Figure 1F). Interestingly, the histological analysis of the liver showed that portal infiltrations  
312 and liver damages were more severe in the liver of Ad Cre i.v. mice than in Ad Ct i.v. mice.  
313 Liver of Ad Cre i.v. mice showed many events of hepatocyte necrosis and a necroinflammatory  
314 activity (Figure 1F). Therefore, although the adenoviral vector itself induces a hepatic  
315 inflammation, the presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD4<sup>high</sup> T cells associated with HA expression  
316 in the liver of Ad Cre i.v. mice could explain the exacerbated liver damages compared to Ad  
317 Ct i.v. mice.

318 Thus, the induction of the hepatic expression of the antigen HA in association with a  
319 concomitant adenoviral-mediated hepatic inflammation leads to the development of an  
320 antigen-specific response, marked by the generation of anti-HA antibodies and HA-specific  
321 CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells in the spleen and the liver. The presence of HA-specific CD4<sup>+</sup>  
322 CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells in the liver is associated with increased hepatic inflammation and liver  
323 damages, which could be explained by an immune attack against the HA-expressing  
324 hepatocytes, mimicking the early events of an autoreactive response.

325

### 326 **Antigen expression in the liver post-peripheral immunization leads to intra-hepatic** 327 **recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells**

328 HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells are observed in the liver of mice only after Ad Cre i.v. injection,  
329 but, it was not clear if these cells are generated within the liver or recruited from the periphery.  
330 We hypothesized that peripherally activated HA-specific memory T cells could be recruited to  
331 the liver following local HA expression and mediate local damages. For this, we analysed the  
332 consequences of a tamoxifen-induced hepatic expression of the antigen HA in peripherally  
333 pre-immunized mice. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice were immunized by a single i.m.  
334 injection of Ad Cre. After 14 days, mice were fed with tamoxifen dry food for 14 days (Figure  
335 2A).

336 As expected, tamoxifen induced HA expression only in the liver of HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (Figure  
337 2B). HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were detected in spleen of all groups of mice at similar  
338 frequencies (per 10<sup>6</sup> cells: 8.75 ± 2.63 in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice; 8.50 ± 7.18 in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice),  
339 which confirms that all mice were indeed pre-immunized (Figure 2C). Tamoxifen induction of  
340 HA hepatic expression only in HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice leads to a massive hepatic infiltration of HA-  
341 specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells in 50% of these mice (per 10<sup>6</sup> cells: 89.67 ± 131.10 in liver-

342 infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, vs  $4.83 \pm 3.66$  in non-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice and  $4.50 \pm 1.73$  in  
343 HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice) (Figure 2C). In the infiltrated liver of HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, HA-specific CD4<sup>+</sup>  
344 CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells were enriched compared to their splenic counterpart (spleen:  $18.06 \pm$   
345  $13.11\%$ ; liver:  $62.13 \pm 23.49\%$ ) (Figure 2D), while frequency of splenic and hepatic total  
346 memory CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> PD-1<sup>+</sup> T cells were still low (Supplementary figure 5). A hepatitis was  
347 associated with this antigen-specific immune response in liver-infiltrated HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice, as  
348 shown by the increase in AST/ALT levels after HA hepatic expression induction (Figure 2E)  
349 and a residual diffuse infiltrate in the liver at the end of experiment (Supplementary figure 6).  
350 The humoral response, as measured by serum levels of anti HA IgG/IgM was comparable in  
351 mice of all groups at the end of the experiment. However, it is noteworthy that the mice that  
352 developed hepatitis associated with presence of liver HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells after tamoxifen  
353 diet are those in which the pre-immunisation had led to the weakest humoral immune response  
354 (HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice:  $92.25 \pm 12.87$  a.u. in non-infiltrated;  $61.60 \pm 22.32$  a.u. in liver-infiltrated)  
355 (Figure 2F).

356 Thus, the expression of an antigen in the liver under pre-immunization condition is a factor  
357 to induce a local HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells recruitment associated to hepatitis, explaining the  
358 presence of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the liver after i.v. Ad Cre infection as shown in  
359 Figure 1. These data also suggest that a weak pre-immunisation may be necessary to induce  
360 this local recruitment.

361

### 362 **Hepatic antigen expression induced by an adenovirus leads to a long-term peripheral** 363 **antigen-specific response but local liver tolerance**

364 In the first part of this work, we studied the first event involved in the generation and  
365 recruitment of HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell in the liver. However, liver autoimmunity is a long-term  
366 chronic disease in human. Thus, HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice received either a unique i.v. injection of Ad  
367 Cre or of Ad Ct and were monitored for 24 weeks (Figure 3A).

368 24 weeks after i.v. injection of Ad Cre, expression of HA was still detectable in the liver  
369 (Figure 3B). Rapidly the hepatic damages are controlled in our mouse models. The peak of  
370 AST/ALT transaminases plasma levels observed at 1 week decreased to return to a basal level  
371 after 8 weeks (Ad Ct i.v.:  $124.96 \pm 71.69$  UI/L; Ad Cre i.v.:  $133,23 \pm 83,66$  UI/L) (data not  
372 shown). Likewise, liver infiltration and damages in Ad Cre i.v. mice decreased and were

373 resolved after 4 weeks (Figure 3C). This is also associated with a decrease of HA-specific  
374 CD4<sup>+</sup> T cells in the liver which suggest a local clearance over time (Figure 3E).

375 Interestingly, the global peripheral HA-specific adaptive immune response was only mildly  
376 impacted by the persistent HA expression in the liver. Anti-HA IgG and IgM were still detectable  
377 24 weeks after injection, with a plateau reached after 8 weeks (Figure 3D). HA-specific CD4<sup>+</sup>  
378 CD44<sup>high</sup> T cells in Ad Cre i.v. mice were still detectable in the spleen at 24 weeks (Figure 3E).  
379 Long-lasting HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells were still CD25<sup>-</sup> PD-1<sup>+</sup>, although frequency of  
380 PD-1<sup>+</sup> cells decreased 2 weeks after Ad Cre injection (Figure 3F, Supplementary figure 7,  
381 Supplementary figure 8).

382 These data demonstrate a local HA-tolerance over time, but a limited impact on the  
383 peripheral pool of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. The persistence of a peripheral pool of reactive  
384 CD4<sup>+</sup> T cells could be involved in the chronic inflammatory events with the implication of other  
385 additional immune events.

386

## 387 Discussion

388 In this study, we report that the induction of the expression of a model antigen by  
389 hepatocytes in non-inflammatory condition leads to antigen tolerance. The addition of an  
390 inflammatory cue, with an adenoviral vector, is sufficient to overcome immune tolerance and  
391 provoke hepatic local antigen reactivity. This leads to the generation of antigen-specific CD4<sup>+</sup>  
392 T cells in the spleen and in the liver and is associated with mild liver damages which mimics a  
393 possible first step of local autoreactivity.

394 The different murine models of type 2 AIH directly target autoantigen expression in the liver  
395 using i.v. injection of an adenoviral vector encoding human FTCD or human CYP2D6. This  
396 leads to induction of an autoreactive response characterized by an antibody production and  
397 an hepatitis mediated by Th1 and Th17 cells<sup>20,21</sup>. While these models directly target the  
398 autoantigen via a mechanism of molecular mimicry, they lack in depth characterization of the  
399 antigen-specific T cell responses. Here, using an indirect antigen induction method  
400 (Ad Cre leading to HA expression), first we demonstrate that the expression of a neo-antigen  
401 in the liver in an immune-enhanced environment caused by an adenoviral vector is sufficient  
402 to generate an antigen-specific response, and second this response is marked by the  
403 generation of specific antibodies and antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen and in the  
404 liver. As for FTCD and CYP2D6 murine models, the presence of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells  
405 in the antigen-expressing liver in our model is associated with hepatic inflammation and hepatic  
406 damages, suggesting the initiation of an autoreactive response. This confirms that our murine  
407 models are accurate tools to further study the early events implicated in the generation of  
408 autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells in AIH.

409 Using two different models of induction of hepatic antigen expression, we show that antigen  
410 expression in the liver, either concomitant to a local inflammation cue (Ad Cre i.v.) or following  
411 a peripheral immunization (Ad Cre i.m. + Tamoxifen), mediates the hepatic recruitment of  
412 antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells. This raises the question of the first site of the immune reactivity  
413 against the antigen in AIH, either within the liver or peripherally. The previous studies using  
414 AIH mouse models did not allow to conclude on this point. In our model, we observed a weak  
415 HA expression in the spleen after Ad Cre i.v. injection which could be the source of a peripheral  
416 immunisation. Thus, a concomitant antigen expression in the liver with the hepatic

417 inflammation could explain the local accumulation and expansion of CD4<sup>+</sup> T cells after  
418 peripheral generation.

419 Despite autoreactive response development, the HA-specific CD4<sup>+</sup> T cell infiltrate in the  
420 liver disappears over time concurrently to hepatitis resolution, demonstrating a control of the  
421 autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell population in the liver allowing a long-term tolerance of antigen  
422 expression. However, the humoral response and frequency of peripheral antigen-specific CD4<sup>+</sup>  
423 T cells are not affected in our model, despite the persistent expression of the HA antigen in the  
424 liver. These data suggest the HA specific immune response is only controlled locally and that  
425 additional immune events may be required within the liver to trigger a chronic hepatitis in this  
426 model.

427 To conclude, autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells are central to the immunopathogenesis of AIH.  
428 These are recruited in the liver following hepatic antigen exposure and mediate hepatic  
429 damages. In mice, a local control of this cellular autoreactive response rapidly emerges  
430 allowing a long-term tolerance of antigen expression, without chronic hepatitis. However, a  
431 pool of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cell persists in the spleen and could represent an active precursor  
432 of a chronic hepatitis. This murine model can be presented as an interesting pre-clinical model  
433 for the analysis of immunomodulatory molecules and pathways implicated in the local control  
434 of autoreactive CD4<sup>+</sup> T cells. The identification of potential extrinsic factors implicated in an  
435 acute-to-chronic transition could provide a better understanding of AIH initiation mechanisms  
436 and unveil new therapeutical targets to dampen immunopathogenesis of autoreactive CD4<sup>+</sup> T  
437 cells in the liver of patients.

438 **Abbreviations**

439 AIH: autoimmune hepatitis; ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase;  
440 CYP2D6 : cytochrome P450 2D6; FTCD: Formiminotransferase cyclodeaminase; HA:  
441 hemagglutinin; IgG: immunoglobulin G; i.m.: intramuscular; i.v.: intravenous; LC-1 : liver  
442 cytosol 1; LKM-1 : liver kidney microsomal type 1; MHC(-II): (class II) major histocompatibility  
443 complex; NPCs: non-parenchymal cells; SLA : soluble liver antigen; Tregs: regulatory T cells;  
444 TTR : transthyretin

445

446 **Acknowledgments**

447 We are grateful to Pr. Liblau and Dr M Vasseur-Cognet for sharing the Rosa26 HA floxed and  
448 the TTR-Cre inducible mice strains.

449 We thank the NIH Tetramer Core Facility (contract number 75N93020D00005) for providing  
450 the class II HA-specific tetramers.

451 We wish to thank the UTE IRS-UN animal facility of the SFR Santé François Bonamy (Nantes  
452 Université, INSERM UAR016, CNRS UAR3556).

453 We acknowledge the IBISA MicroPICell facility (Biogenouest), member of the national  
454 infrastructure France-Bioimaging supported by the French national research agency (ANR-10-  
455 INBS-04).

456

457 **Fundings**

458 This work was supported by institutional grants from INSERM and Nantes Université to the  
459 Center for Research in Transplantation and Translational Immunology (CR2TI). This work was  
460 funded by the “Ministère de l’Enseignement supérieur, de la Recherche et de l’Innovation” and  
461 was supported by the “Fondation pour la Recherche Médicale” (grant number  
462 FDT202106013211) to Anaïs Cardon. It has been also carried out thanks to the support of the  
463 LabEx IGO project (n° ANR-11-LABX-0016-01) funded by the “Investissements d’Avenir”  
464 French Government program, managed by the French National Research Agency (ANR). This  
465 work was also supported by the patient association “Association pour la lutte contre les  
466 maladies inflammatoires du foie et des voies biliaires” (ALBI) and by “Association Française  
467 pour l’Étude du Foie-Société Française d’Hépatologie” (AFEF).

468 **Conflicts of interest**

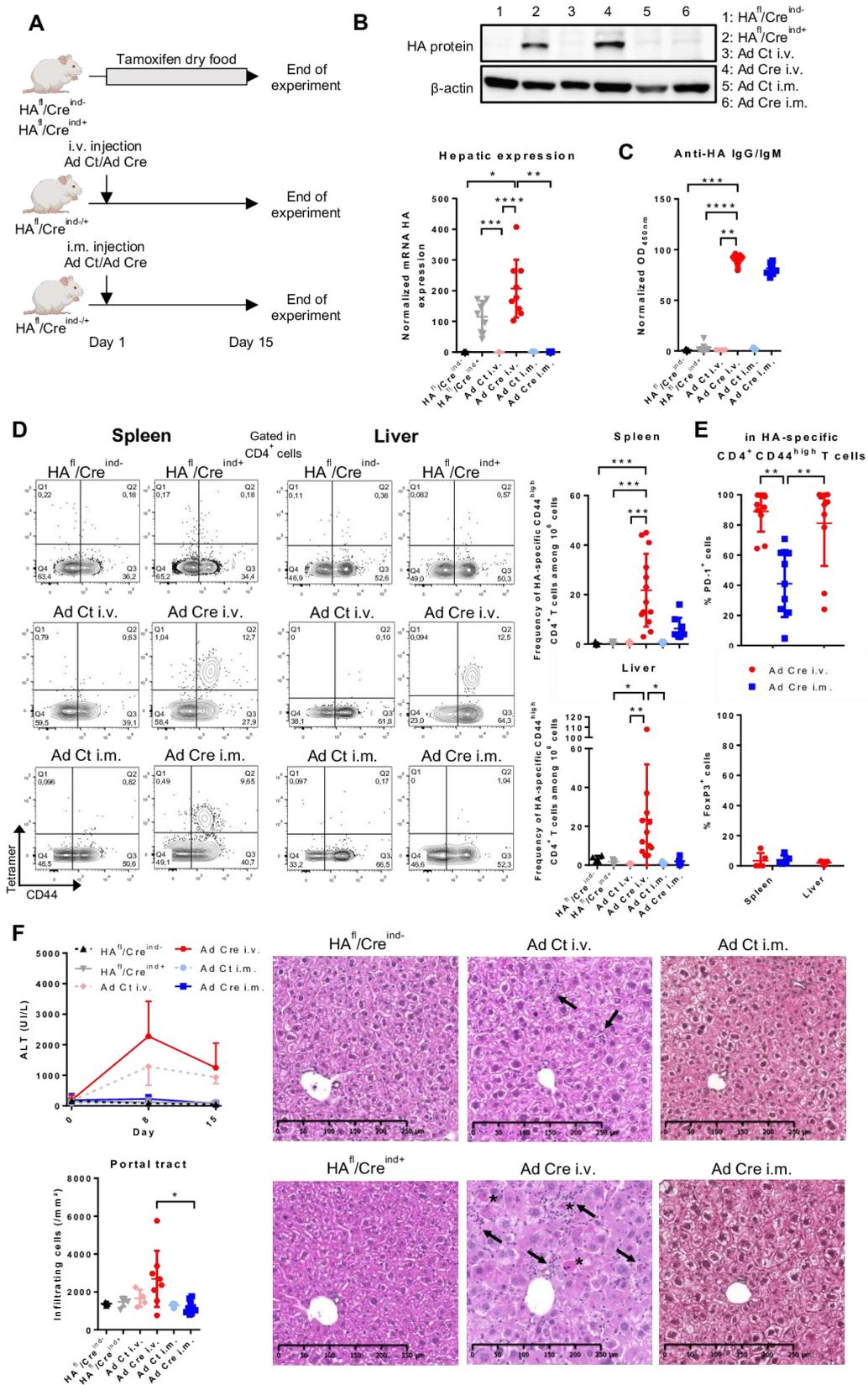
469 Authors declare no conflicts of interest.

470

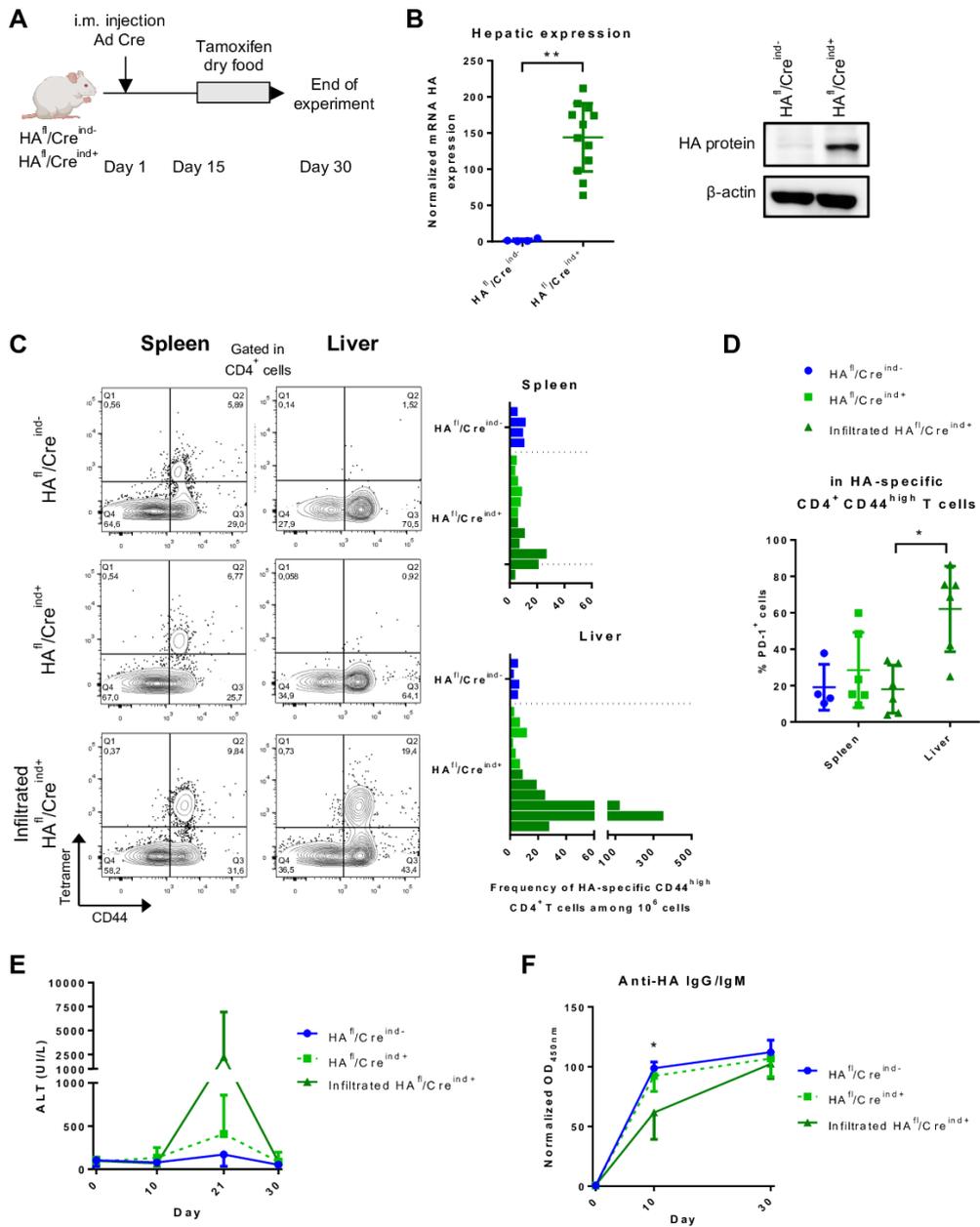
471 **References**

- 472 1. Kubes, P. & Jenne, C. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 247–277  
473 (2018).
- 474 2. Bénéchet, A. P. *et al.* Dynamics and genomic landscape of CD8+ T cells undergoing  
475 hepatic priming. *Nature* 574, 200–205 (2019).
- 476 3. Wherry, E. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., van der Most, R. & Ahmed, R. Viral  
477 Persistence Alters CD8 T-Cell Immunodominance and Tissue Distribution and Results in  
478 Distinct Stages of Functional Impairment. *J. Virol.* 77, 4911–4927 (2003).
- 479 4. Carambia, A. *et al.* TGF- $\beta$ -dependent induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by liver  
480 sinusoidal endothelial cells. *J. Hepatol.* 61, 594–599 (2014).
- 481 5. Heymann, F. *et al.* Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by  
482 Kupffer cells. *Hepatol. Baltim. Md* 62, 279–291 (2015).
- 483 6. Holz, L. E. *et al.* Intrahepatic murine CD8 T-cell activation associates with a distinct  
484 phenotype leading to Bim-dependent death. *Gastroenterology* 135, 989–997 (2008).
- 485 7. Benseler, V. *et al.* Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc.*  
486 *Natl. Acad. Sci.* 108, 16735–16740 (2011).
- 487 8. Cardon, A., Conchon, S. & Renand, A. Mechanisms of autoimmune hepatitis. *Curr. Opin.*  
488 *Gastroenterol.* 37, 79–85 (2021).
- 489 9. Sahebjam, F. & Vierling, J. M. Autoimmune hepatitis. *Front. Med.* 9, 187–219 (2015).
- 490 10. Manns, M. P. *et al.* Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51,  
491 2193–2213 (2010).
- 492 11. Francque, S., Vonghia, L., Ramon, A. & Michielsen, P. Epidemiology and treatment of  
493 autoimmune hepatitis. *Hepatic Med. Evid. Res.* 4, 1–10 (2012).
- 494 12. Renand, A. *et al.* Immune Alterations in Patients With Type 1 Autoimmune Hepatitis Persist  
495 Upon Standard Immunosuppressive Treatment. *Hepatol. Commun.* 2, 968–981 (2018).
- 496 13. Behfarjam, F., Nasser-Moghadam, S. & Jadali, Z. Enhanced Th17 Responses in Patients  
497 with Autoimmune Hepatitis. *Middle East J. Dig. Dis.* 11, 98–103 (2019).
- 498 14. Bovensiepen, C. S. *et al.* TNF-Producing Th1 Cells Are Selectively Expanded in Liver  
499 Infiltrates of Patients with Autoimmune Hepatitis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 203, 3148–  
500 3156 (2019).
- 501 15. Liang, M., Liwen, Z., Yun, Z., Yanbo, D. & Jianping, C. The Imbalance between  
502 Foxp3<sup>+</sup>Tregs and Th1/Th17/Th22 Cells in Patients with Newly Diagnosed Autoimmune  
503 Hepatitis. *Journal of Immunology Research* vol. 2018 e3753081  
504 <https://www.hindawi.com/journals/jir/2018/3753081/> (2018).

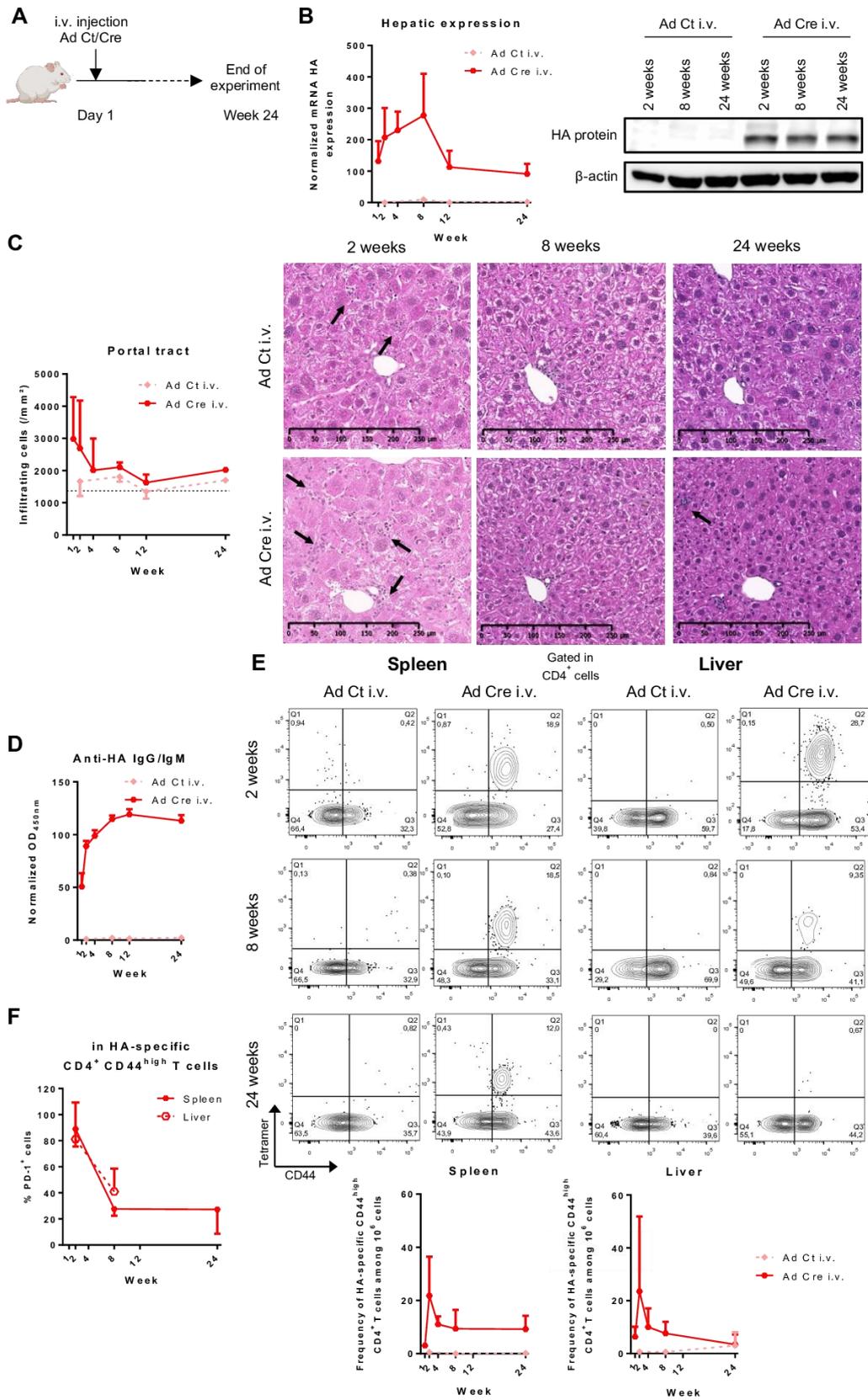
- 505 16. Longhi, M. S. *et al.* Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver  
506 disease. *J. Hepatol.* 41, 31–37 (2004).
- 507 17. Oo, Y. H. *et al.* Liver homing of clinical grade Tregs after therapeutic infusion in patients  
508 with autoimmune hepatitis. *JHEP Rep. Innov. Hepatol.* 1, 286–296 (2019).
- 509 18. Peiseler, M. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional  
510 and not reduced in frequency. *J. Hepatol.* 57, 125–132 (2012).
- 511 19. Renand, A. *et al.* Integrative molecular profiling of autoreactive CD4 T cells in autoimmune  
512 hepatitis. *J. Hepatol.* 73, 1379–1390 (2020).
- 513 20. Hardtke-Wolenski, M. *et al.* Genetic predisposition and environmental danger signals  
514 initiate chronic autoimmune hepatitis driven by CD4+ T cells. *Hepatol. Baltim. Md* 58, 718–  
515 728 (2013).
- 516 21. Holdener, M. *et al.* Breaking tolerance to the natural human liver autoantigen cytochrome  
517 P450 2D6 by virus infection. *J. Exp. Med.* 205, 1409–1422 (2008).
- 518 22. Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A. & Vasseur-Cognet, M. A tamoxifen-  
519 inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver.  
520 *Hepatol. Baltim. Md* 35, 1072–1081 (2002).
- 521 23. Saxena, A. *et al.* Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T  
522 cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950  
523 181, 1617–1621 (2008).
- 524 24. Le Guen, V. *et al.* Alloantigen gene transfer to hepatocytes promotes tolerance to  
525 pancreatic islet graft by inducing CD8(+) regulatory T cells. *J. Hepatol.* 66, 765–777 (2017).
- 526



**Figure 1 : Antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell response is modulated not only by the localisation of antigen expression but also by the environment.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 5) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 9) are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg) for 14 days. HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice receive a single i.v. injection (3.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 7) or Ad Cre (n = 13). HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-/+</sup> mice receive a single i.m. injection (1,5.10<sup>9</sup> ip) of Ad Ct (n = 3) or Ad Cre (n = 9). Mice are sacrificed at day 15. (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression.  $\beta$ -actine was used as loading control. (C) At the end of experiment, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. (D) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, FoxP3, CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated among 10<sup>6</sup> total cells. (E) Percentage of PD-1<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. (F) Plasma samples were collected before the start of the experiment and at day 8 and day 15 for dosage of ALT. At the end of the experiment, paraffin-embedded liver sections are stained with HPS coloration to analyse liver infiltration (count of infiltrating cells around portal tracts) and morphology (x10 ; arrows point lymphocytic infiltration ; stars point necroinflammatory activities). All results are normalized and represent the mean (+ SD). p values were calculated using non-parametric Kruskal-Wallis test, \* = p <0.05, \*\* = p <0.01, \*\*\* = p <0.001, \*\*\*\* = p < 0.0001.



**Figure 2 : Induction of antigen expression in the liver of pre-immunized mice leads to intra-hepatic recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind-</sup> mice (n = 4) and HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice (n = 12) receive a single i.m. injection of Ad Cre (1,5.10<sup>9</sup> ip). From day 15 to day 30, mice are fed with tamoxifen dry food (0,5g/kg). Mice are sacrificed at day 30. (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression.  $\beta$ -actine was used as loading control. (C) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25, CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated among 10<sup>6</sup> total cells (grey and black bars respectively represent HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind+</sup> mice without or with antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells infiltration in the liver). (D) Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. (E) Plasma samples were collected before the start of the experiment and at days 10, 21 and 30 for dosage of ALT. (F) Before the start of experiment, at day 10 and at the end of experiment, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. All results are normalized and represent the mean (+ SD). p values were calculated using non-parametric Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA, ns = no significance, \* = p <0.05, \*\* = p <0.01.



**Figure 3 : Induction of an antigen expression in the liver with concomitant inflammation using an adenoviral vector induces a chronic antigen-specific response.** (A) HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice receive a single i.v. injection ( $3 \cdot 10^9$  ip) of Ad Ct or Ad Cre. Mice are sacrificed at week 1 (Ad Cre n = 3), 2 (Ad Ct n = 7 ; Ad Cre n = 13), 4 (Ad Cre n = 3), 8 (Ad Ct n = 8 ; Ad Cre n = 12), 12 (Ad Ct n = 3 ; Ad Cre n = 6) and 24 (Ad Ct n = 5 ; Ad Cre n = 9). (B) Quantitative RT-PCR analysis of HA mRNA expression in liver samples. Total protein from liver samples were incubated on western blot membranes with anti-HA antibodies to detect HA protein expression.  $\beta$ -actine was used as loading control. (C) For each time point, paraffin-embedded liver sections are stained with HPS coloration to analyse liver infiltration (count of infiltrating cells around portal tracts ; dotted line represent a basal infiltration in a naïve HA<sup>fl</sup>/Cre<sup>ind/+</sup> mice) and morphology ( $\times 10$  ; arrows point lymphocytic infiltration). (D) For each time point, sera were diluted and assayed for anti-HA IgG and IgM. (E) Total splenocytes and liver NPCs are stained with a MHC class II tetramer loaded with HA peptide before a tetramer enrichment step. Cells are stained (Live/Dead Aqua, CD4, CD44, PD-1, CD25 CD19) and analysed by flow cytometry. Representative MHC class II/HA peptide tetramer and CD44 co-staining, gated in live CD19<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> cells. Frequency of HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are calculated among  $10^6$  total cells. (F) Percentage of PD-1<sup>+</sup> cells in HA-specific CD4<sup>+</sup> CD44<sup>high</sup> T cells are represented. All results are normalized and represent the mean (+ SD).



**Titre :** Suivi de la réponse immunitaire adaptative spécifique d'un antigène exprimé dans le foie

**Mots clés :** Foie, hépatite auto-immune, tolérance, lymphocytes T auto-réactifs

**Résumé :** Le foie présente des capacités de tolérance particulières. Celles-ci peuvent être altérées et conduire au développement de maladies auto-immunes hépatiques telles que l'hépatite auto-immune (HAI). Cette pathologie inflammatoire chronique conduit à la destruction progressive du parenchyme hépatique. Bien que les lymphocytes T (LT) CD4<sup>+</sup> aient été identifiés comme les acteurs centraux de l'HAI, la biologie et la dynamique d'émergence des LT CD4<sup>+</sup> antigène (ag)-spécifiques auto-réactifs restent encore peu décrites.

Dans ce manuscrit, grâce au développement d'un nouveau modèle murin d'auto-réactivité hépatique permettant l'expression d'un antigène modèle dans le foie dans différentes conditions et à la mise au point de techniques de suivi des réponses humorales et cellulaires (CD4<sup>+</sup> et

CD8<sup>+</sup>) ag-spécifiques associées, nous montrons que l'induction de l'expression d'un néo-antigène dans le foie dans un contexte immunogène concomitant ou préexistant permet le recrutement intra-hépatique de LT CD4<sup>+</sup> ag-spécifiques au profil pro-inflammatoire de type Th1, associés à des dommages hépatiques. Alors que ce modèle reproduit les premières étapes d'une auto-réactivité, l'environnement hépatique est capable de contrôler localement la réponse T CD4<sup>+</sup> ag-spécifique et d'induire une tolérance pérenne.

L'identification des voies impliquées dans le contrôle local de cette réponse pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de rupture de tolérance chez les patients atteints d'HAI.

**Title :** Monitoring of immune adaptive responses specific to a hepatic neo-antigen

**Keywords :** Liver, autoimmune hepatitis, tolerance, autoreactive T cells

**Abstract :** The liver displays a strong capacity to induce tolerance. However, this hepatic tolerance can be overcome and lead to development of local autoimmune diseases such as autoimmune hepatitis. This chronic inflammatory disorder causes a progressive destruction of liver parenchyma. Although the CD4<sup>+</sup> T cell population has been shown to be a central player in its immunopathogenesis, the biology and dynamics of emerging liver antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells is poorly described.

In this manuscript, thanks to the development of a new murine model of hepatic autoreactivity allowing the expression of a model antigen in the liver in different conditions and to the development of monitoring techniques of humoral and cellular (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) antigen-specific

responses, we demonstrate that the induction of neo-antigen expression in the liver in an immunogenic environment, either concomitant or pre-existing, is sufficient to provoke the intra-hepatic recruitment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cells with a Th1 pro-inflammatory profile, associated to hepatic damages. Whilst this model represents the first steps of development of an autoreactive response, the hepatic environment has the capacity to locally control the antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell response and to induce a long-term antigen tolerance.

The identification of immune regulatory pathways implicated in the control of this autoreactive response in the liver could provide a better comprehension of autoimmune hepatitis initiatory mechanisms.