



Bases génétiques des hépatites auto-immunes : impact moléculaire et fonctionnel de variants de la voie mTORC1

Caroline Besnard

► To cite this version:

Caroline Besnard. Bases génétiques des hépatites auto-immunes : impact moléculaire et fonctionnel de variants de la voie mTORC1. Immunologie. Université Paris Cité, 2021. Français. ⟨NNT : 2021UNIP5168⟩. ⟨tel-04592084⟩

HAL Id: tel-04592084

<https://theses.hal.science/tel-04592084v1>

Submitted on 29 May 2024

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.



HAL Authorization

Bases génétiques des hépatites auto-immunes : impact moléculaire et fonctionnel de variants de la voie mTORC1

Par **Caroline Besnard**

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par **Aude Magérus**

Présentée et soutenue publiquement le mardi 12 octobre 2021

Devant un jury composé de :

Dr Svetlana Dokudovskaya, CR, DR, Université Paris Saclay, rapporteur

Pr Isabelle Meyts, PU-PH, Université de Louvain rapporteur

Pr Guillaume Canaud, PU-PH, Université de Paris, examinateur

Pr Emmanuel Jacquemin, PU-PH, Université Paris Saclay, examinateur

Dr Frédéric Rieux-Laucat, DR, Université de Paris, examinateur

Dr Aude Magérus, DR, Université de Paris, directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

RESUME

Bases génétiques des hépatites auto-immunes : impact moléculaire et fonctionnel de variants de la voie mTORC1

Les hépatites auto-immunes sont rares, fluctuantes, évoluant jusqu'à la cirrhose voire le décès. Les mécanismes en jeu sont loin d'être élucidés. mTOR est une kinase majeure des voies métaboliques, surtout au sein du complexe mTORC1. Sa cible canonique est S6K1, phosphorylant S6. Son activité dépend de (i) signaux d'amont, notamment par PI3K, (ii) sa translocation lysosomale par Rag - Regulator (LAMTOR1 à 5), (iii) sa liaison à Rheb retenue par TSC (TSC1 et 2) et (iv) d'autres régulateurs dont AMPK, inhibiteur composé de 3 sous-unités α , β et γ (codée par *PRKAG1*).

Dans ce travail, j'ai établi un lien inédit entre des mutations faux-sens hétérozygotes germinales activatrices de mTORC1 et la physiopathologie des hépatites auto-immunes.

Parmi 22 patients atteints d'hépatite auto-immune, plutôt de début aigu et précoce avec un terrain d'auto-immunité, 8 patients portaient 9 mutations dans 7 gènes : *RRAGC*, *PRKAG1*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *MTOR*, *PIK3R1* et *TSC2*. Les lymphocytes T et B de ces patients présentaient une phosphorylation de S6K1 et de S6 plus élevée par rapport aux autres patients et aux individus sains, que ce soit au repos, après inactivation et après stimulation. La restauration d'une activité normale de mTORC1 sous inhibiteurs de mTOR ouvre de nouvelles perspectives de traitement personnalisé.

Mots-clés : hépatites auto-immunes, mTOR, *RRAGC*, *PRKAG1*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *PIK3R1*, *TSC2*

ABSTRACT

Genetic basis of autoimmune hepatitis: molecular and functional impact of variants of mTORC1 pathway

Autoimmune hepatitis are rare, fluctuating, evolving towards cirrhosis and fatal issue. Pathogenesis remains yet to be elucidated. mTOR is a crucial kinase regulating metabolic pathways, notably within mTORC1 complex. Its canonical target is S6K1, phosphorylating S6. mTORC1 activity depends on (i) upstream signals, including PI3K, (ii) lysosomal translocation by Rag-Regulator (LAMTOR1 to 5), (iii) binding to Rheb, released by TSC (TSC1 and 2) and (iv) other regulators such as AMPK, inhibitor made of 3 subunits α , β et γ (encoded by *PRKAG1*).

In this work, I demonstrated an unprecedented relationship between germline heterozygous missense mutations activating mTORC1 and autoimmune hepatitis pathophysiology.

Among 22 patients presenting autoimmune hepatitis, of rather acute and early onset with autoimmune background, 8 patients carried 9 mutations in 7 genes: *RRAGC*, *PRKAG1*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *MTOR*, *PIK3R1* et *TSC2*. T and B cells from these patients showed higher phosphorylation of S6K1 and S6 compared to other patients and healthy individuals, either at basal state, after inactivation and after stimulation. Restoration of normal mTORC1 activity after mTOR inhibitors incubation pave the way for new exciting personalized treatment perspectives.

Keywords: autoimmune hepatitis, mTOR, *RRAGC*, *PRKAG1*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *PIK3R1*, *TSC2*

REMERCIEMENTS

Ici sont présentés les fruits d'un travail que je n'aurais pu mener de front sans l'aide inestimable de personnes incroyables que je remercie de tout mon cœur.

Je remercie affectueusement ma directrice de thèse Aude Magéus, pour son soutien, technique et émotionnel, sa grande disponibilité, sa bonne humeur et ses nombreux conseils.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur d'équipe Frédéric Rieux-Laucat, pour m'avoir accueillie le premier pour mon master, puis encouragée à poursuivre vers un doctorat sur le thème passionnant de son laboratoire, qui stimule mon intérêt plus que tout autre sujet.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien de la Fondation pour la Recherche Médicale qui m'a permis de m'y consacrer sereinement pendant trois ans, grâce au « Prix Cécile Rozières pour la recherche en immunologie, allergie et affections auto-immunes ».

J'adresse mes remerciements au Docteur Svetlana Dokudovskaya et au Professeur Isabelle Meyts, de l'honneur qu'elles m'ont fait d'avoir accepté avec tant d'enthousiasme d'être rapporteurs de cette thèse ; ainsi qu'au Professeur Guillaume Canaud d'avoir bien voulu être examinateur.

Je remercie particulièrement Professeur Emmanuel Jacquemin, pour m'avoir apporté une aide constante, bienveillante et stimulante, au long de ces trois années. Cette collaboration a été un réel plaisir au cœur de cette thèse.

Je remercie vivement Docteur Sven Kracker pour son intérêt, sa rigueur scientifique, le temps qu'il m'a consacré et les conseils qu'il m'a prodigués.

Merci à Fabienne pour ses compétences inégalables en numération cellulaire, à Marie-Claude pour nos conversations qui me manqueront, à Laure de m'avoir supportée dans les pires et les meilleurs moments depuis le début, à tous les membres de mon équipe qui ont rendu ces trois années hautes en couleur et riches en émotions. Merci à toutes les personnes de l'Institut Imagine que j'ai côtoyé, pour votre gentillesse, votre sourire, votre aide et votre temps.

Merci à Dani, Lucas et Pedro, pour leur amitié inconditionnelle qui me porte. Merci à tous mes amis, Ninon, Noémi, Emilie, Maëlle, mes sœurs et mon frère, de m'avoir permis de m'évader le temps d'une sortie, d'un repas ou d'un coup de téléphone.

Merci à mes parents, pour leur soutien moral et matériel et pour leur confiance.

Enfin, merci Vincent, pour tout.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS

4E-BP1 : *eIF4E Binding Protein family*
ADN : acide désoxyribonucléique
AHAI : anémie hémolytique auto-immune
AI : auto-immune
AIRE : *Autoimmune Regulator*, régulateur auto-immun
ALAT : alanine aminotransférase
ALP : *alkalin phosphatase*
AMP : adénosine monophosphate
AMPK : AMP-dépendante protéine kinase
APC : cellule présentatrice d'antigène
APDS : *Activated PI3K delta syndrome*
APECED : *Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*, polyendocrinopathie auto-immune candidose dystrophie ectodermique
APL: anti-phospholipides
ARM : α -solénoïde/armadillo
ASGPR : récepteur de l'asialoglycoprotéine
AST : alanine aspartate
 α -SMA : *α -smooth muscle actin*
BCA : *Bicinchioninic acid assay*
BCR : *B cell receptor*
BSA : *Bovin serum albumin*
C3 : protéine C3 du système du complément
CADD : *combined annotation dependent depletion*
CBP : cirrhose biliaire primitive
CBS : cystathionine β -synthase
CCL2 : voir MCP-1
CCR2B : voir MCP-1
CD25 : récepteur de l'IL-2
CD62L : récepteur de la sélectine L
CES1 : carboxylestérase 1
CMH : complexe moléculaire d'histocompatibilité
CMV : cytomégalovirus
ConA : concanavalin A
CTGF : *connective tissue growth factor*
CTL : lymphocytes cytotoxiques
CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocytes Antigen-4*
CXCL : *C-X-C motif Chemokine Ligand*
CYP2D6 : isoforme 2D6 de la grande famille enzymatique des cytochromes P450
CYP2C9 : isoforme 2C9 des cytochromes P450
DC : cellules dendritiques
DEPTOR : *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*

DMSO : Diméthylsulfoxyde
DTT : dithiothreitol
EBV : Epstein-Barr virus
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique
ESPGHAN : *European society of pediatric gastro-enterology, hepatology and nutrition*
F : Féminin
Fc : fragment cristallisable (région constante des anticorps et du BCR)
FcR : récepteur Fc
FASLG : ligand de FAS
FAT : domaine d'interaction avec FRAP, ATM et TRAPP
FKBP12 : *12-kDa FK506-binding protein*
FoxP3 : *forkhead box P3*
FRB : *FKBP12-rapamycin binding*
GAD : glutamate acide décarboxylase
GAP : *GTPase activating protein*
GATK : *Genome Analysis Toolkit*
GDP : guanine diphosphate
GGT : gamma-glutamyl transferase
gnomAD : *Genome Aggregation Database*
GTP : guanine triphosphate
GWAS : *Genome-Wide Association Studies*, études d'association à l'échelle du génome
HAI : Hépatite auto-immune
HLA: *Human Leukocyte Antigen*
HEAT : *Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR*
IA-2 : anti-tyrosine phosphatase
IAIHG : *international autoimmune hepatitis group*
ICOS : *inducible T cell co-stimulator*
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IL : interleukine
INGESTEM : infrastructure d'ingénierie des cellules souches pluripotentes et cellules différenciées
IPEX : *Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*, dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, liées à l'X
iPS : *induced pluripotent stem cells*
IRM : imagerie par résonance magnétique
iT_{REG} : T_{REG} induites
KD : *kinase domain*
LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator*
LC : *liver cytosol*
LKM : *liver kidney microsome*
LPS : lipopolysaccharides
LSN : limite supérieure de la normale
LSP : *liver specific membrane lipoprotein*
M : Masculin

M+ : patients porteurs de variants-candidats
M- : patients non porteurs de variants-candidats
MAPK : *mitogen-activated protein kinases*
MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*, ligand du récepteur CCR2 exprimé par les cellules T, les monocytes, les basophiles, les cellules dendritiques immatures et les cellules NK
MIF : *macrophage migration inhibitory factor*
MFI : Médiane d'intensité de fluorescence
mLst8 : *mammalian lethal with Sec13 protein 8*
mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin*
mTORC1 : mTOR complexe 1
MP-1 : *MEK partner-1*
ND : non disponible
NGS : *Next generation sequencing*
NK : *natural killer*
NR : non rapporté précédemment dans la littérature
nT_{REG} : T_{REG} naturelles
PAL : phosphatase alcaline
pANNA : *peripheral antinuclear neutrophil antibodies*
pANCA : *peripheral antinuclear cytoplasmic antibodies*
PBS : *Phosphate-buffered saline*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*, réaction en chaîne de polymérase
PD-1 : *Programmed cell death-1*
PH : *Pleckstrin Homology*, domaine homologue de la pleckstrine
PI3K/PI4K : *Phosphoinositide 3-kinase/Phosphoinositide 4-kinase*
PIK3R1 : *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1*
PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate
PMA : *phorbol myristate acetate*
PolyPhen-2 : *Polymorphism Phenotyping v2*
PRKAG1 : *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1*
PRAS40 : *proline-rich AKT substrate 40 kDa*
PTEN : *Phosphatase and tensin homologue*
PTI : purpura thrombopénique idiopathique
PTPN22 : *Protein tyrosine phosphatase non receptor type 22*
Raptor : *regulatory protein associated with mTOR*
Rheb : *Ras homolog enriched in brain*
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*
RRAGC : *Ras-related GTP binding C*
S6 : protéine ribosomale S6
S6K1 : S6 kinase 1
SEPSECS : Sep(O-phosphoserine)tRNA :Sec(selenocysteine)tRNA synthase
Sift : *sorting intolerant from tolerant*
SH : *Src homology*
SH2B3 : *Src homology 2-B adapter protein 3*

SLA/LP : *soluble liver antigen/ liver pancreas*

SNP : *Single-Nucleotide Polymorphisms*, polymorphismes d'un seul nucléotide

STAT4 : *signal transducer and activator of transcription 4*

TBX21 : *T-box transcription factor 21*

TCR : *T cell receptor*

T_{EFF} : lymphocytes T effecteurs

TGF : *transforming growth factor*, facteur de croissance transformant- β

T_H : lymphocytes T *helper* (auxiliaires)

Tim-3 : *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule 3*

TLR : *Toll-like receptor*

TNF : *tumor necrosis factor*

TNIP1 : *TNFAIP3-interacting protein*

T_{REG} : lymphocytes T régulateurs

TSC : *tuberous sclerosis complex*

V_H : région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines

VHA : virus de l'hépatite A

VHB : virus de l'hépatite B

VHC : virus de l'hépatite C

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

V_L : région variable de la chaîne légère des immunoglobulines

VZV : Varicella Zoster Virus

WT : *wild type*

SOMMAIRE

RESUME	2
ABSTRACT	2
REMERCIEMENTS	3
LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	13
PARTIE 1 : PATHOGENIE DE L'AUTO-IMMUNITE	13
I. <i>Système immunitaire</i>.....	13
a. Immunité innée.....	13
b. Immunité adaptative	17
II. <i>Développement et rupture de la tolérance au soi</i>.....	24
a. Mécanismes de tolérance	24
b. Auto-immunité.....	29
PARTIE 2 : LES HEPATITES AUTO-IMMUNES	34
I. <i>Définition</i>.....	34
a. Histoire	34
b. Epidémiologie	37
c. Eléments de physiopathologie	46
d. Diagnostic	54
e. Prise en charge.....	67
II. <i>Mécanismes en jeu</i>	73
a. Interactions entre le foie et les agents extérieurs	73
b. Interactions entre le foie et le système immunitaire.....	76
c. « Privilège immunitaire » du foie	84
III. <i>Modèles murins d'hépatite auto-immune</i>.....	87
a. Immunisation avec des homogénats hépatiques	87
b. Immunisation avec des antigènes de substitution.....	87
c. Expression transgénique antigène/TCR	88
d. Immunisation avec les cellules dendritiques.....	88
e. Infection virale	89
f. Délétion spécifique d'un gène.....	89
g. Induction avec des antigènes de l'HAI	89
PARTIE 3 : LA VOIE MTORC1 DANS L'IMMUNITE	92
I. <i>La voie mTORC1</i>.....	92
a. Le réseau de signalisation de mTORC1	92
b. La structure de mTORC1	93
c. L'activation de mTORC1 par les Rags et Rheb	96
d. Le contrôle des Rags et de Rheb.....	97
e. La voie PI3K/AKT/mTORC1/p70S6K1/S6rp.....	98
f. La voie AMPK/mTORC1.....	98
g. Inhibiteurs pharmaceutiques de mTORC1	99
II. <i>Effets immunitaires de la voie mTORC1</i>	102
a. Activation immunitaire de la voie mTORC1.....	102
b. Régulation des lymphocytes T.....	103
c. Régulation des lymphocytes B	106
d. Régulation des cellules présentatrices d'antigènes	107
e. Rôle dans la tolérance immunitaire	107
III. <i>Syndromes monogéniques par mutations de la voie mTOR</i>.....	109
a. Déficit immunitaire par hyperactivation de PI3Kδ.....	111

b.	Déficit immunitaire par défaut d'activation de PI3Kδ	114
c.	Déficit immunitaire primaire par déficit en <i>LAMTOR2</i>	115
PARTIE 4 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL		116
METHODES		117
I.	<i>Patients</i>	117
a.	Recrutement des patients	117
b.	Critères d'inclusion	117
c.	Recueil des données	118
d.	Traitement des échantillons sanguins	118
II.	<i>Biologie moléculaire</i>	118
a.	Extraction d'ADN génomique	118
b.	Séquençage complet de l'exome	119
c.	Traitement des données du séquençage complet de l'exome	120
d.	Méthode de séquençage de type Sanger	122
III.	<i>Profil immunitaire</i>	123
a.	Immunophénotypage lymphocytaire	123
b.	Dosage de cytokines plasmatiques	123
c.	Détection d'auto-antigènes plasmatiques	123
IV.	<i>Culture cellulaire</i>	124
a.	Cellules mononucléées circulantes sanguines	124
b.	Lymphoblastes T	124
c.	Lymphoblastes B immortalisés par l'EBV	125
V.	<i>Etudes physiologiques</i>	125
a.	Etude de l'activité de la voie mTORC1	125
b.	Inhibition de la voie mTORC1	126
c.	Stimulation de la voie mTORC1	126
d.	Traitement par inhibiteurs de mTOR	126
VI.	<i>Biochimie</i>	127
a.	Extraction des protéines	127
b.	Quantification des protéines	127
c.	Western-Blot	127
VII.	<i>Statistiques</i>	129
a.	Analyse statistiques simples	129
b.	Tests statistiques	129
RESULTATS		130
PARTIE 1 : DESCRIPTION CLINIQUE DE LA COHORTE D'ETUDE		130
I.	<i>Caractéristiques de la cohorte d'étude</i>	130
a.	Patients inclus	130
b.	Antécédents familiaux d'auto-immunité	130
c.	Pathologies auto-immunes extra-hépatiques associées	131
d.	Présentation initiale au diagnostic	131
e.	Auto-anticorps associés	132
f.	Histologie hépatique	132
g.	Prise en charge thérapeutique	133
h.	Suivi et évolution	133
II.	<i>Description des patients porteurs de variants-candidats</i>	136
a.	Patient A	136
b.	Patient B	137
c.	Patient C	137
d.	Patient D	138
e.	Patient E	139
f.	Patient F	139
g.	Patient G	140

h. Patient H.....	141
PARTIE 2 : VARIANTS-CANDIDATS DE LA VOIE mTORC1	145
I. Patient A : RRAGC.....	150
II. Patient B : PRKAG1	152
III. Patients C et D : LAMTOR1 et LAMTOR3.....	154
IV. Patient E : MTOR	156
V. Patient F : PIK3R1	158
VI. Patients G et H : TSC2	160
PARTIE 3 : PROFIL IMMUNITAIRE DES PATIENTS PORTEURS DE VARIANTS-CANDIDATS	162
I. Immunophénotypage lymphocytaire.....	162
a. Quantification des lymphocytes T	162
b. Marqueurs intra-cellulaires associés à la fonction des lymphocytes T régulateurs	164
II. Cytokines plasmatiques	166
III. Auto-antigènes plasmatiques.....	168
PARTIE 4 : ACTIVITE DE mTORC1 DANS LES CELLULES IMMUNITAIRES	170
I. Hyperactivité de mTORC1 dans les cellules circulantes des patients porteurs de variants.....	172
II. Hyperactivité de mTORC1 dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants	174
a. Hyperactivité de mTORC1 en condition de sevrage.....	175
b. Absence d'hyperactivité de mTORC1 en condition de stimulation par IL-2.....	177
c. Hyperactivité de mTORC1 en condition de stimulation par OKT-3	179
d. Normalisation de l'activité de mTORC1 après traitement par inhibiteurs de mTOR.....	181
III. Hyperactivité de mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur de RagC ^{P87T}	183
a. Hyperactivité de mTORC1	184
b. Baisse de l'hyperactivité de mTORC1 sous inhibiteurs de mTOR.....	186
DISCUSSION	188
PRINCIPAUX RESULTATS	188
PARTIE 1 : CLINIQUE.....	189
I. HAI de type 2 avec auto-immunité individuelle et familiale	189
a. Constitution d'une cohorte homogène.....	189
b. Similitudes de la cohorte avec la littérature.....	189
c. Caractéristiques prédominantes de la cohorte d'étude.....	191
II. La voie mTORC1 dans les maladies auto-immunes.....	194
a. mTORC1 ou le trait d'union entre HAI de type 1 et de type 2 ?.....	194
b. mTORC1, HAI et maladie cœliaque.....	194
c. mTORC1, HAI et cytopénies auto-immunes	195
d. mTORC1, HAI et syndrome des anti-phospholipides	195
e. Similitudes phénotypiques des patients porteurs de variants-candidats avec l'APDS	196
III. Limites et biais.....	197
IV. Eléments déclencheurs supplémentaires ?.....	198
PARTIE 2 : GENETIQUE	199
I. Première description d'une association entre HAI et variants de la voie mTORC1	199
II. Imputabilité des variants-candidats	202
a. Mutations hétérozygotes germinales faux-sens responsables d'auto-immunité	202
b. Rôle des gènes-candidats dans les cancers	203
c. Rôle des gènes-candidats dans les pathologies immunitaires	206
d. Rôle des gènes-candidats dans d'autres pathologies	207
e. Mécanismes putatifs d'hyperactivité de mTORC1	212
III. Preuves expérimentales des mécanismes en jeu ?.....	217
a. Analyses envisageables.....	217
b. Modèles cellulaires.....	217
c. Types cellulaires	218
PARTIE 3 : PROFIL IMMUNITAIRE.....	219
I. Anomalies pro-inflammatoires des patients atteints d'HAI portant des variants-candidats.....	219

a.	Immuno-phénotypage lymphocytaire normal.....	219
b.	Lymphocytes T régulateurs altérés.....	219
c.	Profil cytokinique pro-inflammatoire	220
d.	Auto-antigènes non discriminants.....	220
II.	<i>Hyperactivité de mTORC1 et réponse pro-inflammatoire</i>	221
a.	Rag GTPase et les monocytes.....	221
b.	AMPK et les cytokines.....	221
c.	Ragulator et les phagocytes	221
d.	TSC et les cytokines	222
III.	<i>Limites des analyses immuno-phénotypiques</i>	223
a.	Immuno-phénotypage détaillé par cytométrie de masse	223
b.	Analyse approfondie des lymphocytes T régulateurs	223
c.	Comparaison avec d'autres maladies auto-immunes	223
IV.	<i>Signature spécifique de l'hyperactivité de mTORC1 dans l'auto-immunité ?</i>	225
PARTIE 4 :	ETUDES FONCTIONNELLES	226
I.	<i>Mise en cause directe de variants de la voie mTORC1 dans une réponse immunitaire anormale</i> ...	226
a.	Hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes circulants	226
b.	Activité de mTORC1 résistante au sevrage.....	226
c.	Activité de mTORC1 excessive en réponse aux stimuli	227
II.	<i>Impact fonctionnel de l'hyperactivité de mTORC1 dans les lymphocytes</i>	228
a.	Lymphocytes T CD4 ⁺ et T CD8 ⁺	228
b.	Lymphocytes T _{REG}	229
c.	Lymphocytes B	229
III.	<i>Limites des analyses réalisées</i>	230
IV.	<i>Etudes approfondies des conséquences de l'hyperactivité de mTORC1 ?</i>	231
a.	Etudes de prolifération	231
b.	Etudes d'apoptose.....	231
c.	Etudes de cytotoxicité	231
d.	Etude longitudinale de l'activité de mTORC1	231
e.	Etudes de l'effet d'autres stimuli et d'autres cellules immunitaires	232
PARTIE 5 :	PISTES THERAPEUTIQUES	233
I.	<i>Restauration d'une activité normale de mTORC1 après traitement par inhibiteurs</i>	233
II.	<i>Inhibiteurs spécifiques d'acteurs de la voie mTORC1</i>	234
III.	<i>Limites des résultats obtenus</i>	235
a.	Un unique type cellulaire testé	235
b.	Inhibiteurs « classiques » de mTOR	235
IV.	<i>Un nouveau modèle pour comprendre et traiter l'HAI ?</i>	237
a.	Les cellules souches pluripotentes induites	237
b.	La génération d'hépatocytes dérivés de cellules iPS.....	237
c.	Co-culture des hépatocytes dérivés d'iPS avec des cellules mononucléées circulantes sanguines.....	238
REFERENCES		240
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....		261
ANNEXES.....		263
ANNEXE 1 :	LISTES DE GENES RESPONSABLES DE DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS	263
ANNEXE 2 :	AMORCES POUR SEQUENÇAGE DE TYPE SANGER	266
ANNEXE 3 :	LISTE DES 128 AUTO-ANTIGENES RECHERCHES DANS LE PLASMA.....	267
ANNEXE 4 :	MISE AU POINT DES ETUDES PHYSIOLOGIQUES DE LA VOIE mTORC1	269
ANNEXE 5 :	TAMPONS DE LYSE POUR L'ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE PHOSPHORYLEE S6K1	272
ANNEXE 6 :	MISE AU POINT DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE PHOSPHORYLEE S6K1	273
ANNEXE 7 :	SCORES DIAGNOSTIQUES DES PATIENTS INCLUS DANS LA COHORTE D'ETUDE.....	274
ANNEXE 8 :	IDENTIFICATION OF mTORC1 PATHWAY AS A KEY PLAYER IN THE MAINTENANCE OF SELF-TOLERANCE IN THE LIVER .	279

ANNEXE 9 : PEDIATRIC-ONSET EVANS SYNDROME : HETEROGENEOUS PRESENTATION AND HIGH FREQUENCY OF MONOGENIC DISORDERS INCLUDING LRBA AND CTLA4 MUTATIONS	337

INTRODUCTION

PARTIE 1 : PATHOGENIE DE L'AUTO-IMMUNITE

I. Système immunitaire

Notre corps est exposé en permanence aux micro-organismes présents dans l'environnement. Il est protégé des agents infectieux, de leurs toxines et des dommages qu'ils occasionnent par diverses cellules effectrices et molécules qui, ensemble, constituent le système immunitaire (Figure 1). Celui-ci repose sur la coopération entre l'immunité innée, qui assure une protection continue contre l'invasion des pathogènes, et l'immunité adaptative, qui développe une réponse spécifique et adaptée à l'infection par un pathogène particulier (Murphy, 2018).

a. Immunité innée

i. Barrières anatomiques et chimiques

Les épithéliums qui tapissent les surfaces internes et externes du corps se situent à l'interface avec l'environnement et produisent diverses protéines antimicrobiennes (Murphy, 2018).

ii. Système du complément

Le complément est un ensemble d'environ 30 protéines plasmatiques, produites principalement par le foie, qui peut être activé de 3 façons : la voie des lectines, déclenchée par les récepteurs de reconnaissances de glucides à la surface des pathogènes ; la voie classique, déclenchée directement par la liaison d'anticorps à la surface du pathogène ; et la voie alternative, qui utilise le dépôt spontané du complément C3 sur les surfaces microbiennes et qui sert de boucle d'amplification pour les deux autres voies (Murphy, 2018).

iii. Médiateurs inflammatoires

Lorsque les récepteurs de reconnaissance innée, invariants et en nombre limité, reconnaissent des composants moléculaires propres aux pathogènes ou à leurs dommages cellulaires induits, les cellules immunitaires innées produisent des médiateurs inflammatoires (cytokines, interleukines (IL) et chimiokines) qui assurent une défense directe ou propagent la réaction immunitaire (Brubaker, 2015).

Les chimiokines attirent les cellules porteuses de récepteurs de chimiokines hors de la circulation sanguine vers des régions spécifiques. Le recrutement de cellules immunitaires dans les tissus infectés correspond à l'inflammation et contribue à la destruction du pathogène (Hughes, 2018).

iv. Cellules immunitaires innées

1. Macrophages

Les macrophages proviennent soit (i) de cellules progénitrices qui colonisent les tissus au cours du développement embryonnaire, puis s'auto-renouvellent au cours de la vie de manière stable, soit (ii) de monocytes circulants, qui se distinguent par leur expression de CD14 (Ziegler-Heitbrock, 2007). CCL2 (aussi appelé MCP-1) attire les monocytes porteurs du récepteur CCR2B de la circulation sanguine vers les tissus où ils deviennent des macrophages tissulaires résidents (Paavola, 1998). Ils ont trois grandes fonctions : la phagocytose, la sécrétion de chimiokines et l'élimination des cellules mortes et de leurs débris (Geissmann, 2010).

2. Granulocytes

Lors d'une réponse immunitaire, les granulocytes sont produits en nombre croissant et migrent du sang vers les foyers infectieux ou inflammatoires. Ils se partagent en trois types : les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles. La chimiokine CXCL8 (aussi appelée IL-8) contribue à attirer les neutrophiles dans le foyer infectieux (Russo, 2014).

3. Cellules dendritiques

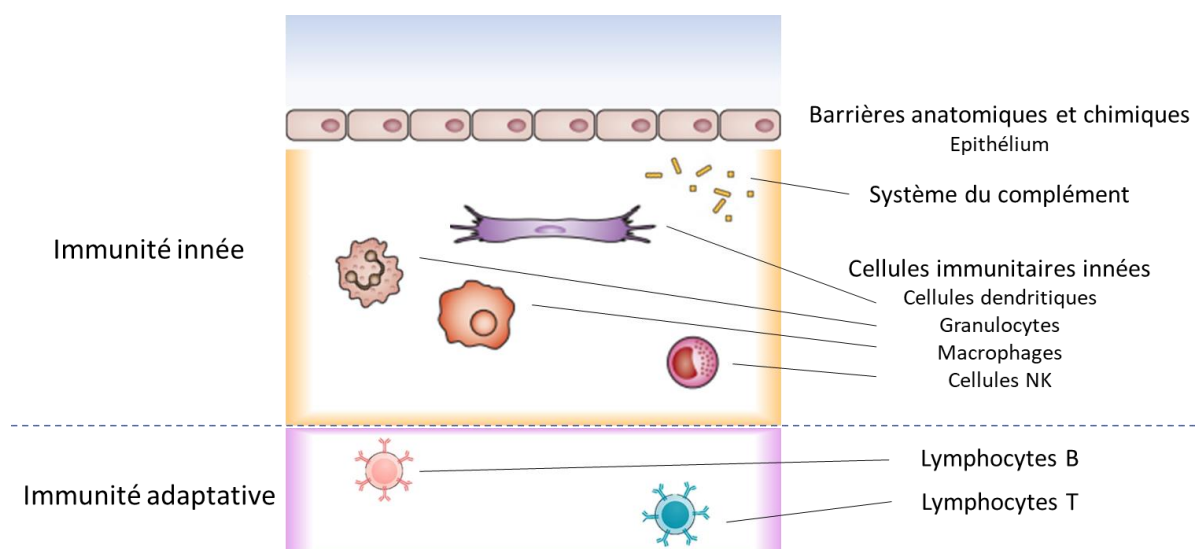
Le rôle majeur des cellules dendritiques (DC) repose sur différentes fonctions : (1) la production de cytokines ; (2) la phagocytose de pathogènes ; (3) l'absorption de grandes quantités de particules du milieu extracellulaire par macropinocytose ; (4) l'apprêtement des antigènes pour les présenter aux cellules du système immunitaire adaptatif sur des molécules du complexe moléculaire d'histocompatibilité (CMH) ; (5) expression de molécules costimulatrices favorisant la prolifération et la différenciation des lymphocytes T (Romani, 1990 ; Geissmann, 2010 ; Rossjohn, 2015).

Les gènes du CMH sont appelés *HLA* (*Human Leukocyte Antigen*) chez l'homme : avec trois gènes des chaînes α du CMH de classe I (*HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-C*) et trois gènes des chaînes α et β du CMH de classe II (*HLA-DR*, *HLA-DP* et *HLA-DQ*) (Little, 1999).

4. Cellules tueuses naturelles (NK)

Les cellules tueuses naturelles (NK, *natural killer*) sont de grandes cellules de type lymphocyte avec des granules cytoplasmiques distinctifs contenant des protéines cytotoxiques (perforine, granzyme, granulysine). Elles sont activées par des récepteurs innés qui reconnaissent des molécules à la surface de cellules infectées ou tumorales, ou qui lient les anticorps (Murphy, 2018). Elles peuvent produire des cytokines (interféron (IFN) γ , TNF α , IL-10), des facteurs de croissance, des chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5, CXCL1). Les cellules NK peuvent moduler la réponse immunitaire en interagissant avec les DC, les macrophages et les lymphocytes T (Crinier, 2020).

Figure 1. Système immunitaire inné et adaptatif



L'épithélium fait partie des barrières anatomiques et chimiques en première ligne de défense contre les pathogènes extérieurs. Si le pathogène passe ces barrières, il se trouve confronté aux acteurs de l'immunité innée, incluant le système du complément, les cellules dendritiques, les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les macrophages (et les monocytes) et les cellules NK (*natural killer*). Si la réponse innée ne suffit pas à éliminer le pathogène, l'immunité adaptative prend le relais en recrutant les lymphocytes B et T.

b. Immunité adaptative

i. Récepteurs spécifiques d'antigène

1. Reconnaissance antigénique

La réponse immunitaire adaptative se déclenche quand les récepteurs des lymphocytes B (BCR, *B-cell receptor*) ou T (*T-cell receptor*) reconnaissent spécifiquement leur antigène et reçoivent des signaux de costimulation qui déclenche la réponse immunitaire adaptative.

En principe, presque toute structure chimique peut être reconnue comme un antigène par le système immunitaire adaptatif. Un récepteur antigénique reconnaît une petite partie de la structure moléculaire de l'antigène appelée déterminant antigénique ou épitope. Les BCR reconnaissent directement les épitopes de l'antigène natif, tandis que les TCR reconnaissent un épitope peptidique dérivé d'une protéine partiellement dégradée, si et seulement si ce peptide est lié à des molécules du CMH (Cresswell, 1997).

2. Composition

Les anticorps et les BCR appartiennent à la même classe de protéine appelées immunoglobulines (Ig) et sont codés par les mêmes gènes (Tanaka, 2020). Les anticorps sont composés d'une région constante, ou région du fragment cristallisable (Fc), qui détermine la fonction effectrice de l'anticorps et appartient à l'une des cinq classes d'IgM, IgD, IgG (les plus abondantes), IgA et IgE ; et d'une région variable qui détermine la spécificité de l'anticorps.

La molécule d'anticorps est composée de deux chaînes lourdes identiques et de deux chaînes légères identiques, chacune constituée de régions variables et constantes. Les régions variables d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère se combinent pour former un site de liaison à l'antigène qui détermine la spécificité de l'anticorps envers son antigène (Stanfield, 2014).

Le TCR est aussi composé de deux chaînes formées de régions variables et constantes qui traversent la membrane des lymphocytes T. Chaque TCR est constitué de deux chaînes polypeptidiques différentes, α (TCR α) et β (TCR β), unies par un pont disulfure. Une minorité de lymphocytes T porte un récepteur constitué d'une paire différente de chaînes polypeptidiques désignées γ et δ (Murphy, 2018).

Dans les immunoglobulines, la région variable de la chaîne lourde est appelée V_H et la région variable de la chaîne légère V_L . Les domaines d'immunoglobuline de ces régions comportent trois boucles correspondant à trois régions hypervariables appelées aussi régions déterminant la complémentarité. Elles dépendent de segments géniques qui ne codent qu'une partie du domaine de l'immunoglobuline. Dans les TCR, la désignation de ces régions dépend des types de chaînes qui les portent : $V\alpha$, $V\beta$, $V\gamma$, $V\delta$ (Murphy, 2018).

3. Assemblage

Les récepteurs spécifiques d'antigène de l'immunité adaptative sont codés par un nombre fini de gènes et fournissent un répertoire apparemment infini de spécificités, par réarrangements somatiques aléatoires de segments géniques appelés V, D et J. Lors du développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse et des lymphocytes T dans le thymus, les segments géniques sont irréversiblement joints par un processus de recombinaison somatique d'ADN pour former une séquence d'ADN codant une région variable complète et unique, phénomène appelé réarrangement génique, qui génère une diversité combinatoire. D'autre part, l'addition ou la soustraction aléatoire de nucléotides aux jonctions des segments géniques crée une diversité supplémentaire appelée diversité de jonction (Sewell, 2012).

L'assemblage des récepteurs d'antigène est réalisé de manière à garantir que chaque lymphocyte en développement n'exprime qu'une spécificité de récepteur. De plus, le réarrangement génique étant irréversible, la prolifération d'un lymphocyte individuel génère un clone de cellules porteuses de récepteurs antigéniques identiques. Ainsi, lors de sa liaison à un antigène, la cellule activée se divise et produit une descendance identique à elle-même, processus appelé expansion clonale (Brunet, 1959).

4. Fonctions

Les anticorps ont trois fonctions : la neutralisation, l'opsonisation et l'activation du complément. La neutralisation désigne le processus par lequel les anticorps se lient aux pathogènes et à leurs produits toxiques, bloquant ainsi leur accès aux cellules qu'ils pourraient infecter ou détruire. Les anticorps peuvent amener une cellule phagocytaire à ingérer et détruire une bactérie. Les phagocytes ont des récepteurs, appelés récepteurs de Fc, qui se lient à la région constante des anticorps recouvrant la bactérie, ce qui conduit à la phagocytose. Les anticorps, ainsi que d'autres protéines, en recouvrant des pathogènes et des particules étrangères, facilitent leur ingestion ; ce processus s'appelle opsonisation. Lorsque les anticorps recouvrent une bactérie, leurs régions constantes activent le complément de manière plus efficace que la surface microbienne seule (Lu, 2018).

ii. Histoire naturelle des lymphocytes

Les lymphocytes dérivent de cellules progénitrices lymphoïdes communes, elles-mêmes issues de cellules souches hématopoïétiques multipotentes. Les lymphocytes naïfs (qui n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique) circulent à travers les tissus lymphoïdes, dans lesquels les antigènes des pathogènes sont transportés à partir des foyers infectieux, principalement par les DC. Les organes lymphoïdes périphériques sont spécialisés dans la rétention des DC porteuses d'antigènes et dans le déclenchement de réactions immunitaires adaptatives. En reconnaissant son antigène spécifique sur une cellule présentatrice d'antigènes (APC) activée, un lymphocyte naïf arrête sa migration, le volume de son noyau et son cytoplasme augmente et de nouvelles molécules d'ARNm et de protéines sont synthétisées. En quelques heures, la cellule a pris un aspect très différent ; elle est devenue un lymphoblaste. Les lymphoblastes se différencient en cellules effectrices. Le développement des lymphocytes est illustré par la Figure 2.

La plupart des lymphocytes générés par l'expansion clonale au cours d'une réponse immunitaire donnée meurent (Brunet, 1959). Cependant, un nombre significatif de lymphocytes B et de lymphocytes T spécifiques et activés persiste après l'élimination de l'antigène. Ces lymphocytes sont appelées lymphocytes mémoire et forment la base de la mémoire immunologique (Bonilla, 2010).

iii. Lymphocytes B

Les lymphocytes B complètent la majeure partie de leur développement dans la moelle osseuse. Ils possèdent un complexe de protéines de surface cellulaire, CD19, CD21 et CD81, qui agit comme corécepteur et récepteur costimulateur du BCR. Les antigènes libres peuvent stimuler les BCR, mais la plupart des lymphocytes B nécessitent une « aide » d'un certain type de lymphocytes T activés (dits auxiliaires) pour assurer des réponses à anticorps optimales. Quand son BCR est activé, le lymphocyte B prolifère et se différencie en plasmocytes. Forme effectrice des lymphocytes B, ils sécrètent des anticorps de même spécificité antigénique que leur BCR. Ainsi, l'antigène qui active un lymphocyte B donné devient la cible des anticorps produits par la descendance de ce lymphocyte B. Certains plasmocytes sécréteurs d'anticorps restent dans les organes lymphoïdes périphériques, mais la plupart des plasmocytes générés dans les ganglions lymphatiques et la rate gagnent la moelle osseuse où ils résident et sécrètent de grandes quantités d'anticorps dans le courant sanguin (Wang, 2020).

iv. Lymphocytes T

1. Lymphocytes T naïfs

Les précurseurs des lymphocytes T, exprimant la protéine CD3, migrent de la moelle osseuse vers le thymus. Certaines cytokines (IL-7, IL-15 et IL-2) sont nécessaires au développement normal des lymphocytes T (Wofford, 2008). Les lymphocytes T expriment soit le marqueur CD8, soit le marqueur CD4. Ces marqueurs interviennent dans la reconnaissance d'antigène en repérant différentes régions des molécules du CMH et dans la signalisation du TCR lorsqu'il interagit avec son antigène.

Il existe deux principaux types de molécules du CMH, le CMH de classe I, exprimés sur la plupart des cellules du corps ; et le CMH de classe II, exprimées principalement par les APC prédominantes du système immunitaire (DC, macrophages et lymphocytes B). Ils ont des structures légèrement différentes, mais tous deux ont un sillon à leur surface dans lequel s'insère le peptide antigénique. Le peptide y est introduit pendant la synthèse et l'assemblage intracellulaires de la molécule du CMH. Le complexe peptide : CMH est ensuite transporté vers la surface cellulaire et présenté aux lymphocytes T.

Le co-récepteur CD4 reconnaît une région du CMH de classe II. Les lymphocytes T CD4 reconnaissent donc sélectivement les peptides liés aux molécules du CMH de classe II. Le co-récepteur CD8, quant à lui, reconnaît une région du CMH de classe I. Les lymphocytes T CD8 reconnaissent donc sélectivement les peptides liés aux molécules du CMH de classe I (Rossjohn, 2015).

2. Activation des lymphocytes T

L'activation du TCR provient du contact des lymphocytes T avec des DC qui ont capté les antigènes dans un foyer infectieux et migré dans des organes lymphoïdes secondaires. Pour être activé, le lymphocyte naïf, qui exprime CD45RA, doit lier à la fois un antigène par son TCR et un ligand par son récepteur costimulateur comme la protéine CD28 sur la même cellule présentant l'antigène (Rossjohn, 2015).

Lorsque le TCR rencontre pour la première fois un antigène qu'il peut lier, le lymphocyte T prolifère et se différencie en un des divers types fonctionnels de lymphocytes T effecteurs. Lorsque le TCR rencontre de nouveau cet antigène, les lymphocytes T effecteurs peuvent exercer trois grands types d'activité : la cytotoxicité, l'activation d'autres cellules et la régulation négative des réponses immunitaires (Santana, 2006).

3. Différenciation des lymphocytes T

Les lymphocytes T CD8 se différencient tous en lymphocytes T cytotoxiques CD8 (parfois appelées lymphocytes cytotoxiques ou CTL) qui tuent leurs cellules cibles. Elles libèrent la perforine (qui contribue au transfert des granzymes dans la cellule cible), les granzymes (des proprotéases qui, après activation dans la cellule, induisent l'apoptose) et souvent la cytokine IFN- γ . Elles sont aussi porteuses du ligand de FAS qui, lorsqu'il se lie à FAS, induit l'apoptose de la cellule cible (Santana, 2006).

Sous l'effet de diverses cytokines produites par les APC et d'autres cellules immunitaires innées, les lymphocytes T CD4 naïfs se différencient en plusieurs sous-populations de lymphocytes T effecteurs : les cellules T_{H1}, T_{H2}, T_{H17}, T_{FH} et les lymphocytes T régulateurs (T_{REG}) (Santana, 2006).

Les lymphocytes T_{H1} se différencient en réponse à la signalisation séquentielle de l'IFN- γ et de l'IL-2. Ils produisent des cytokines, telles que l'IFN- γ , qui activent les macrophages, l'IL-3 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α , Tumor Necrosis Factor- α) (Santana, 2006).

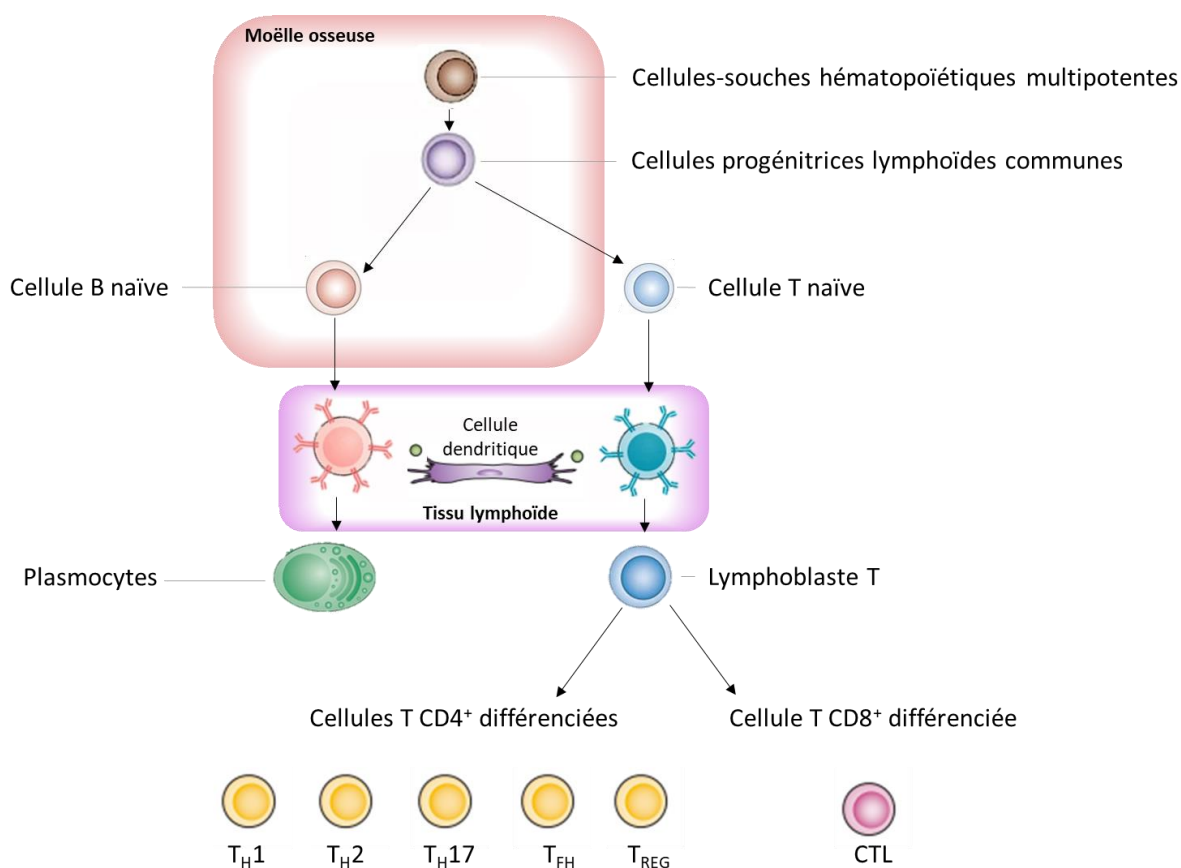
Les lymphocytes T_{H2} se différencient en réponse à l'IL-4. Ils produisent des cytokines qui recrutent des éosinophiles (IL-5), des mastocytes et des basophiles (IL-4) et renforcent l'immunité servant de barrière dans les muqueuses (IL-13) (Santana, 2006).

L'IL-6 déclenche la synthèse des protéines de phase aiguë (initiation de la réponse immunitaire) par les hépatocytes. Avec le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β* , facteur de croissance transformant- β), elle induit la différenciation des lymphocytes T_{H17}, qui augmentent l'expression du récepteur de l'IL-23 et y deviennent sensibles. Les lymphocytes T_{H17} sécrètent des cytokines de la famille IL-17 qui induisent la production, par les cellules épithéliales et stromales locales, de chimiokines qui recrutent des neutrophiles dans les sites d'infection. Les lymphocytes T_{H17} produisent également de l'IL-22 qui, avec l'IL-17, peut activer la production, par les cellules épithéliales servant de barrière, de peptides antimicrobiens (Bedoya, 2013).

Les lymphocytes T_{FH} sont des acteurs majeurs de l'activation des lymphocytes B naïfs grâce à leur reconnaissance combinée de l'antigène (Crotty, 2011).

Les T_{REG} suppriment l'activité d'autres lymphocytes et contribuent à limiter les dommages que les réactions immunitaires inappropriées pourraient causer (Malek, 2003).

Figure 2. Développement des lymphocytes



Les lymphocytes sont tous issus des cellules progénitrices lymphoïdes communes, elles-mêmes engendrées par les cellules-souches hématopoïétiques multipotentes résidant dans la moëlle osseuse. Le développement précoce des lymphocytes se déroule dans la moëlle osseuse, puis les lymphocytes T naïfs immatures partent dans la circulation afin de poursuivre leur maturation dans le thymus. Au contraire, les lymphocytes B complètent la majeure partie de leur développement dans la moëlle osseuse avant d'être relâchés dans la circulation. Lorsque les lymphocytes rencontrent l'antigène pour lequel ils sont spécifiques, le plus souvent présenté par une cellule présentatrice d'antigène, notamment les cellules dendritiques, rassemblées dans les tissus lymphoïdes, ils s'arrêtent et se différencient. Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques de l'antigène-cible, tandis que les lymphoblastes T peuvent évoluer selon diverses lignées de cellules effectrices ou régulatrices selon les marqueurs qu'ils portent (CD4 ou CD8) et les signaux qu'ils reçoivent. T_H : T helper ; T_{FH} : T follicular helper ; T_{REG} : T régulateurs ; CTL : cytotoxique T lymphocyte.

II. Développement et rupture de la tolérance au soi

Une fonction majeure du système immunitaire est de distinguer le soi du non soi. La tolérance immunologique désigne les mécanismes qui empêchent les réactions immunitaires contre les tissus de l'hôte lui-même (le soi), appelées pathologies auto-immunes.

a. Mécanismes de tolérance

La tolérance est dite centrale lorsqu'elle survient dans les organes lymphoïdes centraux (moelle osseuse et thymus) ; et périphérique lorsqu'elle agit sur les cellules qui ont quitté ces organes. La sélection positive désigne le processus qui envoie un signal de survie aux lymphocytes qui sont capables de répondre aux peptides liés à aux molécules du CMH autologues. La sélection négative désigne le processus au cours duquel les lymphocytes avec des récepteurs fortement auto-réactifs sont éliminés.

i. Tolérance centrale

1. Tolérance centrale des lymphocytes B

Les lymphocytes B immatures sont exposés aux molécules du soi dans la moelle osseuse avant de migrer vers les tissus lymphoïdes périphériques, où ils peuvent devenir des lymphocytes B matures circulantes. Plusieurs destins sont possibles pour les lymphocytes B immatures : (1) ils ne rencontrent pas d'antigène et viennent à maturité normalement ; (2) ils expriment des BCR qui reconnaissent des ligands multivalents et soit subissent une révision du récepteur, qui fait disparaître la spécificité du récepteur auto-réactif, soit meurent par apoptose ou mort cellulaire programmée (délétion clonale) ; (3) ils lient des antigènes du soi et deviennent incapables de répondre à l'antigène (anergiques) ; (4) ils lient, avec une faible affinité, des antigènes du soi, solubles ou monovalents, ne reçoivent aucun signal de cette interaction et viennent à maturité normalement. De tels lymphocytes, potentiellement auto-réactifs, forment ce que l'on appelle des clones ignorants car leur ligand est présent mais incapable de les activer (Nemazee, 2017).

2. Tolérance centrale des lymphocytes T

Les lymphocytes T immatures subissent d'une part une sélection positive : les TCR compatibles avec les molécules du CMH du soi transmettent un signal de survie en interagissant avec l'épithélium thymique ; et d'autre part une sélection négative qui nécessite la présence du gène *AIRE* (*Autoimmune Regulator*, régulateur auto-immun) qui code un facteur de transcription qui contrôle l'expression d'antigènes spécifiques du tissu du soi par les cellules médullaires du thymus. Les lymphocytes T immatures sont ainsi exposés à ces autoantigènes, et les TCR qui les reconnaissent transmettent un signal qui conduit à la mort cellulaire (délétion clonale) (Takaba, 2017).

ii. Tolérance périphérique

1. Tolérance périphérique des lymphocytes B

Les lymphocytes B immatures poursuivent leur développement dans la rate où ils sont exposés à des auto-antigènes. S'ils reconnaissent un auto-antigène multivalent, ils reçoivent un signal qui conduit à la mort cellulaire (délétion clonale). S'ils reconnaissent un auto-antigène soluble, ils deviennent anergiques et meurent après quelques jours. S'ils se lient avec une faible affinité à un auto-antigène soluble, ils constituent un clone dit ignorant, c'est-à-dire indifférent à l'auto-antigène, et continuent leur maturation. S'ils ne réagissent pas au soi, ils continuent également leur différenciation en lymphocytes B matures (Wang, 2020).

2. Tolérance périphérique des lymphocytes T

Les principaux mécanismes de tolérance périphérique concernant les lymphocytes T comprennent : (1) l'anergie (absence de réaction fonctionnelle), (2) la suppression par des lymphocytes T_{REG}, (3) l'induction du développement de lymphocytes T_{REG} au lieu de lymphocytes T effecteurs (déviation fonctionnelle) et (4) la délétion clonale du répertoire lymphocytaire (ElTanbouly, 2021).

iii. Lymphocytes T régulateurs

1. Développement

Les lymphocytes T_{REG} représentent environ 5 à 10% des lymphocytes T CD4 circulants. Ils peuvent se développer dans le thymus (T_{REG} naturelles ou nT_{REG}) ou à la périphérie (T_{REG} induites ou iT_{REG}). Les nT_{REG} se développent à partir de lymphocytes T potentiellement auto-réactifs et sont issus d'une sélection agoniste par une liaison de haute affinité aux molécules du CMH contenant des peptides du soi. Les nT_{REG} sont des lymphocytes T CD4 qui expriment de manière constitutive le récepteur de l'IL-2 (CD25), en forte densité CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte Antigen 4*) et le récepteur de la sélectine L, CD62L. Les iT_{REG} se développent à la périphérie à partir de lymphocytes T CD4 naïfs et expriment également CD25 et CTLA-4 (Sakaguchi, 2008).

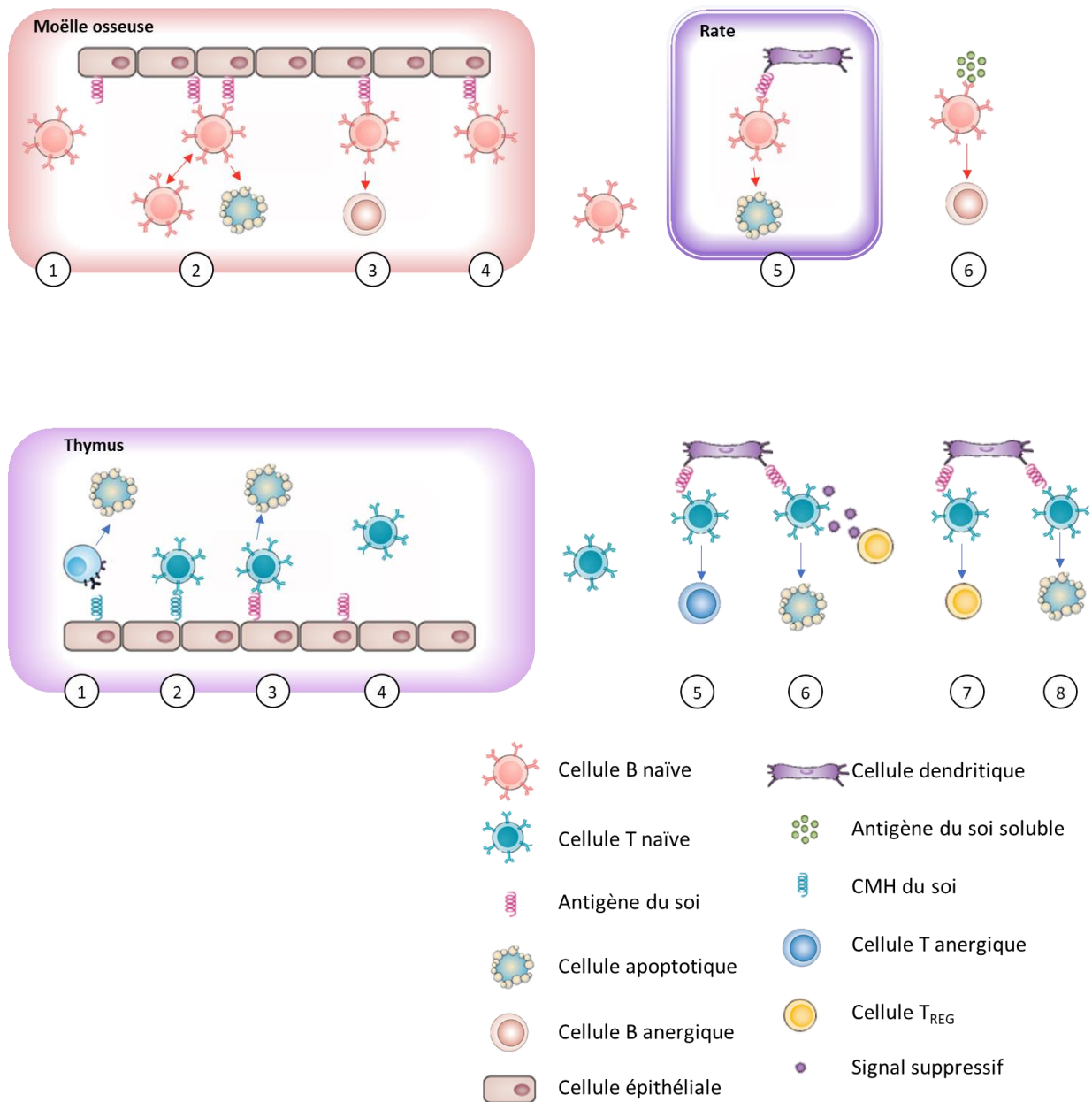
Deux facteurs de transcription sont spécifiques des T_{REG} : Helios et FoxP3 (*forkhead box P3*), régulateur majeur du développement et de la fonction des T_{REG} (Sakaguchi, 2008).

2. Fonctions

Les T_{REG} peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T par des régulateurs négatifs comprenant (1) CTLA-4, induit sur les lymphocytes T activés et qui se lie aux ligands costimulateurs ; (2) ICOS (*inducible T cell co-stimulator*) qui détermine certaines fonctions suppressives sur les DC ; et (3) PD-1 (*Programmed cell death-1*) (Walunas, 1996 ; Ito, 2008 ; Jin, 2011).

D'autre part, les T_{REG} produisent des cytokines immunosuppressives : le TGF- β inhibe la prolifération des lymphocytes T et l'IL-10 inhibe l'expression de molécules du CMH et de molécules costimulatrices et la production de cytokines pro-inflammatoires par les APC (Sakaguchi, 2008).

Figure 3. Mécanismes de la tolérance immunitaire



Le panel supérieur décrit les mécanismes de tolérance sélectionnant les lymphocytes B non auto-réactifs. La tolérance centrale dans la moëlle osseuse conduit à 4 destins différents : (1) le lymphocyte B immature ne rencontre pas son antigène et part dans la circulation ; (2) le lymphocyte B se lie de façon multivalente aux antigènes du soi et subit soit une reprogrammation de son BCR, soit une délétion clonale ; (3) le lymphocyte B se lie à l'antigène du soi qu'il reconnaît et devient anergique et (4) le lymphocyte B reconnaît avec une faible affinité l'antigène du soi sans réagir et part dans la circulation. La tolérance périphérique prend alors le relais, soit (5) dans la rate où se dirigent les lymphocytes B immatures afin de poursuivre leur maturation, où ils peuvent reconnaître un antigène du soi et subit une délétion clonale ; soit (6) dans la circulation générale où ils peuvent reconnaître un antigène soluble du soi sans signal de costimulation, conduisant à l'anergie de la cellule auto-réactive.

Le panel inférieur décrit les mécanismes de tolérance sélectionnant les lymphocytes T non auto-réactifs. La tolérance centrale des lymphocytes T se déroule dans le thymus, où plusieurs mécanismes entrent en jeu : d'une part par sélection positive, soit (1) le lymphocyte T ne reconnaît pas le CMH du soi et ne reçoit pas de signal de survie et meurt par apoptose ; soit (2) le lymphocyte T reconnaît le CMH du soi et reçoit un signal de survie ; d'autre part par sélection négative, soit (3) le lymphocyte T reconnaît un peptide antigénique du soi présenté par les cellules épithéliales thymiques et subit une délétion clonale ; soit (4) le lymphocyte T se lie peu ou pas à l'antigène du soi et part dans la circulation. La tolérance périphérique intervient alors de diverses façons : (5) le lymphocyte T reconnaît un peptide antigénique du soi présenté par la cellule dendritique et devient anergique ; (6) le lymphocyte T reconnaît un peptide antigénique du soi présenté par la cellule dendritique et reçoit des signaux de mort par les lymphocytes T régulateurs et subit une délétion clonale ; (7) le lymphocyte T reconnaît un peptide antigénique du soi et reçoit des signaux induisant une différenciation en lymphocytes T régulateurs et (8) le lymphocyte T reconnaît un peptide antigénique du soi sans signal de costimulation et subit une délétion clonale. BCR : récepteur des cellules B ; CMH : complexe moléculaire d'histocompatibilité ; T_{REG} : cellule T régulatrice.

b. Auto-immunité

i. Rupture de points de contrôles

Les mécanismes de tolérance réduisent la proportion de cellules auto-réactives circulantes à chaque point de contrôle. Chacun contribue à la prévention de l'auto-immunité sans affaiblir trop fortement l'immunité, et ensemble, ils assurent une protection efficace contre les pathologies auto-immunes. Malgré cela, des lymphocytes auto-réactifs ignorants, dotés d'une faible affinité pour des auto-antigènes, sont présents chez des individus en bonne santé. Ces lymphocytes peuvent participer aux réponses auto-immunes si leur seuil d'activation est dépassé par des facteurs coactivateurs. La pathologie auto-immune se développe quand un trop grand nombre de points de contrôle sont dépassés, ce qui permet à des cellules auto-réactives de déclencher la réponse immunitaire détruisant les tissus du soi (Theofilopoulos, 2017).

ii. Pathologies auto-immunes

Collectivement, les troubles auto-immuns affectent 5% des populations des pays occidentaux et leur incidence augmente (Wang, 2015).

Les pathologies auto-immunes peuvent être classées schématiquement en deux catégories : les pathologies spécifiques d'organe et les pathologies systémiques (qui touchent différents systèmes de l'organisme). En général, les pathologies auto-immunes se caractérisent par une phase d'activation précoce avec la participation de seulement quelques auto-antigènes. La présence constante d'auto-antigènes conduit à une inflammation chronique entraînant des dommages cellulaires, libérant d'autant plus d'auto-antigènes, et amplifiant la réponse auto-immunitaire. Les lésions tissulaires libèrent des cytokines et des chimiokines qui attirent des cellules effectrices non spécifiques. La réponse immunitaire entreprend la destruction du pathogène jusqu'à élimination de l'envahisseur, après quoi elle cesse. Ainsi, dans les pathologies spécifiques d'organe, la destruction immunitaire du tissu cible et des auto-antigènes particuliers qu'il exprime met fin à l'activité auto-immune.

Les pathologies auto-immunes dépendent de lymphocytes auto-réactifs, de leurs produits solubles, et des auto-anticorps responsables de l'inflammation et des lésions tissulaires (Wang, 2015).

iii. Rôle d'agents externes

Des données récentes suggèrent que des facteurs environnementaux comme les infections, le microbiote, les toxiques ou les composants alimentaires participent à plus de 70% dans la rupture de tolérance (Floreani, 2016).

Le déclenchement ou l'induction de pathologies auto-immunes par des agents infectieux, incluant les virus, les bactéries, les champignons et les parasites, ont été rapportés (Floreani, 2016). Dans d'autres cas, la « charge des infections » survenant dans l'enfance serait responsable de l'induction de l'auto-immunité (Kivity, 2009). Le déclenchement et l'évolution de ces pathologies multifactorielles pourraient dépendre des mécanismes suivants : (1) le mimétisme moléculaire, qui survient quand des antigènes étrangers partagent des séquences ou des structures similaires avec les auto-antigènes (Rojas, 2018) ; (2) l'extension épitopique, qui désigne le développement de clones de lymphocytes sensibles à de nouveaux épitopes de l'auto-antigènes ou de nouveaux auto-antigènes au cours d'une réaction auto-immune ou inflammatoire chronique (Vanderlugt, 1996) ; (3) l'activation des cellules auto-réactives (Getts, 2013) ; (4) l'infection virale prolongée (virus de l'hépatite C (VHC), Epstein-Barr virus (EBV)) potentiellement associée à la rupture de tolérance (Agmon-Levin, 2009).

Les agents environnementaux ont également fait l'objet d'investigations poussées comme l'exposition aux ultraviolets dans le lupus ou le déficit en vitamine D, qui reste controversé (Barbhaiya, 2014 ; Yang, 2013).

Certains produits chimiques ont été associés avec des pathologies auto-immunes, comme la fumée de cigarette, la silice, les polluants troposphériques, l'alcool, sans que leurs mécanismes aient été complètement élucidés (Floreani, 2016).

De nombreux médicaments sont connus pour induire des pathologies auto-immunes (Xiao, 2014). Les hormones sexuelles, en particulier les œstrogènes sont connus pour jouer un rôle dans l'auto-immunité, notamment en soutenant la survie des lymphocytes T auto-réactifs (Verthelyi, 2001).

Enfin, les produits d'hygiène et les cosmétiques peuvent être impliqués dans le développement de l'auto-immunité ; le vernis à ongles, par exemple, est apparu comme facteur de risque de lupus et de cholangite biliaire primitive (Gershwin, 2005).

iv. Prédisposition génétique

Il existe une forte composante génétique dans les pathologies auto-immunes soutenue notamment par deux arguments : (1) certaines pathologies sont familiales, et (2) les jumeaux monozygotes présentent un risque d'affection auto-immune bien supérieur que les jumeaux dizygotes (Wang, 2015).

La prédisposition génétique aux troubles auto-immuns a pu être évaluée par des études d'association à l'échelle du génome (GWAS, *Genome-Wide Association Studies*) qui recherchent une corrélation entre la fréquence de la pathologie et des variants génétiques (polymorphismes d'un seul nucléotide, SNP, *Single-Nucleotide Polymorphisms*). De telles études impliquent généralement des milliers de contrôles sains et de patients atteints d'une pathologie auto-immune afin d'identifier des associations significatives. Par cette approche, des centaines de variants significatifs ont été identifiés pour de multiples pathologies auto-immunes. Cela suggère que le terrain génétique sous-jacent à l'apparition d'une pathologie auto-immune chez l'homme peut être due à une combinaison d'allèles de prédisposition dans divers locus.

Parmi ces différents locus, la prédisposition à une pathologie auto-immune a souvent été associée au génotype du CMH, particulièrement des allèles du CMH de classe II, impliquant donc les lymphocytes T CD4. Globalement, les analyses GWAS indiquent que certaines voies immunitaires, notamment impliquées dans l'activation et la fonction des lymphocytes T, sont communes à de multiples formes d'auto-immunité (Visscher, 2012).

Les études récentes combinant le profil de transcription et l'épigénétique suggèrent que plusieurs des variants responsables sont situés dans des régulateurs majeurs de l'expression des gènes de cellules immunitaires humaines. Beaucoup de ces régulateurs sont utilisés après activation dans les lymphocytes T effecteurs ou régulateurs, ce qui confirme que l'activation des lymphocytes T est un événement essentiel dans l'étiologie des affections auto-immunes (Zhang, 2018).

La plupart des gènes identifiés comme prédisposant à l'auto-immunité peuvent être classés selon qu'ils affectent : (1) la disponibilité et l'élimination de l'auto-antigène ; (2) l'apoptose ; (3) les seuils de signalisation ; (4) l'expression ou la signalisation de cytokines ; (5) des molécules de costimulation ou leurs récepteurs ; (6) des lymphocytes T régulateurs (Bruserud, 2016 ; Rieux-Laucat, 2018 ; Vandenbroeck, 2012 ; Gough, 2005 ; Oda, 2013).

La prédisposition à la plupart des pathologies auto-immunes est due aux effets combinés de plusieurs gènes, mais il existe des pathologies auto-immunes monogéniques. Ici, l'allèle mutant confère un risque très élevé à l'individu, mais l'impact global sur la population est minime car ces variants sont rares. Quelques-unes de ces pathologies sont présentées ci-après.

v. Syndromes auto-immuns monogéniques

1. Mutations de AIRE

En l'absence de *AIRE*, la délétion clonale des lymphocytes T auto-réactifs intra-thymique n'a pas lieu, et des lymphocytes T auto-réactifs matures sont exportés vers la périphérie, où ils peuvent être responsables de pathologies auto-immunes.

En effet, des défauts de *AIRE* conduisent à un syndrome complexe appelé APECED (*Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy*, polyendocrinopathie auto-immune candidose dystrophie ectodermique), qui se caractérise par une auto-immunité, des défauts de développement et une immunodéficience (Bruserud, 2016).

2. Mutations de FoxP3

L'absence de FoxP3 conduit au développement rapide d'une auto-immunité systémique sévère : le syndrome auto-immun récessif lié à l'X ou IPEX (*Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*, dérégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie, liées à l'X), qui se caractérise par une inflammation allergique sévère, une polyendocrinopathie auto-immune, une diarrhée sécrétoire, une anémie hémolytique et une thrombocytopénie, et entraîne habituellement une mort prématurée.

En dépit de la mutation du gène *FOXP3*, le nombre de lymphocytes T_{REG} FoxP3⁺ dans le sang des individus atteints d'IPEX est comparable à celui des individus en bonne santé. Cependant, la fonction suppressive normalement exercée par ces cellules est altérée (Bacchetta, 2018).

3. Mutations de FAS

Le syndrome lymphoprolifératif auto-immun (*ALPS, Autoimmune LymphoProliferative Syndrome*) est une pathologie monogénique associant un syndrome tumoral (hypertrophie ganglionnaire (adénopathies), de la rate (splénomégalie) et du foie (hépatomégalie)) et des cytopénies auto-immunes, causé par des mutations dans le gène codant FAS.

Ce récepteur de mort est normalement présent à la surface des lymphocytes T et B activés, et lorsqu'il interagit avec son ligand, appelé FASL, cela entraîne la mort des cellules par apoptose. De cette façon, il permet de limiter l'étendue des réponses immunitaires. Les mutations qui éliminent ou inactivent FAS conduisent à une accumulation massive de lymphocytes, en particulier des lymphocytes T (Rieux-Laucat, 2018).

PARTIE 2 : LES HEPATITES AUTO-IMMUNES

I. Définition

a. Histoire

i. Découverte

La pathologie actuellement appelée hépatite auto-immune (HAI) désigne dans les premiers cas rapportés une hépatite chronique active, touchant les jeunes femmes, caractérisée par une hypergammaglobulinémie majeure composée d'IgG (Waldenstrom, 1952). Les auto-anticorps associés à cette pathologie sont caractérisés au début des années 1960 : anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse et anti-LKM (*liver kidney microsome*) (Mackay, 2008). La détection de ces auto-anticorps circulants, l'identification d'un infiltrat lympho-plasmocytaire dense intra-hépatique, l'association à d'autres atteintes auto-immunes, et la bonne réponse aux traitements immunosuppresseurs incluant les corticoïdes et l'azathioprine ont ensuite conduit à proposer le terme d'hépatite auto-immune (Mackay, 1965).

ii. Classification

En fonction des auto-anticorps circulants détectés, il est possible de distinguer deux formes d'HAI : l'HAI de type 1 associée aux anticorps anti-nucléaires et/ou anti-muscle lisse, et l'HAI de type 2 associée aux anticorps anti-LKM-1 et/ou anti-LC-1 (*Liver Cytosol-1*) (Johnson, 1965 ; Homberg, 1987). L'HAI de type 1 survient généralement autour de la puberté et l'âge de 40 ans, alors que l'HAI de type 2 concerne principalement des enfants et des jeunes adultes (Mieli-Vergani, 2018). Dans cette population, l'HAI est plus agressive que chez les adultes (Vergani, 2021). Les principales différences entre ces deux formes sont décrites dans le Tableau 1.

Tableau 1. Différences entre les HAI de type 1 et de type 2.

Caractéristiques	HAI de type 1	HAI de type 2
Prédominance	Adulte	Enfance
Sexe féminin	75%	95%
Âge au diagnostic	Deux pics : un dans l'enfance ou l'adolescence et un autour de 40 ans	Principalement chez les enfants, des nourrissons aux jeunes adultes
Auto-anticorps	Anticorps anti-nucléaires Anticorps anti-muscle lisse Anticorps anti-actine Anticorps anti-SLA/LP pANCA	Anticorps anti-LKM-1 Anticorps anti-LC-1
Incidence	1,5-3cas/100000 individus/an	< 0,5 cas/100000 individus/an
Prédisposition génétique	<i>HLA-DRB1*0301</i> <i>HLA-DRB1*0401</i> <i>HLA-DRB1*0405</i> <i>HLA-DRB1*0404</i> <i>HLA-DRB1*1301</i> <i>HLA-DRB1*0301</i>	<i>HLA-DRB1*07</i> <i>HLA-DRB1*03</i> <i>HLA-DRB1*15</i>
Pathologies auto-immunes associées	Thyroïdite auto-immune Polyarthrite rhumatoïde Pathologies inflammatoires chroniques intestinales	Diabète insulino-dépendant Pathologies auto-immunes cutanées
Gravité de l'HAI	Légère à modérée	Modérée à sévère, avec des défaillances hépatiques aiguës au moment du diagnostic
Echec du traitement de référence	Rare	Fréquent
Rechutes après sevrage	Variable	Courant
Traitement au long cours	Variable	Près de 100%
Recours à la transplantation hépatique	Variable	Plus fréquent

HAI : hépatite auto-immune ; LC-1: *liver cytosol type 1*; LKM-1 : *liver kidney microsome type 1*; pANCA : anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires ; SLA/LP : *soluble liver antigen/ liver pancreas*.

D'autres sous-types basés sur les anticorps anti-SLA/LP (*soluble liver antigen/liver pancreas*) ou en l'absence d'auto-anticorps circulants ont été proposés mais leur existence est controversée. Il reste difficile de prouver leur pertinence clinique étant donné que les éléments déclenchants l'HAI n'ont pas été identifiés (Manns, 1987 ; Stechemesser, 1993 ; Mieli-Vergani, 2018).

iii. Histoire naturelle

On ne dispose que de maigres données sur l'histoire naturelle de l'HAI (Lucey, 2014).

Le dernier essai clinique randomisé avec un bras placebo et un bras traité par immunosuppresseurs a été publié en 1980. La valeur de ces études est limitée par l'absence de critères diagnostiques fiables et le peu de tests immunologiques disponibles à l'époque. Néanmoins, ces études ont révélé qu'en l'absence de traitement, le pronostic des patients atteints d'HAI était très sombre, avec 50% de décès à 5 ans et 90% de décès à 10 ans. Ils ont ainsi démontré que le traitement immunosuppresseur améliorait drastiquement la survie (Kirk, 1980).

L'HAI, comme d'autres pathologies auto-immunes, a une évolution imprévisible. L'éventualité de rémissions spontanées avec une perturbation transitoire des transaminases suivie d'une normalisation sans traitement repose sur quelques cas rapportés dès les premières observations d'HAI (Dufour, 2002). Le diagnostic fortuit d'HAI chez des patients asymptomatiques suggère l'existence de formes latentes qui persistent sans s'aggraver pendant des années (Feld, 2005). De plus, des rechutes après un traitement immunosuppresseur bien conduit ont également été décrites, aboutissant à une évolution fluctuante caractéristique de l'HAI (Dufour, 2002).

b. Epidémiologie

iv. Prévalence et incidence

L'HAI peut survenir quel que soit l'âge et l'origine ethnique (Mieli-Vergani, 2018).

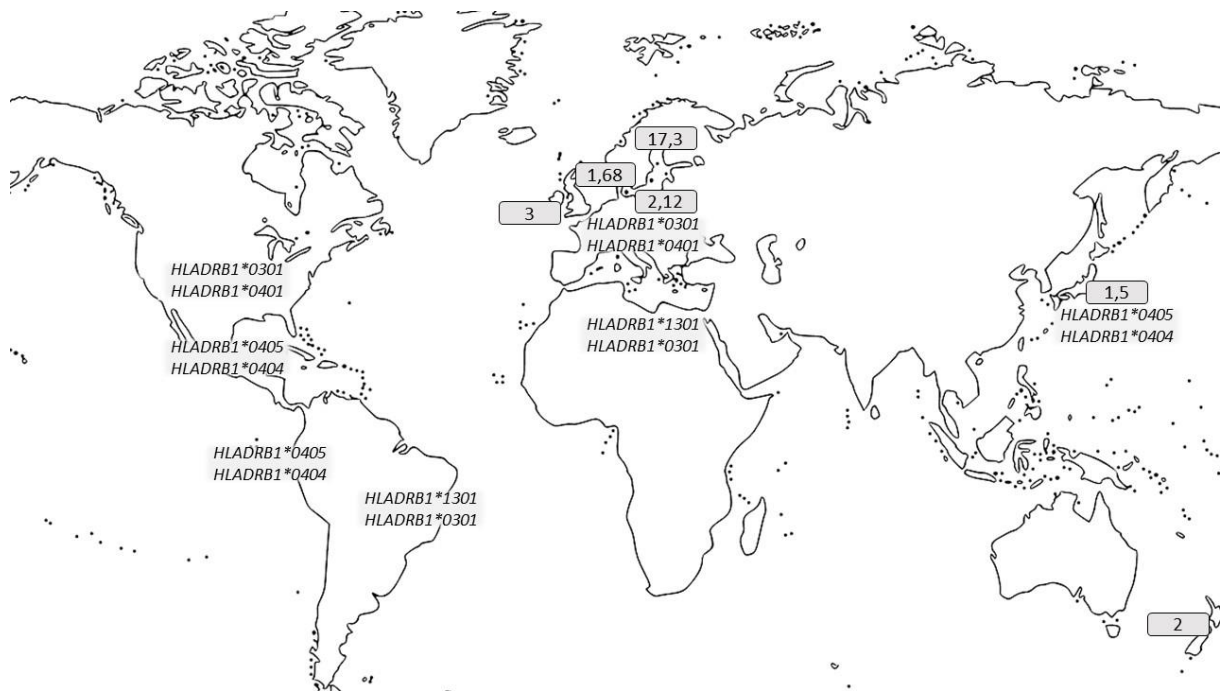
La prévalence et l'incidence de l'HAI sont difficiles à déterminer en raison de la méthodologie et des classifications utilisées dans les différentes études disponibles. Certains auteurs ont considéré uniquement l'HAI de type 1, d'autres les deux types d'HAI. Très peu d'études ont été conduites sur l'HAI de type 2 uniquement. En outre, la distribution entre les deux types d'HAI varie selon les populations étudiées. Par ailleurs, certaines équipes ne s'intéressent qu'aux patients adultes, d'autres seulement aux patients pédiatriques, et d'autres encore prennent les deux en compte.

De plus, la prévalence et l'incidence de l'HAI varient considérablement selon les régions géographiques, accroissant encore la difficulté à obtenir une estimation précise (Figure 4).

Enfin, les données publiées décrivent une augmentation de la prévalence et de l'incidence au fil du temps. En Scandinavie, la prévalence était de 1,2 cas pour 100 000 individus en 1990 et de 17,3 cas pour 100 000 individus en 2009 (Boberg, 1998 ; Danielsson Borssén, 2017). Aux Pays-Bas, l'incidence était de 1,37 cas pour 100 000 individus en 1994 et de 2,12 cas pour 100 000 individus en 2012 (Grønbaek, 2014).

Les données les plus récentes décrivent, chez les adultes, une prévalence annuelle de 4 à 42,9 cas pour 100 000 individus et une incidence de 0,67 à 2 cas pour 100 000 individus selon les régions : 1,5 cas au Japon, 1,68 cas au Danemark, 3 cas au Royaume-Uni, 2 cas en Nouvelle-Zélande (Czaja, 2017). Chez les enfants, la prévalence annuelle est estimée entre 2,4 et 9,9 pour 100 000 individus et l'incidence entre 0,23 et 0,4 pour 100 000 individus (Jiménez-Rivera, 2015).

Figure 4. Hépatite auto-immune : Répartition et prédisposition dans le monde



La prévalence et les gènes HLA de prédisposition génétique de l'HAİ varient selon les régions géographiques. La prévalence de l'HAİ est représentée dans des rectangles gris arrondis. Les gènes HLA de prédisposition génétique sont présentés en italique sur fond gris. HAİ : hépatite auto-immune ; HLA : *human leukocyte antigen*.

v. Facteurs de risque

1. Prédisposition génétique

L'HAI ne suit pas une transmission mendélienne. Comme dans d'autres pathologies auto-immunes, une prédominance féminine est observée dans l'HAI, tant chez les enfants que chez les adultes, avec un ratio masculin/féminin de 1/4 à 1/7 (Grønbaek, 2014 ; Liberal, 2016).

Le rôle prédisposant des gènes HLA a été confirmé par une grande étude GWAS réalisée dans l'HAI (de Boer, 2014). Les génotypes varient selon la région géographique et l'origine ethnique (Figure 4). En Europe et en Amérique du Nord, la susceptibilité à l'HAI de type 1 est conférée par les génotypes HLA-DR3 (*HLA-DRB1*0301*) et HLA-DR4 (*HLA-DRB1*0401*) (Donaldson, 2002). Au Japon, en Argentine et au Mexique, la prédisposition est associée aux allèles *HLA-DRB1*0405* et *HLA-DRB1*0404* (Czaja, 2000). En Europe du Nord, l'HAI de type 1 est aussi associée à *HLA-DRB1*03*, alors que l'allèle *HLA-DRB1*04* serait plutôt protecteur (Donaldson, 2002). Au Brésil et en Egypte, c'est l'allèle *HLA-DRB1*1301* qui est associé à l'HAI à début pédiatrique, ainsi que l'allèle *HLA-DRB1*0301* (Oliveira, 2011). Il est intéressant de noter qu'en Amérique du Sud, cet allèle est non seulement associé à l'HAI à début pédiatrique, mais aussi à l'infection persistante par le virus de l'hépatite A (VHA) endémique (Fainboim, 2001). L'HAI de type 2 est plutôt associée à l'allèle *HLA-DRB1*07* et *HLA-DRB1*03* ; en Egypte, elle est associée aussi à l'allèle *HLA-DRB1*15* (Mieli-Vergani, 2018). Dans une publication récente, Ma *et al* ont montré que certains profils HLA particuliers peuvent être utilisés pour prédire la réponse au traitement immunosuppresseur et l'évolution des patients (Ma, 2021).

Des associations avec des polymorphismes affectant d'autres gènes sont décrites dans le Tableau 2. L'ensemble de ces données suggère une participation importante du terrain génétique dans la pathogénèse de l'HAI, plus particulièrement dans les voies immunitaires plutôt que proprement hépatiques. Les variants de prédisposition sont identifiés dans des gènes de fonctions différentes, affectant plusieurs aspects de la réponse immunitaire. Cela dévoile une complexité de facteurs de risque génétiques répondant à la nécessité de rompre suffisamment de points de contrôles pour permettre l'apparition de l'HAI.

Tableau 2. Polymorphismes associés à la survenue d'HAI

Fonctions des gènes	Gènes (polymorphismes)	Références
Apoptose	Fas (-670, IVS2nt176, IVS3nt46, IVS5nt82)	Hiraide, 2005
Seuils de signalisation	TBX21 (-1993C)	Chen, 2011
	STAT4 (rs7574865T)	Migita, 2013
	SH2B3 (rs3184504)	Chaouali, 2018
	PTPN22 (rs2476601)	Chaouali, 2018
Expression ou signalisation de cytokines	IL12A, IL12RB	Bogdanos, 2013
	TNF- α (308A)	Qin, 2014
	IL-13 (rs20541)	Oliveira, 2015
	IL-4 (-590CC)	Yousefi, 2016
	TNIP1 (rs7708392)	Oka, 2018
	IL-2 (+166TT)	Yousefi, 2018
	IL-6 (nt565AA)	Yousefi, 2018
	IL-10 (-1082/-819)	Yousefi, 2019
	TGF- β (+869/+915)	Yousefi, 2019
Lymphocytes T régulateurs	MIF (-173GC)	Alsayez, 2020
	CTLA-4 (+49GG)	Chaouali, 2017
	ICOS (rs4325730)	Higuchi, 2017

CTLA-4 : *cytotoxic T lymphocyte antigen -4* ; HAI : hépatite auto-immune ; ICOS : *inducible T-cell costimulator* ; IL : interleukine ; MIF : *macrophage migration inhibitory factor* ; PTPN22 : *Protein tyrosine phosphatase non receptor type 22* ; SH2B3 : *Srv homology 2-B adapter protein 3* ; STAT4 : *signal transducer and activator of transcription 4* ; TBX21 : *T-box transcription factor 21* ; TGF : *transforming growth factor* ; TNF : *tumor necrosis factor* ; TNIP1 : *TNFAIP3-interacting protein*.

2. Poly-auto-immunité individuelle

La poly-auto-immunité individuelle, définie par la présence de plusieurs pathologies auto-immunes associées chez le patient, advient dans 14 à 44% des patients atteints d'HAI (Mack, 2020). Initialement considérée comme plus souvent associée à l'HAI de type 2, il semble que la fréquence de poly-auto-immunité individuelle soit similaire dans les deux formes d'HAI (Bittencourt, 2008).

Les pathologies auto-immunes hépatiques comprennent l'HAI, la cirrhose biliaire primitive et la cholangite sclérosante primitive. Selon les critères diagnostiques utilisés et la population étudiée, 2 à 19% des patients avec cirrhose biliaire primitive et 7 à 14% des patients avec cholangite sclérosante primitive ont été rapportés comme présentant des caractéristiques communes avec les critères de l'HAI (Boberg, 2011).

La prévalence de pathologies auto-immunes extra-hépatiques est de 20 à 49% au diagnostic, et de 14 à 42% au cours du suivi (Floreani, 2016). Une large étude nationale danoise a montré que les patients atteints d'HAI ont 7 à 10 fois plus de risque de développer des pathologies auto-immunes extra-hépatiques (thyroïdiennes, cutanées, systémiques, digestives, par ordre de fréquence) par rapport à la population générale (Grønbaek, 2019).

Les thyroïdites auto-immunes sont retrouvées chez 10% des patients atteints d'HAI (Teufel, 2010). Elles sont observées plus souvent dans les HAI de type 2, sans que cette association soit étayée par des arguments génétiques (Floreani, 2019).

De nombreux cas d'HAI associée à des pathologies cutanées auto-immunes, en particulier le psoriasis et le vitiligo, ont été rapportés. L'incidence d'HAI parmi les patients atteints de psoriasis est plus élevée par rapport à la population générale. La prévalence du vitiligo est augmentée chez les patients atteints d'HAI, avec une survenue plus tardive que dans la population générale (Terziroli Beretta-Piccoli, 2017).

Concernant les pathologies auto-immunes systémiques, les premières observations d'HAI décrivent un lien avec le lupus érythémateux systémique. Dans les descriptions récentes, le syndrome de Gougerot-Sjögren et la polyarthrite rhumatoïde sont plus souvent associés à l'HAI. En effet, si une défaillance hépatique peut survenir chez presque deux tiers des patients atteints de lupus, le diagnostic d'HAI concomitante est rare (Selmi, 2018). Il est intéressant de noter que l'HAI et les pathologies systémiques partagent des traits communs comme les anticorps anti-nucléaires ou l'hypergammaglobulinémie.

La maladie cœliaque est associée à l'HAI dans 4% des cas, et inversement, l'HAI survient plus fréquemment chez les patients atteints de maladie cœliaque (16%) que dans la population générale (2,8-3,5%) (Haggard, 2021). De plus, près de 95% des patients atteints de maladie cœliaque sont HLA-DQ2, un sérotype fortement associé à HLA-DR3, facteur de risque d'HAI (Floreani, 2019). Dans les quelques études portant sur l'association de pathologies inflammatoires chroniques intestinales avec l'HAI réalisées chez les adultes, on observe que l'HAI est souvent associée à la maladie de Crohn (Perdigoto, 1992).

L'ensemble de ces données suggère le partage de traits génétiques liés à l'auto-immunité (Czaja, 2016 ; Mack, 2020). La présence concomitante de plusieurs pathologies auto-immunes spécifiques d'organe chez un même patient pose la question de la distinction avec les pathologies auto-immunes systémiques. La rupture de plusieurs points de contrôle due à un ou plusieurs variants génétiques délétères conduit dans les deux cas à la réponse auto-immune.

3. Auto-immunité familiale

Une large cohorte nationale danoise souligne l'importance du terrain génétique prédisposant dans la pathogénèse de l'HAI. En effet, elle retrouve un risque de survenue d'HAI augmenté chez les apparentés au premier degré, avec un risque cumulé à 10 ans de 0,10% (IC95% 0,04-0,23) ; et une mesure d'héritabilité, ou taux de concordance entre les jumeaux, plus élevée chez les jumeaux monozygotes que chez les jumeaux dizygotes (8,7% (IC95% 1,1-28) vs 0%) (Grønbaek, 2018).

Cependant, on ne retrouve que quelques cas de formes familiales d'HAI dans la littérature, et très peu de patients ont des membres de leur famille atteints d'HAI au sein de grandes cohortes multicentriques (van Gerven, 2014). De plus, la même cohorte danoise ne montre pas d'augmentation du risque de survenue de pathologies auto-immunes extra-hépatiques dans les familles de patients atteints d'HAI, que ce soit chez les apparentés au premier ou au second degré, par rapport à la population générale (Grønbaek, 2019).

Ces données, qui semblent discordantes, peuvent expliquer la rareté de l'HAI dans la population générale. Ainsi, une forte charge de variants génétiques délétères pour les points de contrôles serait nécessaire pour déclencher la réaction auto-immune spécifique de l'HAI, correspondant aux apparentés de premier degré et aux jumeaux monozygotes. Les apparentés plus éloignés ne porteraient pas suffisamment de variants génétiques délétères pour être malade.

4. HAI et syndromes auto-immuns monogéniques

Un autre argument en faveur de la rupture de tolérance par des mutations dans des gènes-clés est la présence d'HAI au sein du spectre clinique de plusieurs syndromes auto-immuns monogéniques.

Dans une cohorte récente de patients atteints du syndrome APECED, une HAI a été diagnostiquée chez 27% des patients, avec un début pédiatrique et une prédominance féminine de 5/1 (Meloni, 2012). Dans une autre cohorte, l'HAI est présente chez 21,5% des patients, dont deux tiers avec des anticorps anti-LKM-1 et un tiers avec des anticorps anti-muscle lisse (Garelli, 2021). Rarement inaugurale, l'HAI a une évolution très variable, allant de formes modérées répondant bien aux immunosuppresseurs à certaines formes fulminantes fatales (Meloni, 2012 ; Garelli, 2021).

Parmi les 30 patients atteints de syndrome IPEX par mutations dans *FOXP3* rapportés récemment, 14% ont développé une hépatite, avec la présence d'auto-anticorps anti-muscle lisse dans la moitié des cas (Duclaux-Loras, 2018).

L'association d'une HAI avec une mutation de *GATA2* a été rapportée chez une patiente. *GATA2* code pour un facteur de transcription des cellules hématopoïétiques, et les mutations de ce gène se manifestent cliniquement par une monocytopénie, des déficits dans les DC et les lymphocytes B, une myélodysplasie, un déficit immunitaire et parfois une déplétion des T_{REG} (Webb, 2016).

Dans un cas rapporté récemment, une patiente atteinte de déficit en CTLA-4 présente, par ailleurs, une HAI (Al Baroudi, 2019).

Dans la littérature, une HAI de type 2 associée à des auto-anticorps anti-LKM-1 et anti-LC-1, répondant bien au traitement immunosuppresseur, a été rapportée une fois chez un patient atteint d'ALPS avec mutation de *FAS* (Pensati, 1997).

Ces syndromes monogéniques rares permettent d'approfondir les connaissances sur les réponses immunitaires en général et sur le maintien de la tolérance en particulier. Ils exposent le phénotype généré par la présence de mutations délétères rompant des points de contrôle majeurs. Dans ces situations, le développement d'une réponse auto-immune ciblant le foie confirme le rôle de la rupture de tolérance dans la pathogénèse de l'HAI et souligne l'intérêt de rechercher des variants génétiques délétères dans la tolérance immunitaire.

En effet, à ce jour, aucune étiologie monogénique d'HAI n'a été identifiée, malgré des études génétiques multiples et poussées.

5. Facteurs environnementaux

Au vu de la variabilité de la prévalence, de la complexité du terrain génétique, d'un risque prédominant chez les apparentés au premier degré par rapport aux autres, et de l'absence d'HAI monogénique identifiée à ce jour, le rôle de facteurs environnementaux dans la pathogénèse de l'HAI et/ou dans son déclenchement a fait l'objet de nombreuses recherches, retrouvant des facteurs de risque parfois étonnants.

Dans une étude cas-contrôle néo-zélandaise, Ngu *et al* mettent en évidence un facteur de risque indépendant : la prise d'antibiotiques dans les 12 mois précédents le diagnostic d'HAI. En revanche, ils retrouvent deux facteurs protecteurs indépendants : la consommation d'alcool et le chauffage au bois dans l'enfance (Ngu, 2013).

Dans une grande étude suédoise publiée récemment, Thomsen *et al* démontrent un risque de survenue d'HAI multiplié par 3,83 pour les fratries et par 6 pour les conjoints, par rapport à la population générale (Thomson, 2020).

Ces résultats suggèrent l'existence de facteurs de risque environnementaux majeurs.

6. Rôle du microbiote intestinal

Le foie entretient une intime relation avec l'intestin, soulignant l'intérêt de l'étude du microbiote intestinale dans les pathologies hépatiques en général et dans l'HAI en particulier.

La première étude cas-contrôle, conduite en 2015, sur 17 patients atteints d'HAI et 15 individus sains, montre une altération de la barrière intestinale, une dysbiose du microbiote intestinal (déséquilibre dans les proportions de bactéries) et des signes de translocation bactérienne chez les patients par rapport aux individus sains (Lin, 2015).

Une étude plus large sur 91 patients atteints d'HAI avant l'introduction de la corticothérapie retrouve une diminution de la diversité bactérienne par rapport aux individus sains, avec une surreprésentation significative de certaines familles bactériennes (Wei, 2020).

Ces résultats démontrent l'altération du microbiote intestinal concomitante à l'activité de l'HAI, sans présupposer d'un lien de causalité.

c. Eléments de physiopathologie

i. Modèle proposé

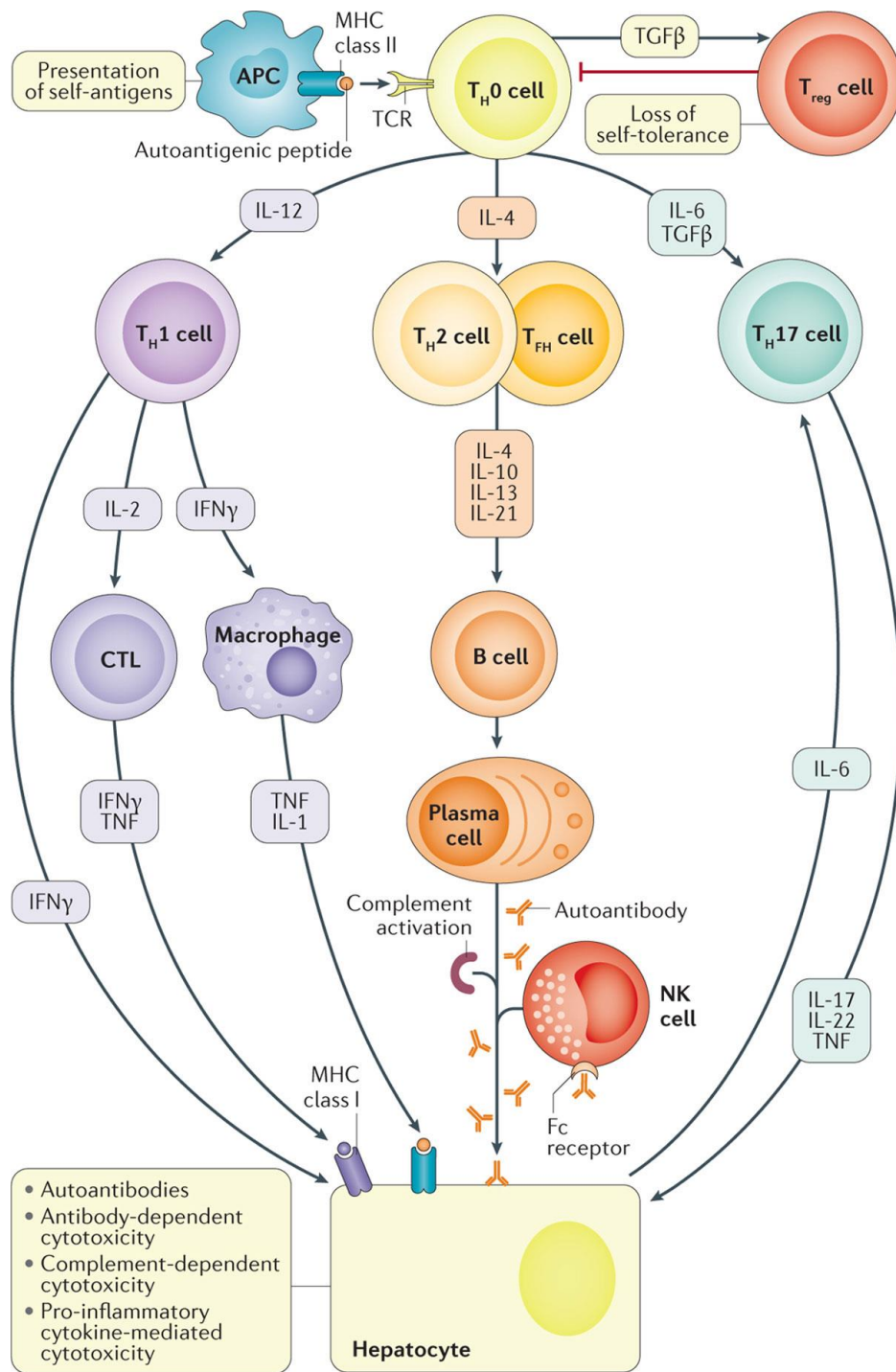
Il est clair que l’HAI est une véritable pathologie auto-immune. Elle satisfait à tous les critères canoniques : (1) présence d’auto-anticorps bien caractérisés qui réagissent à l’organe cible ; (2) identification des antigènes-cibles de ces auto-anticorps ; (3) auto-anticorps similaires accompagnant les hépatites lymphocytaires dans les modèles murins (Rose, 1993). Cependant, nul n’a fait la preuve du déclenchement de l’HAI par transfert du sérum de patients.

Malgré les nombreuses observations générées par l’étude des mécanismes moléculaires et cellulaires de l’HAI, aucun processus physiopathologique simple n’a pu être établi, et l’importance relative de chaque mécanisme proposé reste difficile à déterminer (Webb, 2018).

Ceci dit, un modèle simplifié similaire à ce qui est proposé dans d’autres pathologies auto-immunes fournit un support de travail permettant de prendre en compte collectivement la complexité des mécanismes envisagés, illustré par la Figure 5 (Webb, 2018).

Un stimulus puissant et encore non-identifié déclenche la formation d’un infiltrat massif de cellules inflammatoires intra-hépatique, présent au diagnostic de l’HAI. Quel que soit le facteur déclenchant initial, il est probable qu’un grand nombre de cellules inflammatoires activées génèrent des lésions hépatiques. La réponse immunitaire peut endommager les hépatocytes par : (1) cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ auto-réactives activées ; (2) destruction par les macrophages ; (3) activation du complément ; (4) opsonisation des hépatocytes par les auto-anticorps (Liberal, 2011).

Figure 5. Modèle proposé de la physiopathologie de l'hépatite auto-immune



Nature Reviews | Disease Primers

Illustration adaptée de Mieli-Vergani, 2018. Le peptide antigénique du soi non encore identifié qui déclenche la réaction immunitaire T est présenté aux lymphocytes T naïfs par les cellules présentatrices d'antigène. La réponse auto-immune est initiée, échappant aux mécanismes de tolérance périphérique comme les lymphocytes T régulateurs. Les lymphocytes T activés se différencient (1) en lymphocytes T_H1 qui recrutent les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages ; (2) en lymphocytes T_H2 qui migrent dans les organes lymphoïdes secondaires et stimulent les lymphocytes B qui se différencient alors en plasmocytes sécrétant de grandes quantités d'auto-anticorps non spécifiques et (3) en lymphocytes T_H17 dont le rôle précis n'est pas encore identifié en dehors de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, les lésions hépatiques peuvent être induits par (1) opsonisation par les auto-anticorps, (2) activation du système du complément médiée par les auto-anticorps, (3) cytotoxicité liée aux cytokines pro-inflammatoires et le système du complément ; (4) activité combinée de l'immunité innée (macrophages, cellules NK) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T cytotoxiques). Une fois endommagés, les hépatocytes exposent davantage d'antigènes du soi, produisant une boucle d'auto-amplification de la réponse inflammatoire qui ne peut cesser qu'après leur destruction totale.

ii. Anomalies immunitaires retrouvées

1. Lymphocytes intra-hépatiques

L'infiltration massive de lymphocytes T antigènes-spécifiques dans le foie est retrouvée dès les premières investigations physiopathologiques de l'HAI. De plus, ces lymphocytes constituent un compartiment spécifique avec un répertoire restreint de TCR V β 3+ dans le tissu hépatique par rapport aux cellules circulantes (Arenz, 1998).

Par ailleurs, l'étude des T_{REG} issus du foie montre une accumulation intra-hépatique des T_{REG} chez les patients atteints d'une HAI de type 1 non traitée suivie d'une réduction majeure sous traitement immunosuppresseur (Taubert, 2014 ; Diestelhorst, 2017).

Ainsi, non seulement la réaction auto-immune met en jeu des lymphocytes T effecteurs particuliers, mais les lymphocytes T_{REG} semblent jouer un rôle proportionnel à l'activité de la pathologie.

2. Lymphocytes T_H17

Plus récemment, Liang *et al* ont étudié le phénotype lymphocytaire de 32 patients atteints d'HAI par cytométrie en flux. Les patients atteints d'HAI en poussée présentent des nombres significativement réduits de lymphocytes T_{REG} (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), des nombres plus élevés de lymphocytes T (CD3⁺CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻), de lymphocytes T_H1 (CD3⁺CD4⁺IFN γ ⁺), de lymphocytes T_H17 (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺) et de lymphocytes T_H22 (CD3⁺CD4⁺IL-2⁺) et des niveaux augmentés de profils de cytokines T_H1, T_H17 et T_H22 par rapport aux patients HAI en rémission et par rapport aux individus sains (Liang, 2018).

De plus, les nombres de lymphocytes T_{REG} (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) sont inversement corrélés aux nombres de lymphocytes T_H1, T_H17 et T_H22 (Liang, 2018). Le rôle des T_H17 dans l'HAI est évoqué par une autre étude montrant une élévation significative des taux plasmatiques d'IL-17 et d'IL-23 et de lymphocytes T_H17 intra-hépatiques des patients atteints d'HAI, par rapport aux individus sains et aux patients atteints d'autres types d'hépatites chroniques (Zhao, 2011).

3. Cytokines

L'expression hépatique d'IL-17, IL-23, IL-6 et IL-1 β est significativement augmentée chez les patients avec HAI, et associée à une inflammation et une fibrose plus importante (Zhao, 2011).

Les taux plasmatiques d'IL-17A et IL-22 sont proportionnels à la cytolysé hépatique, alors que les taux sériques d'IL-10 sont inversement corrélés à l'hypergammaglobulinémie chez les patients atteints d'HAI (Liang, 2018).

Par ailleurs, le taux plasmatique d'IL-2 est dix fois plus bas chez les patients atteints d'HAI sous traitement qu'avant traitement (Diestelhorst, 2017).

4. Lymphocytes T_{REG}

De nombreux travaux montrent le rôle majeur des T_{REG} dans l'HAI au cours du temps (Longhi, 2021). Cependant, aucun n'a réussi à préciser si le défaut des T_{REG} constitue l'événement initial responsable de la rupture de tolérance immunitaire ou s'il résulte de la pathologie en elle-même.

Dès les années 1980, les lymphocytes T de patients atteints d'HAI présentent une activité suppressive diminuée avant traitement, restaurée par le traitement par prednisolone. Ce défaut n'est pas observé pour les patients atteints d'hépatite B chronique (Nouri-Aria, 1982).

Plus tard, un défaut quantitatif et fonctionnel des lymphocytes T_{REG} (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) est retrouvé chez les patients atteints d'HAI par rapport aux individus sains : ils sont déficients dans leur capacité à se multiplier et à réguler la prolifération des lymphocytes T CD8 et la production d'IL-4 (Longhi, 2004 ; Longhi, 2005). La restauration de cette activité en période de rémission suggère un rôle du traitement immunosuppresseur dans la reconstitution de la fonction des T_{REG} (Longhi, 2005).

Le défaut de fréquence et de fonction des T_{REG} circulants a été montré chez les patients pédiatriques et adultes atteints d'HAI, associé à une augmentation des lymphocytes T $\gamma\delta$ présentant un ratio

inversé de V δ 1/V δ 2 et une production plus importante d'IFN γ et de granzyme B (Ferri, 2010). Ce défaut des T_{REG} a été remis en question par un groupe allemand qui ne l'a pas retrouvé dans sa cohorte de patients atteints d'HAI (Peiseler, 2012).

D'autre part, les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs des patients atteints d'HAI présentent une expression diminuée d'un récepteur inhibiteur (Tim-3, *T-cell immunoglobulin and mucin domain containing molecule 3*) qui, lorsqu'il reconnaît la galectine-9 exprimée par les T_{REG}, induit la mort du lymphocyte effecteur (Liberal, 2016).

Ainsi, les lymphocytes T_{REG} émergent comme des acteurs majeurs de la physiopathologie de l'HAI.

iii. Eléments déclenchants extérieurs

1. Infections virales

Un certain nombre de cas d'HAI semble déclenché par des infections virales (Vento, 2004).

Dans les années 1990, la persistance de parties du génome du virus de la rougeole est retrouvée chez des patients atteints d'HAI, suggérant un rôle dans l'apparition de la pathologie (Robertson, 1987).

Certaines observations soutiennent le rôle de l'infection au virus de l'hépatite A (VHA) dans le déclenchement de l'HAI chez des patients prédisposés génétiquement (porteurs d'un sérotype HLA associé aux pathologies auto-immunes en général et à l'HAI en particulier) (Hilzenrat, 1999). Une corrélation a été observée entre la gravité des lésions hépatiques de l'HAI et la persistance de l'infection par le VHA (Tabak, 2008).

Lors du suivi d'apparentés au premier degré de patients atteints d'HAI, deux sur treize ont développé une HAI après une infection à EBV (Vento, 1995).

Le rôle de l'infection au virus de l'hépatite C (VHC) est étayée par la présence d'anticorps anti-VHC chez les patients porteurs d'anticorps anti-LKM-1 circulants puis par l'association chronologique entre l'infection à VHC et la survenue d'une HAI de type 2 (Lenzi, 1990 ; Vento, 1997).

Un cas d'HAI survenu un mois après une primo-infection à VZV (*Varicella Zoster Virus*) est rapporté chez un jeune homme de 23 ans (Al-Hamoudi, 2009). Un autre cas d'association entre une HAI et une infection à CMV (cytomégalovirus) est décrit chez une patiente de 63 ans (Toyoda-Akui, 2011). Enfin, un cas d'HAI déclarée 7 ans après une infection à VIH (virus de l'immunodéficience humaine) est également observé chez un patient de 52 ans (Hagel, 2012).

L'ensemble de ces données soutient l'hypothèse d'un déclenchement de l'HAI par mimétisme moléculaire et/ou extension épitopique en rapport avec tout ou partie de génomes viraux (paragraphe b « Auto-immunité », partie 1).

2. Molécules thérapeutiques

L'HAI peut être déclenchée par un certain nombre de médicaments listés dans le Tableau 3 (Czaja, 2011).

Tableau 3. Médicaments inducteurs d'hépatite auto-immune

Association certaine	Dihydralazine
	Halothane
	Methyldopa
	Minocycline
	Nitrofurantoïne
	Oxiphenisatin
	Tienilic acid
Association probable ou possible	Atorvastatine
	Clométacine
	Diclofénac
	Infliximab
	Isoniazide
	Propylthiouracil
	Adalimumab
	Benzarone
	Cephalexin
	Fenofibrate
	Indométacine
	Imatinib
	Meloxicam
	Méthylphénidate
	Papaverine
	Pemoline
	Phenprocoumon
	Prometrium
	Rovusastin
	Terbinafine

3. Expositions extérieures

Des agents extérieurs sont souvent proposés comme facteurs déclenchants de l'auto-immunité. Comme dans d'autres pathologies auto-immunes, ces agents ont été recherchés dans l'HAI.

Une équipe polonaise a émis l'hypothèse que la nourriture pour poissons pouvait contenir des antigènes volatiles qui, à long terme, pourrait être le facteur déclenchant de l'HAI retrouvée chez un adolescent aquariophile, du fait d'une rémission au retrait de l'exposition (Prandota, 2002). Une équipe américaine a évoqué une potentielle réactivité croisée en rapport avec une longue exposition aux champignons sauvages ramassés à la main dans l'initiation de l'HAI chez une patiente de 70 ans (Rogart, 2008). Plus récemment, la présence d'un animal de compagnie (en particulier un chat) a été rapportée comme facteur de risque de développer une pathologie auto-immune hépatique dans une étude cas-contrôles incluant 71 patients de moins de 16 ans (Tenca, 2016).

Au vu de l'étrangeté des agents identifiés, il paraît peu probable que ces facteurs soient déterminants dans l'apparition de l'HAI, par rapport aux autres associations évoquées précédemment. De plus, l'évolution souvent fluctuante de l'HAI, constellée de rechutes et de rémissions spontanées, plaide en faveur d'une association plutôt fortuite que causale.

d. Diagnostic

i. Présentations cliniques

L'HAI peut se présenter sous différentes formes : (1) de façon aiguë, avec des symptômes aspécifiques de malaise, nausées, vomissements, anorexie, douleurs articulaires et abdominales, ictère, urines foncées, selles claires ; (2) de façon insidieuse, plusieurs mois ou années avant le diagnostic, avec des symptômes aspécifiques mais croissants de fatigue, aménorrhée, céphalées, anorexie, douleurs articulaires et abdominales, diarrhée, amaigrissement ; (3) par des complications de la cirrhose et de l'hypertension portale, (hématémèse sur varices œsophagiennes ou gastriques, splénomégalie) en l'absence d'antécédent connu de pathologie hépatique ; (4) de façon fortuite, devant une élévation des transaminases sans signe clinique (Mieli-Vergani, 2018).

ii. Caractéristiques biologiques

L'HAI est caractérisée par une élévation des transaminases (aspartate aminotransférase, alanine aminotransférase) et gamma-glutamyl transférase (GGT) avec des taux normaux ou légèrement élevés de PAL (phosphatase alcaline) (Manns, 2010 ; EASL, 2015). Des fluctuations spontanées des taux de transaminases plasmatiques peuvent survenir sans remettre en question le diagnostic d'HAI (EASL, 2015). Les niveaux de bilirubine libre et totale sont variables chez les patients, allant de taux normaux à significativement trop élevés (Mieli-Vergani, 2018).

Au diagnostic, les gammaglobulines ou les taux d'IgG sont élevés chez près de 85% des patients (Manns, 2010 ; EASL, 2015).

iii. Auto-anticorps circulants

La production abondante d'auto-anticorps circulants est une des caractéristiques principales de l'HAI. Le Tableau 4 récapitule les anticorps qui peuvent être retrouvés, leur cible et leur spécificité.

1. Anticorps anti-nucléaires

Les auto-anticorps anti-nucléaires retrouvés dans l'HAI ciblent la chromatine entière, incluant l'ADN, les centromères, les histones, les sn-RNPS, et la cycline A (Czaja, 1994). En effet, ils sont retrouvés dans de nombreuses autres pathologies, notamment hépatiques, telles que les hépatites chroniques B ou C.

2. Anticorps anti-muscle lisse

Les anticorps anti-muscle lisse retrouvés ciblent principalement l'actine, la troponine ou la tropomyosine présents dans les cellules musculaires lisses (Johnson, 1965). Les anticorps anti-actine ciblent l'actine filamenteuse et sont considérés comme des marqueurs du diagnostic d'HAI de type 1 s'ils sont évalués avec soin (Czaja, 1996). Comme les anticorps anti-nucléaires, les anticorps anti-muscle lisse sont retrouvés dans d'autres pathologies auto-immunes ou virales, mais avec des titres moins élevés (Christen, 2018).

3. Anticorps anti-LKM-1

La cible des anticorps anti-LKM-1 est l'isoforme 2D6 de la grande famille enzymatique des cytochromes P450 (CYP2D6) (Homborg, 1987 ; Zanger, 1988). En dehors du CYP2D6, deux autres cibles ont été identifiées : ERp57 et carboxylestérase 1 (CES1) (Komurasaki, 2010). Les anticorps anti-LKM-1 peuvent être utilisés pour le diagnostic d'HAI si une infection à VHC est exclue, car la réactivité au CYP2D6 est aussi retrouvée chez les patients atteints d'hépatite C chronique (Christen, 2018).

4. Anticorps anti-LC-1

Les anticorps anti-LC-1 reconnaissent la formiminotransférase cyclodéaminase, une enzyme hépatique spécifique de 58 kDa (Lapierre, 1999). Comme les anticorps anti-LKM-1, ils sont considérés comme des marqueurs du diagnostic d'HAI de type 2. Les anticorps anti-LKM-1 et LC-1 peuvent survenir séparément ou simultanément dans les HAI de type 2 (Krawitt, 2006).

5. Autres anticorps

Les anticorps anti-SLA/LP sont très spécifiques des HAI de type 1 (98,9%), mais ne sont retrouvés que dans 10 à 30% des cas (Krawitt, 2006 ; Mieli-Vergani, 2018). Ils sont présents chez des patients avec une pathologie plus sévère et un pronostic plus sombre. Ils ciblent la Sep(O-phosphoserine)tRNA : Sec(selenocysteine)tRNA synthase (SEPSECS) (Mieli-Vergani, 2011).

Certains patients présentent des pANCA (*peripheral antinuclear neutrophil antibodies*) désignés comme atypiques car ils reconnaissent la beta-tubuline de type 5, alors que les pANCA typiques reconnaissent la myéloperoxydase. Les pANCA atypiques sont souvent présents dans les HAI de type 1, mais rarement de façon isolée (Krawitt, 1999).

Les anticorps anti-LKM-2 reconnaissent le cytochrome P450 2C9 et peuvent être détectés dans l'HAI, mais sont principalement associés aux hépatites induites par l'acide tienilique (Christen, 2018).

Les anticorps anti-LKM-3 qui reconnaissent la famille 1 des UDP glucuronosyltransférases sont parfois détectés chez les patients atteints d'HAI. Ils sont considérés comme peu significatifs dans l'HAI, car on les retrouve aussi dans un certain nombre de patients atteints d'hépatite D, et qu'ils ont une faible sensibilité (Christen, 2018).

Les anticorps anti-LSP (*liver specific membrane lipoprotein*) qui réagissent au récepteur de l'asialoglycoprotéine (ASGPR) fortement exprimé à la surface hépatocytaire, sont retrouvés chez 88% des patients et pourraient être un marqueur de l'HAI, mais non spécifiques, car ils sont aussi retrouvés chez les patients atteints d'autres hépatopathies, notamment les hépatites B et C chroniques, la cirrhose biliaire primitive ou l'hépatopathie alcoolique (Christen, 2018).

Une équipe française a rapporté la présence d'anticorps anti-phospholipides chez 70,8% des patients atteints d'HAI, sans association particulière avec des caractéristiques cliniques, biologiques ou histologiques (Krawitt, 2006 ; Branger, 2007).

Tableau 4. Auto-anticorps identifiés dans l'HAI

Anticorps	Cible	Type d'HAI	Pathologies associées
Anti-nucléaires	Chromatine entière : ADN, Centromères, Histones, Sn-RNPs, Cycline A	HAI (non spécifique)	Hépatites B ou C Autres pathologies auto-immunes
Anti-muscle lisse	Actine filamenteuse, Troponine, Tropomyosine présents dans les cellules musculaires lisse	HAI (Spécifique si titre élevé et évaluation avec soin)	Autres pathologies auto-immunes ou virales (titres moins élevés)
Anti-LKM-1	CYP2D6, ERp57, CES1	HAI (Spécifique si VHC exclu)	Hépatites virales C
Anti-LKM-2	CYP2C9	HAI	Hépatites induites par l'acide tienilique
Anti-LKM-3	Famille 1 des UDP glucuronosyltransférases	HAI (Faible sensibilité)	Hépatites virales D
Anti-LC-1	Formiminotransférase cyclodéaminase	HAI (Spécifique)	
Anti-SLA/LP	SEPSECS	HAI (Très spécifique)	
pANCA	β -tubuline de type 5	HAI	
Anti-LSP	Récepteur de l'asialoglycoprotéine	HAI (Non spécifique)	Hépatites chroniques B et C CBP, Hépatopathie alcoolique
APL	Cardiolipine, B2-GP1	HAI	

APL : anti-phospholipides ; CBP : cirrhose biliaire primitive ; CES1 : carboxylestérase 1 ; CYP2C9 : isoforme 2C9 des cytochromes P450 ; CYP2D6 : isoforme 2D6 des cytochromes P450 ; LC-1 : *liver cytosol 1* ; LKM-1 : *liver kidney microsome type 1* ; LSP : *liver specific membrane lipoprotein* ; pANCA : *peripheral antinuclear neutrophil antibodies* ; SEPSECS : Sep(O-phosphoserine)tRNA :Sec(selenocysteine)tRNA synthase ; SLA/LP : *soluble liver antigen/ liver pancreas*

iv. Histologie hépatique

1. Caractéristiques histologiques typiques

L'histologie hépatique est importante pour confirmer ou renforcer le diagnostic clinique d'HAI (Figure 6). Elle est surtout nécessaire pour rechercher des diagnostics différentiels, les présentations clinico-biologiques n'étant pas spécifiques de l'HAI. Elle peut également révéler la présence concomitante d'autres pathologies, en particulier métaboliques liées à l'obésité ou au diabète. Enfin, l'histologie hépatique reste la référence pour évaluer les lésions nécro-inflammatoires et déterminer le stade de fibrose et de remodelage architectural (Tiniakos, 2015).

Les caractéristiques histologiques en faveur du diagnostic d'HAI sont : l'hépatite d'interface, la formation de rosettes hépatocytaires et l'empéripolèse (de Boer, 2015). Aucune de ces caractéristiques n'est ni spécifique ni pathognomonique de l'HAI.

L'hépatite d'interface correspond à un infiltrat de cellules mononucléées inflammatoires à l'interface péri-portal (ou lame bordante) qui s'étend dans le lobule (Figure 6A). Elle peut être modérée à sévère et contient des lymphocytes, des histiocytes, des plasmocytes, parfois des éosinophiles et des neutrophiles. La prédominance de plasmocytes est typique de l'HAI mais n'est présente que dans deux tiers des biopsies et son absence n'exclut pas le diagnostic. L'hépatite d'interface est retrouvée chez 84 à 98% des patients atteints d'HAI, de façon plus marquée en cas de poussée, et généralement plus sévère chez les patients atteints d'HAI que dans les hépatites chroniques d'autres étiologies, comme les hépatites virales aiguës ou chroniques, la maladie de Wilson, la cholangite sclérosante primitive et la cirrhose biliaire primitive (Tiniakos, 2015).

L'empéripolèse désigne la présence d'un lymphocyte ou, plus rarement, d'un plasmocyte dans le cytoplasme d'hépatocytes (Figure 6B). Elle est retrouvée dans 65 à 78% des patients atteints d'HAI (de Boer, 2015). Elle est plus fréquente dans l'HAI que dans les hépatites virales chroniques ou les cirrhoses biliaires primitives et contient plus souvent des lymphocytes T CD8⁺. Le mécanisme d'empéripolèse est utile pour lyser les lymphocytes T auto-réactifs dans le maintien de la tolérance immunitaire. Dans l'HAI, elle participerait aux lésions hépatiques (Benseler, 2011).

La formation de rosettes hépatocytaires est un indicateur de régénération qui suit les lésions des lobules hépatiques (Figure 6C). Les rosettes sont de petits groupes d'hépatocytes organisés autour d'une petite lumière centrale, parfois invisible. Elles sont plus fréquentes chez les patients atteints d'HAI (49% des cas) que dans d'autres hépatites chroniques virales (de Boer, 2015).

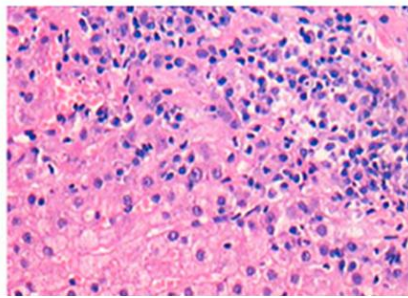
2. Autres caractéristiques histologiques

L'inflammation lobulaire de l'HAI se présente généralement par des foyers nécro-inflammatoires éparpillés (nécrose parcellaire) confluents ou formant des nécroses en pont (Figure 6D). On peut aussi observer des lésions hépatocytaires avec une ballonnisation et/ou une apoptose. Dans les cas sévères, on retrouve quelques macrophages organisés en micro-granulomes. Comme dans d'autres hépatites, la fibrose qui se développe dans l'HAI est issue de la régénération suivant les lésions tissulaires et peut évoluer *in fine* vers la cirrhose. Au fil de la progression de la fibrose, on remarque une prolifération ductulaire avec une réaction inflammatoire associée (Tiniakos, 2015).

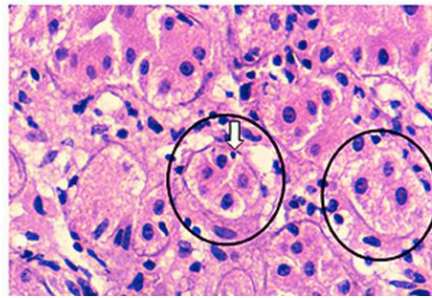
La nécrose centro-lobulaire est observée dans 29% des biopsies de patients atteints d'HAI (Figure 6E). Elle n'est pas corrélée à un phénotype clinique ou un profil d'auto-anticorps particulier et sa présence ne modifie pas la prise en charge des patients (Miyake, 2007).

La destruction de canaux biliaires est identifiée dans 12% des biopsies de patients atteints d'HAI (Figure 6F), et l'infiltration lymphocytaire de l'épithélium canalaire (cholangite lymphocytaire) dans 12 à 29% des cas (Figure 6G). Ces atteintes biliaires ne sont pas des caractéristiques suffisantes pour éliminer le diagnostic d'HAI ni conclure à un syndrome de chevauchement entre deux hépatopathies auto-immunes (de Boer, 2015). De plus, la présence ou non de ces atteintes biliaires n'est pas associée à un quelconque profil sérologique ni à une réponse particulière au traitement (Tiniakos, 2015). Quelques granulomes mal caractérisés peuvent être observés dans 9 à 11% des cas d'HAI (de Boer, 2015). La cirrhose est présente au diagnostic chez un tiers des patients atteints d'HAI, souvent de type macro-nodulaire. Elle n'a aucune caractéristique spécifique de l'HAI (Tiniakos, 2015). Les scores d'activité inflammatoire et de fibrose mis au point pour les hépatites chroniques peuvent être employés dans l'HAI. Le score METAVIR est facile à utiliser en pratique courante et a une faible variabilité inter-observateur (METAVIR, 1994).

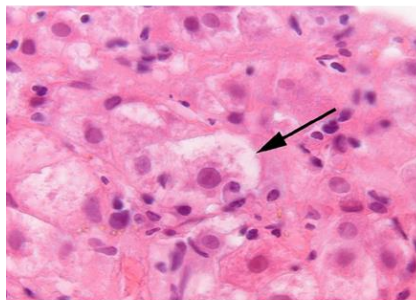
Figure 6. Caractéristiques histologiques de l'hépatite auto-immune



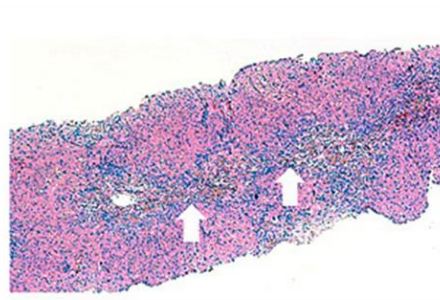
A. Hépatite d'interface : infiltrat lymphoplasmocytaire s'étendant dans le lobule (H&E x200)



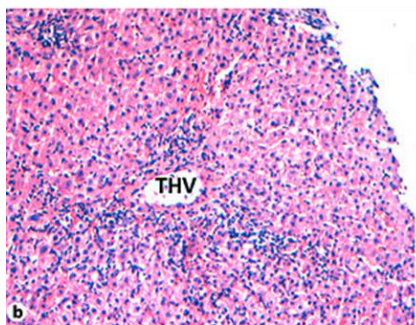
B. Rosettes hépatocellulaires (H&Ex400)



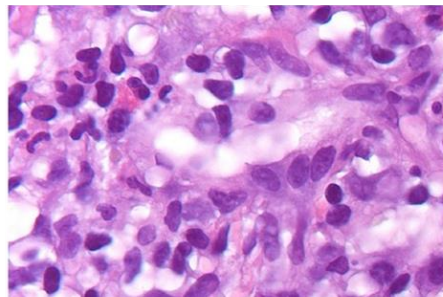
C. Empéripolèse



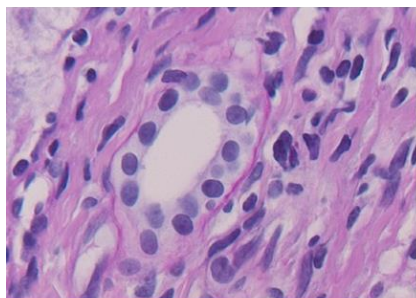
D. Nécrose en pont (H&Ex40)



E. Nécrose centro-lobulaire (H&Ex100)



F. Destruction des canaux biliaires



G. Cholangite lymphocytaire

v. Scores diagnostiques

Devant la diversité de présentation clinique et l'hétérogénéité des caractéristiques biologiques et histologiques, les sociétés savantes ont établi différents scores diagnostiques dans l'objectif d'homogénéiser les cohortes de patients.

Le premier score est révisé par l'IAIHG (*International Autoimmune Hepatitis Group*) en 1999 (Tableau 5), puis des critères simplifiés sont publiés en 2008 (Tableau 6) (Alvarez, 1999 ; Hennes, 2008).

Les critères de ce score concernent principalement les adultes, avec certains paramètres moins pertinents pour la population pédiatrique, motivant les pédiatres de l'ESPGHAN (*European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology And Nutrition*) à proposer un score dédié aux enfants (Tableau 7) (Mieli-Vergani, 2018).

Ces différents scores sont présentés dans les 3 tableaux suivants.

Tableau 5. Score diagnostique de l'IAIHG

Paramètres	Options	Score
Sexe	Féminin	+2
Ratio ALP:AST	>3	-2
	1.5-3	0
	<1.5	+2
Gammaglobulines ou IgG (nombre de fois la normale)	>2	+3
	1.5-2	+2
	1-1.5	+1
	<1	0
Titres d'anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM-1 ou anti-LC-1	>1:80	+3
	1:80	+2
	1:40	+1
	<1:40	0
Anti-mitochondrie	Positif	-4
Marqueurs d'une infection virale active	Positif	-3
	Négatif	+3
Traitements hépatotoxiques	Oui	-4
	Non	+2
Consommation moyenne d'alcool	<25g/jour	+2
	>60g/jour	-2
Caractéristiques histologiques	Hépatite d'interface	+3
	Plasmocytes	+1
	Rosettes	+1
	Aucun des signes précédent	-5
	Modifications biliaires ^a	-3
	Modifications atypiques ^b	-3
Pathologies auto-immunes		+2
HLA	DR3/DR4	+1
Anti-SLA/LP, actin, ASGPR, pANNA		+2
Score avant traitement	HAI certaine	> 15
	HAI probable	10-15
Réponse au traitement	Rémission	+2
	Rechute	+3
Score après traitement	HAI certaine	>17
	HAI probable	12-17

^aIncluant la cholangite granulomateuse, la fibrose concentrique périductulaire, la ductopénie, la prolifération marginale des canaux biliaires et la cholangiolite. ^bToute autre caractéristique en faveur d'une autre étiologie. ALP : *alkalin phosphatase* ; ASGPR : *asialoglycoprotein receptor* ; AST : alanine aspartate ; HAI : hépatite auto-immune ; HLA : *human leukocyte antigen* ; IAIHG : *international autoimmune hepatitis group* ; IgG : immunoglobulines G ; LC-1 : *liver cytosol 1* ; LKM-1 : *liver kidney microsome 1* ; SLA/LP : *soluble liver antigen/liver pancreas* ; pANNA : *peripheral anti-neutrophil nuclear antibody*.

Tableau 6. Score simplifié de l'IAIHG

Paramètres	Options	Score
Anticorps anti-nucléaires	≥1 :40	1
	≥1 :80	2
Ou anti-muscle lisse	≥1 :40	1
	≥1 :80	2
Ou anti-LKM-1 ou anti-LC-1	≥1 :40	1
	≥1 :80	2
Ou SLA	Positif	2
IgG	>LSN	1
	>1.10 fois la LSN	2
Histologie hépatique	Compatible avec HAI	1
	Typique d'HAI	2
Absence d'hépatite virale	Oui	2
Score	HAI certaine	≥7
	HAI probable	≥6

IgG: immunoglobulines G ; HAI : hépatite auto-immune ; LC-1 : *liver cytosol 1* ; LKM-1 : *liver kidney microsome 1*; LSN : limite supérieure de la normale ; SLA: *soluble liver antigen*.

Tableau 7. Score de l'ESPGHAN

Paramètres	Options	Score
Max. 2 points pour l'addition d'anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM-1, anti-LC-1, anti-SLA	Anti-nucléaires/muscle lisse $\geq 1 : 20$	1
	$\geq 1 : 80$	2
	Anti-LKM-1 $\geq 1 : 10$	1
	$\geq 1 : 80$	2
	Anti-LC-1	2
	Anti-SLA	2
pANNA	Positif	1
IgG	> LSN	1
	>1.20 LSN	2
Histologie hépatique	Compatible avec HAI	1
	Typique d'HAI	2
Absence d'autre pathologie hépatique		2
Pathologie extra-hépatique	Auto-immunité	1
Antécédents familiaux	Auto-immunité	1
Cholangiographie	Normale	2
	Anormale	-2
Score	HAI certaine	≥ 8
	HAI probable	≥ 7

ESPGHAN : *european society of pediatric gastroenterology hepatology and nutrition*; HAI : hépatite auto-immune ; LC-1: *liver cytosol 1*; LKM-1: *liver kidney microsome 1*; LSN : limite supérieure de la normale ; pANNA: *peripheral anti-neutrophil nuclear antibody* ; SLA: *soluble liver antigen*

e. Prise en charge

i. Traitement de référence

1. Rationnel scientifique

L'HAI est la première pathologie hépatique chronique dans laquelle un traitement médical a permis de prolonger la survie. Plusieurs essais thérapeutiques randomisés ont permis d'affirmer que les corticoïdes dans un premier temps, puis l'association des corticoïdes avec l'azathioprine, ont permis d'obtenir une amélioration majeure de la survie des patients atteints d'HAI (Kirk, 1980).

Ainsi, il est recommandé d'instaurer le traitement chez tout patient dès l'établissement du diagnostic d'HAI (Mack, 2020). Généralement, celui-ci est poursuivi pendant au moins deux ans (Strassburg, 2011).

Quel que soit le type d'HAI, le traitement de référence comprend des corticoïdes, associés ou non à l'azathioprine. Les deux stratégies thérapeutiques sont aussi efficaces l'une que l'autre. Cette stratégie de base repose toujours sur les résultats des essais réalisés il y a plus de 40 ans. Depuis cette époque, aucune étude multicentrique randomisée n'a été entreprise (Strassburg, 2011). Toutes les avancées dans les alternatives thérapeutiques sont issues de petites séries de patients, guidées par la nécessité de développer des solutions pour les patients réfractaires au traitement. Cependant, aucune recommandation n'a pu être émise sur les meilleurs traitements à utiliser en première, seconde ou troisième ligne (Lohse, 2020).

2. Corticoïdes

La prednisone ou son métabolite prednisolone peuvent être utilisés, sans différence d'efficacité. Quand les corticostéroïdes se lient aux récepteurs de glucocorticoïdes, ils induisent ou répriment la transcription de milliers de gènes par liaison directe à des éléments de réponse de l'ADN ou par association physique à d'autres facteurs de transcription (Vergani, 2021).

Leur utilisation se retrouve grevée de nombreux effets secondaires, parfois sévères, dont le diabète cortico-induit, l'ostéopénie, l'ostéonécrose aseptique, l'hypertension artérielle, la cataracte cortico-induite ou encore les symptômes psychiatriques. De plus, le traitement par corticostéroïdes à long terme conduit à l'apparition d'un syndrome de Cushing dont les conséquences esthétiques (prise de poids majeure, vergetures pourpres, acné...) poussent souvent les patients à arrêter leur traitement. Les effets secondaires surviennent chez 44% des patients dans les 12 premiers mois de traitement et chez 80% des patients après 24 mois de traitement (Strassburg, 2011).

3. Azathioprine

L'azathioprine permet de diminuer les doses de corticostéroïdes. Son mécanisme d'action reste peu compris, mais est probablement associé à la suppression de la synthèse d'acides nucléiques. Il existe un risque théorique de tératogénicité et d'oncogénicité. Les effets secondaires rencontrés par 10% des patients comprennent un inconfort abdominal, des nausées ou vomissements, une hépatite cholestatique ou encore des cytopénies. A fortes doses, l'azathioprine peut avoir une toxicité hépatique et médullaire (Vergani, 2021)

4. Efficacité

L'objectif du traitement est d'obtenir une rémission biologique, définie actuellement par la normalisation des transaminases et des taux d'IgG chez les adultes, associée à une négativation des auto-anticorps chez les enfants (Mack, 2020 ; Mieli-Vergani, 2018). Le traitement de référence conduit 80 à 90% des patients à la rémission, même en cas de cirrhose pré-existante (Czaja, 2002 ; Manns, 2010). Quand la poussée inaugurale de la pathologie est réfractaire au traitement de référence, les patients ont toujours un risque de lésions hépatiques évolutives (Muratori, 2010).

Les rechutes, caractérisée par une ré-augmentation des transaminases et la réapparition des symptômes cliniques, que ce soit sous traitement, après décroissance des corticoïdes ou après sevrage complet, surviennent chez 50% des patients dans les 6 mois de l'arrêt du traitement, et chez 80% des patients dans les 3 ans. Elles sont associées à une progression de la cirrhose dans 38% des cas, et à une défaillance hépatique dans 14% des cas.

Il devient alors nécessaire de reprendre un traitement, et conduit généralement à le poursuivre au long cours, avec le risque de survenue d'effets secondaires que cela comporte (Strassburg, 2011).

Seuls 10 à 20% des patients réussissent à maintenir un sevrage permanent (van Gerven, 2013).

ii. Alternatives thérapeutiques

1. Corticostéroïdes

Le budésonide limite en principe les effets secondaires systémiques par rapport aux corticostéroïdes conventionnels. Sa biodisponibilité absolue est près de 6 fois plus faible. Il a une plus grande affinité pour le récepteur des glucocorticoïdes, agit comme anti-inflammatoire et immunosuppresseur, et produit des métabolites inactifs. Les résultats sont discutés selon les cohortes de patients. Compte tenu de sa métabolisation hépatique, l'indication du budésonide dépendrait de la présence ou non d'une cirrhose (Strassburg, 2011).

Le deflazacort est un autre corticostéroïde qui s'accompagne de moins d'effets secondaires que les glucocorticoïdes conventionnels (Strassburg, 2011). Ce traitement a obtenu de bons résultats dans la seule étude pilote réalisée sur 15 patients, mais ces données nécessitent d'être confirmées par d'autres études (Rebollo Bernadez, 1999).

2. Antimétabolites

Le mycophénolate mofétil est un immunosuppresseur sélectif de la famille des antimétabolites. Il inhibe la synthèse des nucléotides à base de guanine. Il a un effet cytostatique plus marqué sur les lymphocytes que sur les autres cellules, conduisant à une diminution marquée de la prolifération des lymphocytes T et B. Le risque tératogène contre-indique sa prescription chez les femmes enceintes et allaitantes. Il existe aussi un risque oncogène de survenue de lymphomes ou d'autres tumeurs malignes, notamment cutanées. Les effets secondaires les plus fréquents sont la diarrhée, la leucopénie, les infections généralisées et les vomissements. En dehors du risque tumoral, il est important de surveiller l'apparition d'infections opportunistes (Strassburg, 2011).

C'est la molécule de seconde ligne la plus utilisée actuellement. Si les résultats des études initiales étaient mitigés, les données plus récentes retrouvent une efficacité satisfaisante, en particulier chez les patients intolérants à l'azathioprine (Vergani, 2021).

3. Agent alkylant

Le cyclophosphamide est un agent alkylant qui agit en formant des liaisons covalentes directement avec l'ADN. Cette action entraîne des modifications profondes chimiques ou enzymatiques de l'ADN, avec pour conséquence une inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN aboutissant à la destruction cellulaire (Strassburg, 2011).

Son utilisation dans le traitement des patients atteints d'HAI a été rapportée. Cependant, il présente un risque d'effets secondaires hématologiques graves qui en font une option thérapeutique hautement expérimentale (Strassburg, 2011).

4. Inhibiteurs des calcineurines

La ciclosporine A agit sur la signalisation calcium-dépendant et inhibe la fonction des lymphocytes T via le gène de l'IL-2. Elle produit de bons résultats en terme d'efficacité et de tolérance dans le traitement de patients atteints d'HAI (Debray, 1999). La principale difficulté concerne son profil de toxicité notamment rénale, en particulier au long terme : hypertension orale, insuffisance rénale, hyperlipidémie, hirsutisme, infection, oncogénicité (Strassburg, 2011).

Le tacrolimus a des capacités d'immunosuppression supérieures à celles de la ciclosporine A. Son mécanisme d'action est similaire, à la différence qu'il se lie à une autre immunophiline (Strassburg, 2011). Deux petites séries de patients réfractaires ont montré des résultats encourageants, mais nécessitent d'être confirmés par de plus grandes études (Van Thiel, 1995 ; Aqel, 2004).

5. Inhibiteurs de mTOR

La rapamycine (sirolimus) a été utilisée dans de très petites séries de patients réfractaires au traitement sans obtenir de résultats encourageants. Bien qu'environ 40% des patients se soient améliorés sur le plan biologique (décroissance des transaminases), les effets secondaires étaient fréquents, conduisant à arrêter le traitement : hyperlipidémie, ulcérations buccales, ulcères de jambes (Chatrath, 2014 ; Kurowski, 2014).

L'everolimus est un analogue de la rapamycine. Il a été utilisé chez 7 patients atteints d'HAI réfractaires au traitement de référence ou aux alternatives thérapeutiques, ou avec des effets secondaires sévères. Le traitement a permis la décroissance des transaminases, jusqu'à normalisation pour 3 d'entre eux, et sans effet secondaire sévère (Ytting, 2015). Ces résultats encourageants demandent à être confirmés par de plus larges études.

6. Biothérapies

Les biothérapies, comme les anticorps monoclonaux anti-TNF- α , anti-CD20, anti-CTLA-4, donnent des résultats ambivalents et peuvent avoir des effets secondaires graves (Vergani, 2021).

Quelques publications montrent que les anticorps monoclonaux anti-TNF α peuvent induire la rémission chez les patients atteints d'HAI réfractaires au traitement standard ou aux autres alternatives thérapeutiques (Strassburg, 2011).

Cependant, le développement d'hépatites auto-immunes ayant déjà été observé après un traitement par anti-TNF α , il convient de rester prudent (Strassburg, 2011).

De nouvelles options thérapeutiques sont en cours d'étude : (1) cibler les lymphocytes B, (2) cibler les cytokines pro-inflammatoires, (3) restaurer une tolérance par transfert adoptif de T_{REG} ou (4) par administration de faibles doses d'IL-2 (Vergani, 2021).

iii. Transplantation hépatique

Malgré la bonne réponse au traitement de référence par la plupart des patients, il reste encore des défis dans la prise en charge de l'HAI : (1) trouver un meilleur traitement de première ligne pour éviter les effets secondaires des corticoïdes et l'immunosuppression non sélective au long cours ; (2) traiter les patients intolérants ou réfractaires au traitement de référence ; (3) prévenir l'évolution vers la défaillance hépatique dans les présentations aiguës sous forme d'hépatite fulminante ; (4) permettre la réversion de la fibrose hépatique pour éviter les complications de la cirrhose, le décès et/ou la transplantation (Vergani, 2021).

Environ 10% des patients atteints d'HAI deviennent candidats à la transplantation hépatique, pour les indications suivantes : défaillance hépatique, présentation fulminante au diagnostic, pathologie réfractaire à tous les traitements immunosuppresseurs, décompensation cirrhotique (Strassburg, 2011).

L'HAI représente environ 3 à 4% des transplantations hépatiques réalisées aux Etats-Unis et au Royaume-Uni, entre 1995 et 2014. Ces chiffres correspondent à 0,84-0,44 greffons par millions d'individus par an (Webb, 2018). La survie des patients atteints d'HAI après transplantation hépatique est de 78,2 à 88,6% à 5 ans (Vogel, 2004).

Cependant, l'HAI peut récidiver ou se développer *de novo* après transplantation hépatique (Czaja, 2016). Le diagnostic d'HAI *de novo* sur greffon hépatique n'est pas codifié (Czaja, 2012). La fréquence de récurrence varie de 8% à 68%, notamment en fonction de la méthodologie employée dans les publications (Vogel, 2004). La récurrence survient dans 8 à 12% des cas à partir d'un an après la greffe ; et dans 36 à 68% des cas à partir de 5 ans après la greffe. Les récurrences d'HAI ou l'HAI *de novo* répondent de façon variable à la corticothérapie. Dans 60% des cas, une cirrhose peut survenir. La re-transplantation est nécessaire dans 8 à 50% des cas (Czaja, 2012).

II. Mécanismes en jeu

a. Interactions entre le foie et les agents extérieurs

i. Système porte

Le foie est constamment exposé aux agents extérieurs par sa fonction majeure de détoxification de l'organisme (Figure 7). Par le système porte, il reçoit le sang veineux de tous les organes digestifs sous-diaphragmatiques, de la rate et du pancréas. Ce sang est enrichi en protéines du non-soi issus des produits alimentaires et du microbiote résident, en endotoxines bactériennes, en bactéries commensales issues du tube digestif. Le système porte naît du réseau capillaire du tube digestif, du pancréas et de la rate, qui se rassemble pour former le tronc de la veine porte. Il se divise dans le foie en deux branches terminales, puis en rameaux interlobulaires qui s'anastomosent en réseaux péri-lobulaires et se termine par un second réseau capillaire. Les capillaires hépatiques, appelés sinusoides, permettent une transmission facile des molécules entre le flux sanguin lent et les hépatocytes. Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques forment un endothélium fenestré, perméable, sans membrane basale (Rouvière, 1978 ; Bogdanos, 2013 ; Heymann, 2016).

ii. Circulation systémique

Le foie est irrigué par le sang artériel enrichi en oxygène, et contenant les micro-organismes infectieux circulants, par l'artère hépatique. Celle-ci se ramifie dans le foie de la même manière que la veine porte (Rouvière, 1978). Le sang est ensuite drainé par les veines centro-lobulaires qui se réunissent en veines centrales ou veinules hépatiques terminales pour former les veines hépatiques qui rejoignent la veine cave inférieure par les veines sus-hépatiques (Bogdanos, 2013).

iii. Voies biliaires

La bile, constituée des pigments biliaires issus de la dégradation de l'hémoglobine et des acides biliaires, est libérée dans l'intestin par les voies biliaires et est nécessaire à l'absorption intestinale des graisses.

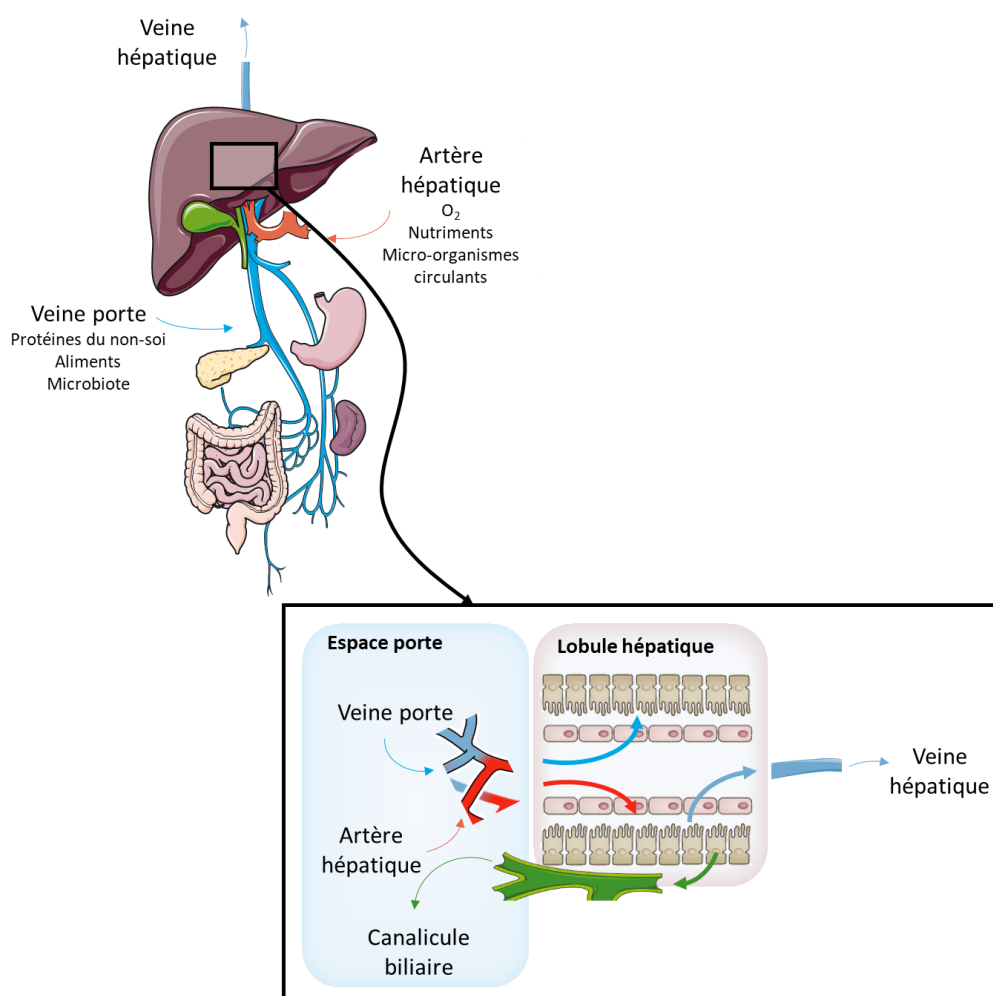
Les voies biliaires trouvent leur origine dans les canalicules intra-lobulaires compris entre les hépatocytes. Ces canalicules se jettent dans les canaux péri-lobulaires qui, anastomosés entre eux, se réunissent dans les espaces portes en formant des conduits plus volumineux. A partir des espaces portes, les conduits biliaires fusionnent pour former les canaux biliaires qui se jettent dans le tube digestif (Rouvière, 1978). Les acides biliaires peuvent servir d'agents irritants : ils induisent l'inflammation s'ils sortent des voies biliaires. L'accumulation des acides biliaires dans les tissus hépatiques déclenche la production de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, de facteurs de croissance et de molécules d'adhésion par les cellules hépatocytaires (Heymann, 2016).

iv. Lobule hépatique

L'unité fonctionnelle dans le foie est le lobule hépatique : il rassemble plusieurs hépatocytes groupés de façon concentrique autour d'une veine centro-lobulaire. Leur extrémité périphérique est bordée par une branche de la veine porte, une branche de l'artère hépatique, et un canalicule biliaire. Cet espace péri-lobulaire prend le nom d'espace porte, espace terminal du système porte (Rouvière, 1978 ; Bogdanos, 2013). Dans le lobule hépatique, le sang enrichi en nutriments des branches terminales de la veine porte se mélange avec le sang enrichi en oxygène de l'artère hépatique et voyage à travers un réseau complexe de vaisseaux sinusoides entre les cordons d'hépatocytes avant d'entrer dans les veinules centrales, puis la veine hépatique, d'où il arrive dans la veine cave (Sørensen, 2015). Ainsi, le processus de détoxification se réalise à travers l'hépatocyte de façon centripète : les produits de l'absorption intestinale sont apportés par voie portale aux espaces porte à la périphérie du lobule, ils sont métabolisés dans l'hépatocyte et ressortent transformés par leur pôle central dans les veines centro-lobulaires puis dans les veinules centrales hépatiques (Rouvière, 1978).

La bile suit le chemin inverse : elle est drainée du centre vers la périphérie du lobule, passe dans les canalicules de l'espace porte réunis par les canaux intrahépatiques puis les voies biliaires extra-hépatiques (Rouvière, 1978).

Figure 7. Interactions entre le foie et les agents extérieurs



Le foie est chargé de détoxifier le sang veineux issu du système porte qui draine les organes du tube digestif, la rate et le pancréas, sang enrichi en protéines du non-soi, en toxines et produits microbiens, et en dérivés alimentaires. Il est irrigué par le sang oxygéné et riche en nutriments de l'artère hépatique, qui peut également contenir des micro-organismes circulants. Ces deux vaisseaux se divisent dans le parenchyme hépatique jusqu'à atteindre les capillaires sinusoides des lobules hépatiques. L'endothélium des sinusoides hépatiques est perméable de façon à ce que les hépatocytes soient en contact avec les éléments circulants. Les hépatocytes se nourrissent de l'oxygène et des nutriments du sang artériel et filtrent le sang porte pour produire les composants biliaires, évacués par les canalicules biliaires qui se rejoindront pour former les voies biliaires et se jeter dans l'intestin grêle selon le cycle entéro-hépatique. Le sang filtré et pauvre en oxygène est drainé par la veine hépatique. L'espace porte comprend les extrémités des vaisseaux portes et artériels et l'arrivée du canalicule biliaire. Il est situé en périphérie des lobules hépatiques, constitués de cordons hépatocytaires centrés sur les sinusoides hépatiques dans lesquels entre le sang porte et artériel et sort le sang veineux.

b. Interactions entre le foie et le système immunitaire

i. Cellules du tissu hépatique

1. Cellules parenchymateuses

Les cellules parenchymateuses constituent 78 à 80% du tissu hépatique total et comprennent les hépatocytes et les cholangiocytes (Bogdanos, 2013).

a. Hépatocytes

Les hépatocytes sont arrangés en cordons : au pôle basal, ils reçoivent le sang du système porte, au pôle luminal, ils produisent la bile, collectée par les voies biliaires vers la vésicule biliaire qui la libère dans le tractus gastro-intestinal.

Ils sont capables de dégrader activement les lymphocytes T CD8⁺ par les enzymes lysosomales après la reconnaissance de leurs antigènes spécifiques par le phénomène d'empéripolèse (Heymann, 2016).

En conditions physiologiques, la présence d'une faible quantité d'IFN γ provoque l'expression modérée de CMH de classe I sur les hépatocytes. A l'inverse, l'administration de fortes doses d'IFN γ en culture déclenchent l'expression significativement augmentée du CMH de classe II absente habituellement (Bogdanos, 2013 ; Zheng, 2019).

b. Cholangiocytes

Les cholangiocytes expriment de faibles quantités de CMH de classe I, qui augmentent lors d'une infection à virus hépatotropes. L'absence d'expression de ligands de costimulation les empêche d'induire une activation efficace des lymphocytes T. Endommagés, ils surexpriment le CMH de classe II et les molécules de costimulation (Bogdanos, 2013).

2. Cellules non-parenchymateuses

Les cellules non-parenchymateuses occupent 5 à 6% du tissu hépatique total et sont composées de cellules endothéliales sinusoidales hépatiques (45%), de cellules de Kupffer (33%) et de cellules stellaires hépatiques (22%) (Bogdanos, 2013).

a. Cellules endothéliales sinusoidales hépatiques

Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques contiennent de multiples pores appelés fenestrations qui offrent des canaux ouverts entre le sang sinusoidal et l'espace sous-endothélial. Elles possèdent une activité endocytaire majeure, avec de très nombreuses hydrolases lysosomales qui assurent une dégradation efficace du matériel capté par endocytose. Elles capturent des protéines de la matrice extracellulaire, des polysaccharides, des protéines oxydées et des lipoprotéines, des oligonucléotides, des adénovirus et d'autres particules virales (Sørensen, 2015). Elles expriment par ailleurs des ligands de PD-1 (Yuan, 2017).

b. Cellules stellaires hépatiques

Les cellules stellaires hépatiques sont localisées dans l'espace péri-sinusoidal, entre l'endothélium fenestré des sinusoides et les hépatocytes, avec une prédominance dans les espaces portes et centrolobulaires. Leur principale caractéristique est de contenir des gouttelettes cytoplasmiques renfermant de la vitamine A (Atzori, 2009 ; Docq, 2020). Elles expriment de nombreuses enzymes CYP-450 (2C11, 3A, 3A2, 2D1, 2S1) qui pourraient contribuer à la métabolisation et à la détoxification de certaines xénobiotiques (Atzori, 2009). En cas de lésions hépatiques ou de stimuli inflammatoires notamment par l'IL-17, le $TNF\alpha$, l'IL-6, le $TGF\beta$, les cellules stellaires hépatiques sont activées et se différencient en myofibroblastes. Elles participent à la réparation tissulaire en remodelant la matrice extracellulaire, sécrètent des inhibiteurs des métalloprotéinases, du collagène et génèrent du tissu fibreux qui conduit à la fibrose hépatique (Bogdanos, 2013). En culture, les cellules stellaires hépatiques expriment l' α -SMA (*α -smooth muscle actin*) et le CTGF (*connective tissue growth factor*) proportionnellement à la rigidité du milieu (Docq, 2020). L' α -SMA n'est exprimée par aucune autre cellule résidente du foie (Atzori, 2009).

c. Cellules de Kupffer

Les cellules de Kupffer sont les macrophages tissulaires hépatiques et représentent environ 80-90% des macrophages tissulaires résidents du corps (Li, 2017). Elles peuplent abondamment les sinusoides, et sont en contact avec le flux sanguin d'une part et avec les hépatocytes d'autre part (Bonnardel, 2019). Elles constituent la première ligne de défense contre les bactéries, les débris microbiens et les endotoxines issues du tractus gastro-intestinal (Li, 2017). Ce sont des phagocytes très bien positionnés pour l'élimination des particules (endotoxines, antigènes) de la circulation systémique (Bogdanos, 2013 ; Li, 2017). Elles expriment par ailleurs des ligands de PD-1 et peuvent être activées par les molécules issues de pathogènes par leurs récepteurs immunitaires innés. Cela conduit à la sécrétion de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , IL-10 et $\text{IFN}\gamma$ (Li, 2017). Dans certaines conditions, elles peuvent sécréter du $\text{TGF}\beta$ (Yuan, 2017).

ii. Cellules immunitaires résidentes

Les cellules immunitaires résidentes du foie, s'accumulent autour des espaces portes, comprenant des DC et des lymphocytes (Bogdanos, 2013 ; Ficht, 2020). Les lymphocytes intrahépatiques se répartissent en lymphocytes B (5%), lymphocytes T (23%), lymphocytes NK (20-30%) et lymphocytes NKT (50%). La quantification précise des sous-populations est difficile à estimer, du fait de la difficulté d'extraire des cellules hépatiques et les variations induites par les manipulations techniques nécessaires (Crispe, 1996). La majorité sont phénotypiquement et fonctionnellement différents des lymphocytes circulants, pour des raisons encore mal comprises (Bogdanos, 2013).

3. Cellules dendritiques

Les DC hépatiques sont préférentiellement situées dans les espaces portes. Elles sont moins immunogènes que les DC spléniques et circulantes, mais ont une plus grande capacité de production cytokinique et de phagocytose (Bogdanos, 2013). Leur phénotype tolérogène induit la délétion clonale, l'anergie, la différenciation en $\text{T}_{\text{H}2}$ et l'induction de T_{REG} par l'expression de grandes quantités de ligands des récepteurs inhibiteurs de co-stimulation (Zheng, 2019).

4. Lymphocytes B

Etant donné leur petite quantité et les difficultés techniques de caractérisation, très peu de données sont disponibles sur les lymphocytes B intra-hépatiques. Dans l'hépatite C chronique, ils sont activés, prolifèrent et se différencient en plasmocytes dans les centres germinaux des follicules lymphoïdes des espaces portes. Leur structure est composée des lymphocytes B activés entourés d'un réseau de DC (Racanelli, 2006).

5. Lymphocytes T

Les lymphocytes T intra-hépatiques comprennent un excès de T CD8⁺ par rapport aux T CD4⁺ confirmé par marquage *in situ* (Crispe, 2006). Par rapport aux T CD4⁺, les T CD8⁺ expriment en plus grande quantité une molécule d'adhésion reconnue par les hépatocytes (Mehal, 1999). Le ratio effecteurs/mémoire est plus élevé dans le foie que dans le sang (Racanelli, 2006). Le foie abrite aussi des lymphocytes T $\gamma\delta$ (Heymann, 2016).

6. Lymphocytes NK

Les lymphocytes NK sont présents à une fréquence inhabituellement élevée parmi les lymphocytes intra-hépatiques. Ils peuvent moduler les lésions hépatiques en pondérant la production locale de cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires par leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs (Racanelli, 2006).

7. Lymphocytes NKT

Les lymphocytes NKT prennent naissance dans le thymus et présentent un répertoire de TCR très restreint qui reconnaît des antigènes présentés par le CMH de classe I. Ils peuvent être CD4⁺ ou CD4/CD8 double négatifs. Ils sont plus abondants dans le foie que dans n'importe quel autre organe. Ils sont activés par l'IL-12 produite par les DC et les cellules de Kupffer.

Capables de libérer rapidement de grandes quantités d'IFN γ et d'IL-4, les lymphocytes NKT pourraient polariser les réponses du système immunitaire adaptatif soit de type pro-inflammatoire (IFN γ , TNF α), soit de type anti-inflammatoire (IL-4, IL-10, IL-13) (Racanelli, 2006).

iii. Détection antigénique

Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques possèdent des quantités inhabituellement élevées de vésicules d'endocytose permettant de capter les protéines circulant dans le sang sinusoidal. Elles expriment un récepteur du fragment Fc des anticorps (Bogdanos, 2013 ; Sørensen, 2015). Les hépatocytes, les cellules stellaires hépatiques et les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques expriment constitutivement des récepteurs du système immunitaire inné comme le récepteur Toll-like 4. Cependant, l'exposition permanente à de faibles concentrations de composants bactériens comme les lipopolysaccharides (LPS) rendent les cellules réfractaires à la stimulation par TLR4. Ce phénomène est appelée tolérance aux endotoxines, qui conduit à une suppression immunitaire active par les cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou TGF β (Heymann, 2016). Les cellules de Kupffer sont activées par des stimuli bactériens, LPS et superantigènes bactériens. Les lymphocytes NK reconnaissent des cibles antigéniques non-peptidiques comme les composants lipidiques et glycolipidiques des membranes mycobactériennes (Racanelli, 2006).

iv. Présentation antigénique

Les fenestrations de l'endothélium sinusoidal permettent une interaction directe entre les lymphocytes T naïfs circulants et les hépatocytes, rendant les antigènes hépatocellulaires accessibles (Guidotti, 2015 ; Ficht, 2020). Non seulement les cellules sinusoidales endothéliales hépatiques, les cellules de Kupffer et les DC hépatiques sont toutes des APC, mais en cas d'inflammation hépatique persistante ou en conditions pathologiques, les hépatocytes et les cholangiocytes peuvent exprimer le CMH de classe II et se comporter aussi en APC. Les cellules stellaires hépatiques activées expriment le CMH de classe II et les molécules de costimulation nécessaires à présenter efficacement des antigènes, notamment lipidiques, aux lymphocytes (Bogdanos, 2013).

D'autre part, la capacité des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques à présenter les antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ est inhibée par l'IL-10 (Bogdanos, 2013). En co-culture, les cellules stellaires hépatiques peuvent inhiber l'activation des lymphocytes T par les APC (Heymann, 2016). Le rôle d'APC des cellules endothéliales sinusoidales hépatiques est vivement débattu (Bogdanos, 2013).

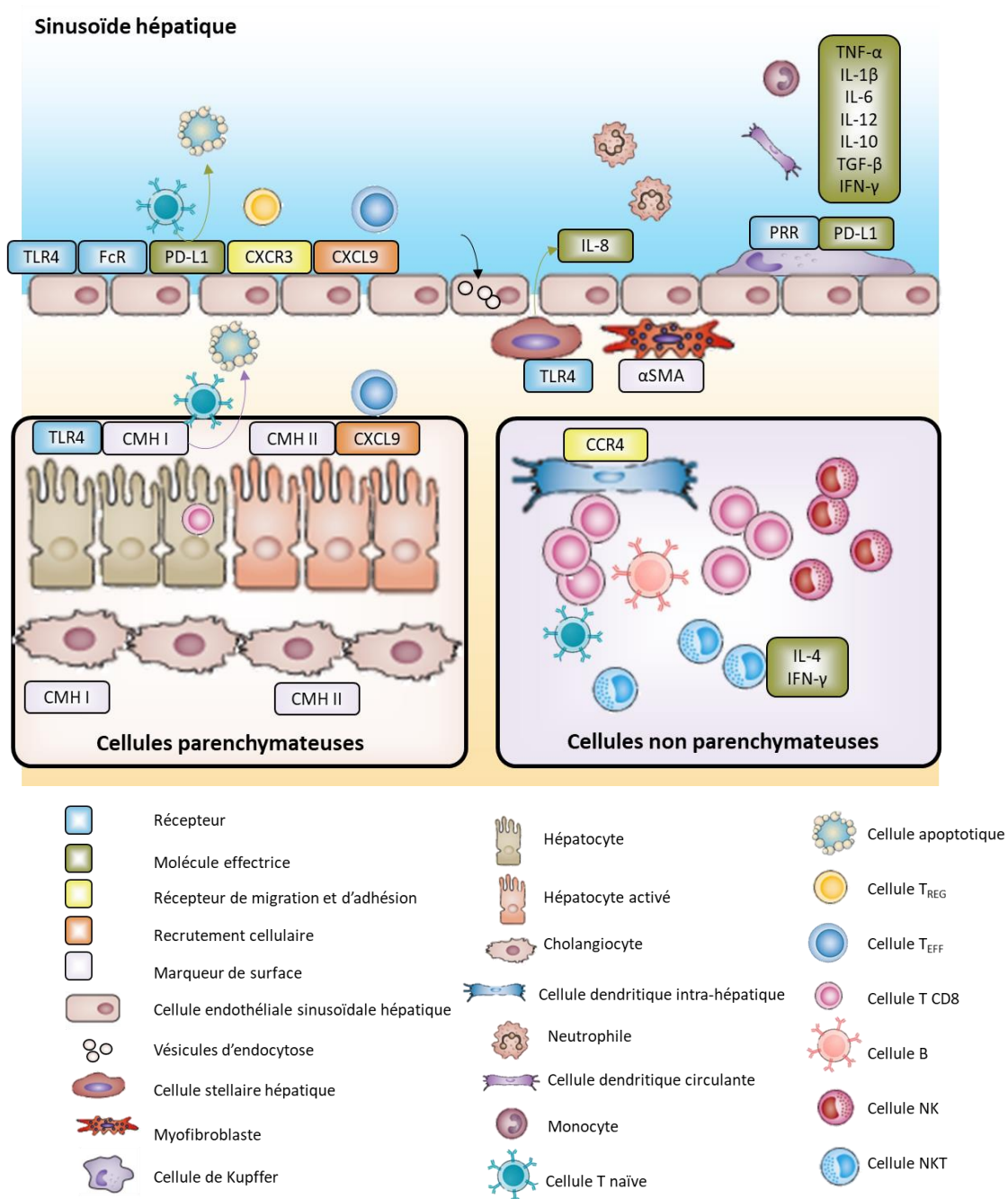
v. Recrutement de cellules immunitaires

Les neutrophiles sont recrutés par l'IL-8 sécrétée par les cellules stellaires hépatiques (Atzori, 2009). Les monocytes et les DC sont recrutés par les chimiokines sécrétées par les cellules de Kupffer (Matsuno, 2002 ; Heymann, 2016). Les lymphocytes T_{REG} sont recrutés par CXCR3 exprimé par l'endothélium sinusoidal hépatique. Les ligands CCR4 sécrétés par les DC recrutent les T_{REG} dans les foyers d'inflammation chez les patients avec une hépatite chronique (Oo, 2010). Lorsqu'ils sont activés, les lymphocytes NK produisent rapidement de l'IFN γ qui stimule les hépatocytes et les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques à sécréter la chimiokine CXCL9, provoquant le recrutement des lymphocytes T dans le foie (Racanelli, 2006).

vi. Différenciation lymphocytaire

Les hépatocytes peuvent induire une différenciation des T CD4⁺ en T_{REG} *in vitro* (Zheng, 2019). L'activation des T CD8 par les hépatocytes entraîne une délétion clonale en l'absence de signaux de costimulation (Bogdanos, 2013). Les cellules stellaires hépatiques produisent du TGF β qui induit préférentiellement une différenciation en T_{REG} (Heymann, 2016). Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques suppriment les T_H1 qui produisent de l'IFN γ et favorisent les T_H2 qui expriment l'IL-4 (Zheng, 2019). Elles peuvent induire une différenciation des T CD4⁺ naïfs en T_{REG} et inhiber activement les réponses T_H1 et T_H17 à travers l'expression d'IL-10 et de PD-1. Ces fonctions participent à la tolérance périphérique en induisant une délétion clonale des lymphocytes T auto-réactives (Heymann, 2016). Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques issues de foies fibrosés induisent les lymphocytes T à produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN γ , l'IL-6 et le TNF α (Bogdanos, 2013).

Figure 8. Interactions entre le foie et le système immunitaire



Les cellules endothéliales sinusoidales hépatiques expriment des récepteurs de l'immunité innée (TLR4) et de l'immunité adaptative (FcR pour récepteur Fc). Elles sont capables de présenter des antigènes du soi aux lymphocytes T naïfs circulants et d'induire leur apoptose en exprimant le ligand de PD-1. Lorsqu'elles sont activées, elles peuvent exprimer des chimiokines et récepteurs de chimiokines leur permettant de recruter les lymphocytes T effecteurs (CXCL9) ou les lymphocytes T régulateurs (CXCR3). Elles possèdent de grandes capacités d'endocytose et peuvent ainsi absorber les peptides circulants pour les présenter ensuite. Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, expriment des récepteurs de l'immunité innée (PRR) et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes par l'expression du ligand de PD-1. En fonction de la situation, elles peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ) ou anti-inflammatoires (IL-10, TGF β) et recruter d'autres acteurs de l'immunité innée (cellules dendritiques, monocytes). Les cellules stellaires hépatiques expriment le récepteur de l'immunité innée TLR4. Lorsqu'elles sont activées, elles peuvent sécréter de l'IL-8 et recruter les neutrophiles circulants, avant de se différencier en myofibroblastes, cellules qui expriment l' α -SMA (*α -smooth muscle actin*). Les hépatocytes expriment également le récepteur de l'immunité innée TLR4 et le complexe moléculaire d'histocompatibilité (CMH) de classe I, capable d'induire une délétion clonale chez les lymphocytes T naïfs qui le reconnaîtraient. Lorsqu'ils sont activés, les hépatocytes expriment alors le CMH de classe II et sont capables de recruter des lymphocytes T effecteurs en exprimant la chimiokine CXCL9. Les cholangiocytes expriment le CMH de classe I et peuvent dans certaines conditions présenter des antigènes en exprimant le CMH de classe II. De nombreuses cellules immunitaires résident dans le foie : des lymphocytes, majoritairement T et principalement T CD8, mais aussi des lymphocytes *natural killer* (NK) et NKT, capables de sécréter de l'IL-4 et de l'IFN- γ ; ainsi que des cellules dendritiques qui expriment CCR4.

c. « Privilège immunitaire » du foie

i. Définition

Le privilège immunitaire désigne l'absence d'induction de réponse immunitaire de certains sites du corps, appelés sites immunologiquement privilégiés. Au lieu de provoquer une réponse immunitaire destructrice, les antigènes déclenchent la tolérance ou une réponse qui n'est pas destructrice pour le tissu (Murphy, 2018).

Constamment exposé à de hauts niveaux d'antigènes inoffensifs, la forme spécifique de privilège immunitaire du foie assure qu'aucune réponse immunitaire puissante ne sera déclenchée en réponse à la présentation de ces antigènes (Zheng, 2019).

ii. Tolérance aux greffons hépatiques

1. Allogreffes sans immunosuppression

La première publication étayant le privilège immunitaire du foie date de 1969. Des expériences d'allogreffe hépatique entre cochons non apparentés montrent que les animaux non traités par immunosuppresseurs survivent pendant des périodes prolongées avec des transplantations hépatiques orthotopiques. De plus, l'allogreffe hépatique protège du rejet des greffes de peau, rein et cœur issus du même donneur et l'injection intra-hépatique d'antigènes solubles évite le rejet du tissu spécifique du donneur (Calne, 1969). En 1980, Kamada *et al* montrent que la transplantation hépatique totalement allogénique chez les rats induit un état de tolérance systémique aux antigènes du donneur (Kamada, 1980). En 1994, Qian *et al* confirment ces résultats et retrouvent également que la tolérance induite par l'allogreffe hépatique peut être étendue à d'autres organes (greffons cardiaques, cutanés) du même donneur, limitant le risque de rejet et améliorant la tolérance et la survie des greffons et des receveurs, toujours en l'absence de traitements immunosuppresseurs. Cette capacité d'induction de tolérance n'est pas spécifique au foie, la même observation étant faite avec des greffons rénaux, mais celle du foie est bien plus puissante que celle des autres organes (Qian, 1994).

La recherche des mécanismes en jeu a conduit à étudier la co-transplantation d'îlots de cellules stellaires hépatiques avec des îlots de cellules pancréatiques et les données montrent que les cellules stellaires hépatiques protègent efficacement des îlots pancréatiques du rejet (Chen, 2006).

2. Sevrage en immunosuppresseur

Dès 1993, la possibilité d'arrêter totalement tout immunosuppresseur après transplantation hépatique a été mise en évidence chez certains patients, avec une évolution favorable sur plusieurs années. Dans une étude prospective, le sevrage complet d'immunosuppresseurs a été possible pour 27% des patients (Ramos, 1995). L'obtention d'une tolérance clinique efficace a été rapportée plus fréquemment chez les receveurs de greffons hépatiques par rapport à n'importe quel autre organe. Une cohorte de 163 patients met en évidence de façon incontestable que le sevrage complet et stable en immunosuppresseurs peut être réalisé en toute sécurité chez les patients ayant reçu un greffon hépatique pour une pathologie hépatique non immuno-médiée (Orlando, 2009).

3. Transplantation entre individus non compatibles

En cas de transplantation hépatique chez des patients ayant des anticorps spécifiques contre le donneur, aucun rejet hyperaigu n'est retrouvé et le rejet aigu survient dans très peu de cas (Iwatsuki, 1981). L'étude de transplantations hépatiques en urgence en situation d'incompatibilité ABO montre que la survie à un an est de 66% (Gugenheim, 1990).

iii. Tolérance médiée par les hépatocytes

1. Tolérance orale

L'induction d'une tolérance immunologique induite par l'administration orale d'un antigène soluble est décrite dès les années 1940. Des études ultérieures confirment que cette tolérance orale concerne tous les niveaux de la réponse immunitaire adaptative.

L'étude des patients avec des hépatopathies chroniques ou des shunts porto-caves, créant une déviation qui ne passe pas par le foie, montre des niveaux d'anticorps dirigés contre le microbiote inhabituellement élevés (Callery, 1989). De même, l'administration d'allo-antigènes dans l'environnement hépatique par la veine porte induit une anergie prolongée des lymphocytes T qui n'est pas reproduite par l'injection intraveineuse (Yu, 1994).

2. Présentation médiée par le foie

L'exposition de lymphocytes T à des hépatocytes allogéniques conduit à leur activation et à l'induction de l'apoptose, provoquant une délétion clonale (Bogdanos, 2013 ; Zheng, 2019). Ainsi, on obtient une tolérance aux antigènes spécifiquement exprimés dans les hépatocytes (Akbarpour, 2015). La présentation d'antigènes exogènes par les cellules endothéliales sinusoidales aux lymphocytes T CD8⁺ naïfs après l'administration d'un antigène oral conduit à l'apparition d'une tolérance des lymphocytes T spécifiques à cet antigène par l'interaction de PD-1 avec son ligand (Heymann, 2016). La tolérance induite par l'expression médiée par le foie de protéines exogènes est utilisée dans la thérapie génique pour l'hémophilie, les pathologies métaboliques, les pathologies lysosomales et aussi dans certaines pathologies auto-immunes (Zheng, 2019).

iv. Hépatites chroniques

L'infection par les virus hépatotropes VHB et VHC peut conduire à une réponse immunitaire soit aigue intense, qui réussit à éliminer totalement le virus ; soit atténuée, permettant aux pathogènes de persister dans le foie de façon chronique (Guidotti, 2006 ; Zheng, 2019). Dans les infections chroniques à VHB, les hépatocytes se révèlent capables d'induire une activation transitoire des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques, mais en les conduisant ensuite à la délétion clonale (Heymann, 2016).

III. Modèles murins d'hépatite auto-immune

Rompre la tolérance hépatique artificiellement est simple. Cependant, maintenir cette rupture et obtenir une hépatite chronique est difficile. A ce jour, aucun modèle murin d'HAI n'est complètement satisfaisant. Les différents modèles développés sont décrits ci-dessous et résumés dans le Tableau 8.

a. Immunisation avec des homogénats hépatiques

Le premier modèle est développé en 1972 par l'induction d'une hépatite active chez des lapins immunisés avec des protéines hépatiques humaines combinées à un adjuvant (Büschénfelde, 1972). En 1983, l'HAI expérimentale est induite dans un modèle murin par des injections intramusculaires mensuelles d'homogénats hépatiques syngéniques et de LPS pour adjuvant. Après onze mois, 80% des souris ont développé une infiltration lymphoplasmocytaire péri-portale modérée à sévère avec la présence de nécrose parcellaire. Les auteurs ont également observé des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques des membranes hépatocytaires chez 50% des animaux. La pathologie est reproduite après transfert adoptif de splénocytes, suggérant que l'HAI expérimentale est déclenchée par des réponses immunitaires adaptatives (Kuriki, 1983 ; Yüksel, 2014).

Des études ultérieures montrent que certaines lignées de souris sont plus susceptibles à l'HAI expérimentale que d'autres, soulignant l'importance du terrain génétique. D'autre part, de multiples immunisations sont nécessaires pour induire une hépatite spontanée, soulignant la complexité du déclenchement de la réaction auto-immune. Le principal inconvénient de ces modèles provient des nombreux antigènes indéterminés contenus dans les homogénats hépatiques injectés, qui conduiraient à des réponses immunitaires polyclonales (Yüksel, 2014).

b. Immunisation avec des antigènes de substitution

La Concanavalin A (ConA) est une lectine des plantes qui induit une hépatite aigue (Tiegs, 1997).

Une élévation significative des transaminases, des niveaux plasmatiques d'IL-17, de TNF α et d'IL-6, des quantités de lymphocytes T_H17 et NKT, la présence d'une nécrose hépatique et d'un infiltrat parenchymateux ont été détectés chez les souris ayant reçu une injection intraveineuse de ConA (Tiegs, 1997 ; Yan, 2012 ; Yüksel, 2014).

Cet effet est aboli en cas de traitement préalable par (1) des anticorps ciblant les lymphocytes T CD4⁺, (2) des anticorps anti-TNF α , (3) des anticorps anti-IFN γ ou (4) en cas de délétion des lymphocytes NKT (Tiegs, 1997 ; Takeda, 2000).

Le principal inconvénient de ce modèle est l'absence de lymphocytes T effecteurs dirigés contre des auto-antigènes spécifiques du foie qui sont indispensables dans l'HAï (Yüksel, 2014).

c. Expression transgénique antigène/TCR

Les souris transgéniques qui surexpriment un néo-antigène dans les hépatocytes ne développent pas spontanément d'hépatite. Cependant, le transfert adoptif de splénocytes activés vers les souris transgéniques déclenche l'apparition d'une hépatite chronique et évolutive mais rapidement contrôlée.

De nombreux autres modèles murins ont été décrits mais une hépatite aigüe n'a été retrouvée qu'après un transfert adoptif de lymphocytes T sauvages ou avec un TCR transgénique (Yüksel, 2014).

d. Immunisation avec les cellules dendritiques

L'immunisation sous-cutanée des souris avec des DC chargées avec des cellules de carcinome hépatocellulaire activent les lymphocytes T auto-réactifs cytotoxiques dirigés contre des antigènes partagés par les hépatocytes et les cellules tumorales.

Cette immunisation entraîne l'apparition d'une inflammation hépatique spécifique, qui est rapidement contrôlée par les T_{REG} fonctionnels présents chez les souris testées (Yüksel, 2014).

e. Infection virale

L'inoculation intrapéritonéale de CMV murin provoque une inflammation hépatique impliquant les cellules de Kupffer, les lymphocytes et les granulocytes ; une élévation des transaminases plasmatiques ; une détection d'auto-anticorps, notamment anti-nucléaires ; et une infiltration plasmocytaire importante et diffuse (Bartholomaeus, 1983).

f. Délétion spécifique d'un gène

Selon la lignée murine, la délétion spécifique du gène codant pour TGF β entraîne ou pas l'apparition d'une inflammation hépatique extensive avec une nécrose hépatocellulaire diffuse et une élévation des transaminases (Yüksel, 2014).

Les études de déplétion ont aussi montré que les lymphocytes T CD4⁺ étaient indispensables dans ce modèle murin. Les lymphocytes T CD8⁺ et NK n'étaient pas capables d'induire l'hépatite. De plus, la double délétion de l'IFN γ et du TGF β ne provoque aucune lésion hépatique, ce qui soutient le rôle majeur de l'IFN γ sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ dans l'HAI (Yüksel, 2014).

Les souris portant une délétion spécifique du récepteur inhibiteur de costimulation PD-1 et ayant subi une thymectomie néonatale développent une gastrite auto-immune et une HAI, avec de très hauts niveaux de transaminases, une infiltration de lymphocytes T CD8⁺ intra-hépatiques et la détection d'anticorps anti-nucléaires. Comme précédemment, ces résultats dépendent de la lignée murine utilisée (Yüksel, 2014).

g. Induction avec des antigènes de l'HAI

Les cibles antigéniques des auto-anticorps anti-LKM-1 et LC-1 étant bien caractérisées, il a été possible d'injecter l'ADN codant pour ces épitopes antigéniques chez des souris, en association à de l'IL-12 pour stimuler la réponse immunitaire.

On observe alors une inflammation péri-portale modérée à forte et l'apparition d'antigènes spécifiques à de très hauts titres. Ce modèle confirme le rôle du mécanisme de mimétisme moléculaire dans l'apparition de l'auto-immunité (Yüksel, 2014).

Un autre modèle repose sur l'infection avec un vecteur adénoviral exprimant la protéine CYP2D6 humaine chez des souris humanisées, qui conduit à l'apparition de hauts titres d'anticorps anti-CYP2D6, des lésions hépatiques persistantes, des infiltrats cellulaires parenchymateux et périportaux et une élévation des transaminases (Hintermann, 2013).

La voie d'administration de l'épitope immunisant modifie les conséquences immunitaires : l'injection intra-péritonéale entraîne une petite élévation des transaminases et une fibrose limitée, tandis que l'injection intraveineuse provoque une augmentation majeure des transaminases et une fibrose parenchymateuse (Hintermann, 2013).

Tableau 8. Avantages et inconvénients des différents types de modèles murin d'HAI.

Modèles murins	Avantages	Inconvénients
Immunsation avec des homogénats hépatiques	Association avec le terrain génétique et la susceptibilité à la pathologie Importance des lymphocytes T dans l'hépatite Nécessité des signaux de danger (LPS, complete Freund's adjuvant)	Induction d'une hépatite légère à modérée Induction d'une réponse immunitaire contre des antigènes hépatiques indéterminés
Immunsation avec des antigènes de substitution	Induction facile de l'hépatite Contrôle aisé de la sévérité de la pathologie Rôle des cellules immunitaires et de leurs cytokines (TNF α , IFN γ et IL-17) dans l'hépatite	Hépatite aigue Réponse immunitaire contre des antigènes non associés à l'HAI
Expression transgénique antigène/TCR	Antigènes bien définis Identification du rôle du microenvironnement hépatique dans la tolérance Identification de l'incapacité des lymphocytes T CD4 ⁺ naïves à induire des lésions dans un foie sain	Hépatite initialement médiée par les lymphocytes T CD8 ⁺ Hépatite principalement aigue Rôle inconnu du terrain génétique
Immunsation avec les DC	Les DC chargées d'antigène peuvent induire des lésions hépatiques spécifiques	Induction d'une hépatite de courte durée
Infection virale	Combine les signaux de danger et les néo-antigènes Induit une réponse cellulaire B et T basée sur le mimétisme moléculaire	Pas d'association forte entre l'infection virale et l'HAI
Délétion spécifique d'un gène	Identifie le rôle de gènes particuliers dans la réponse/tolérance immunitaire Explique le lien entre le terrain génétique et l'effet d'un gène en particulier	L'HAI est pas médiée par un seul gène Induction de pathologies multi-systémiques
Immunsation avec des antigènes de l'HAI	Montre la susceptibilité de certaines lignées à l'HAI Induction d'une HAI chronique Induction d'une réponse T _H 1/ T _H 17 Induction d'anticorps anti-LKM-1 et anti-LC-1	Pas d'HAI évolutive Pas ou peu de fibrose parenchymateuse Pas d'insuffisance hépatique terminale

PARTIE 3 : LA VOIE mTORC1 DANS L'IMMUNITÉ

I. La voie mTORC1

a. Le réseau de signalisation de mTORC1

i. mTOR

La sérine/thréonine kinase mTOR (*mammalian* ou *mechanistic target of rapamycin*) est conservée dans l'évolution et régule la croissance et le métabolisme cellulaire selon les signaux environnementaux dans les eucaryotes (Dowling, 2010).

mTOR interagit avec différents partenaires pour former deux complexes distincts : mTORC1 et mTORC2 qui ont différentes cibles (Tafur, 2020). Leur principale différence consiste dans la sensibilité de mTORC1 à la rapamycine, tandis que mTORC2 y est insensible. mTORC1 a été considérablement étudié et son rôle, dans le métabolisme cellulaire en général et dans les réponses immunitaires en particulier, a été étayé par une littérature abondante. À l'inverse, peu de données sont disponibles concernant mTORC2, qui semble néanmoins tenir un rôle moins prépondérant que mTORC1. Ce travail se concentrera sur mTORC1.

ii. Cibles générales de mTORC1

Une fois activé, mTORC1 initie une cascade de phosphorylation impliquant une diversité de substrats qui, collectivement, favorise la croissance cellulaire et inhibe l'autophagie (Tafur, 2020).

Cet effet comprend l'activation de la synthèse des nucléotides, des lipides, la biosynthèse des ribosomes, la synthèse de l'ARNm, la traduction des protéines et de la glycolyse aérobie. D'autre part, mTORC1 inhibe le catabolisme en limitant la biogénèse du lysosome et en inhibant l'autophagie (Tafur, 2020).

iii. Contrôle de mTORC1

A cause de son rôle majeur, l'activation de mTORC1 est strictement contrôlée. De nombreux niveaux de régulation intègrent les signaux de disponibilité des nutriments et du stress cellulaire pour augmenter ou réduire l'activité de mTORC1.

Les inhibiteurs endogènes de mTORC1 : PRAS40 (*proline-rich AKT substrate 40 kDa*) et DEPTOR (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*) se lient directement à mTORC1 pour réduire son activité.

Un autre niveau de régulation de mTORC1 est sa localisation. mTORC1 doit être recruté dans le lysosome par les hétérodimères Ras-related GTPases Rag (RagA/B et RagC/D) qui sont eux-mêmes ancrés au lysosome par le complexe Ragulator (LAMTOR1-5). Une fois à la membrane lysosomale, mTORC1 peut être activé par la liaison à une protéine G, Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) (Tafur, 2020).

b. La structure de mTORC1

i. Composition et interactions

mTORC1 est composé de 3 sous-unités essentielles : mTOR, mLst8 (*mammalian lethal with Sec13 protein 8*) et Raptor (*regulatory protein associated with mTOR*). Ces sous-unités sont arrangées de façon symétrique en dimère creux en forme de losange qui contient deux copies de chaque sous-unité, comme illustré sur la Figure 9 (Tafur, 2020).

A son extrémité N-terminale, mTOR possède deux domaines contigus HEAT (*Huntington, EF3A, ATM, TOR*), suivis par le domaine FAT (*FRAP, ATM, TRRAP*) et finalement le domaine kinase à l'extrémité C-terminale. Le site actif est formé de deux lobes (N-ter et C-ter). Trois éléments importants sont observés dans le domaine kinase de mTOR : le domaine FRB (*FKBP12-rapamycin binding*) de liaison de la rapamycine dans le lobe N-ter, l'élément de liaison de mLst8 dans le lobe C-ter et le domaine FAT C-terminal est situé au bout de l'extrémité C-terminale de mTOR.

Ainsi, les inhibiteurs de mTOR fonctionnent essentiellement par obstruction stérique du site actif (Tafur, 2020).

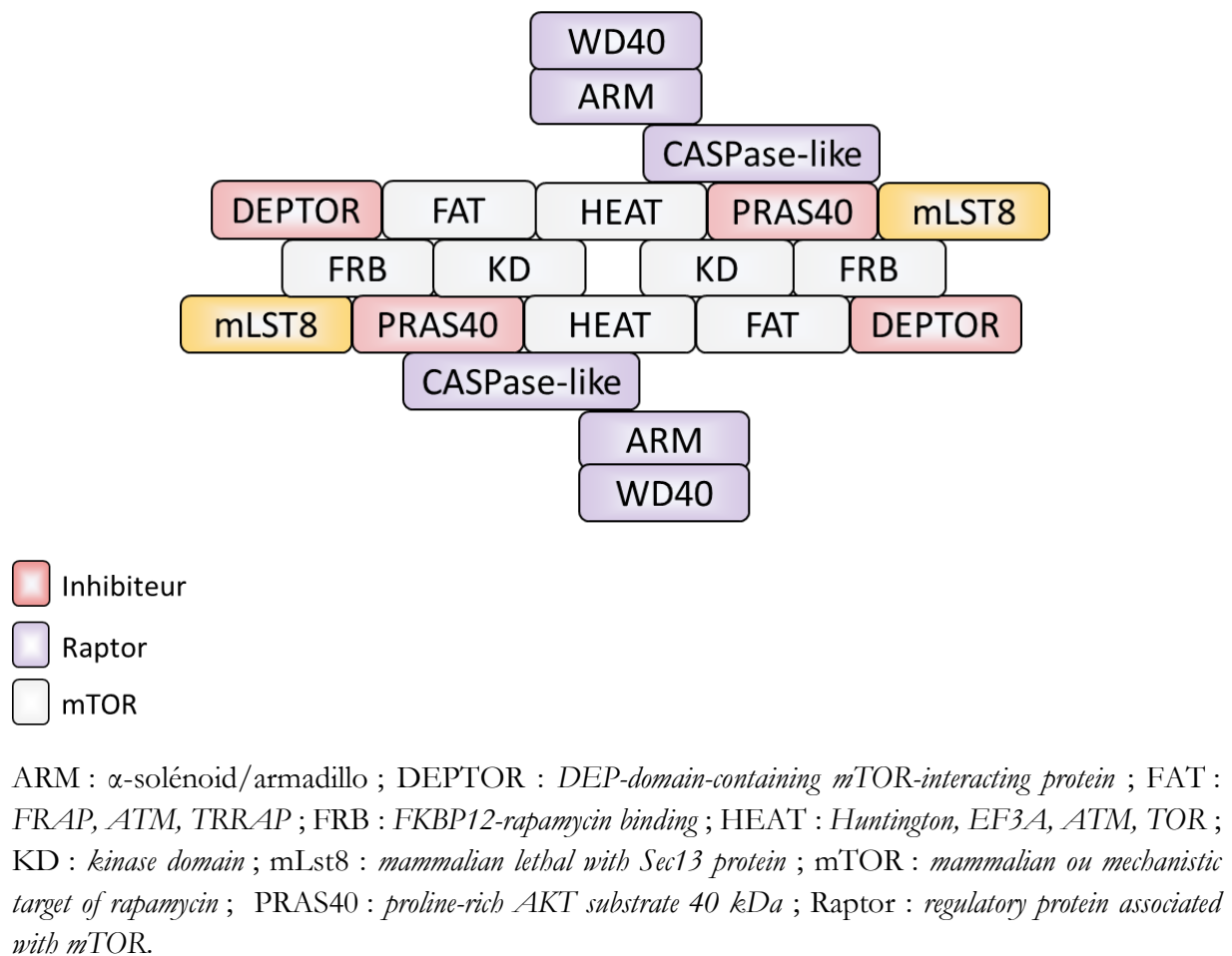
Le cœur de mTORC1 est composé de deux molécules de mTOR, chacune interagissant avec l'autre. Les sillons des domaines HEAT de chaque molécule mTOR forment une interface d'interaction partagée avec le domaine CASPase-like N-terminal de Raptor, étant ainsi en contact avec les deux copies de mTOR. A la suite du domaine CASPase-like se trouve un bloc de répétitions ARM (α -solénoïde/armadillo) puis un domaine WD40 à l'extrémité C-terminale. La partie C-terminale de Raptor dépasse du complexe, ainsi capable de former d'autres interactions protéine-protéine (Tafur, 2020).

ii. Mécanismes de phosphorylation et d'inhibition

Un motif de signalisation pour mTOR a été décrit sur les deux substrats les mieux étudiés de mTORC1 : eIF4E Binding Protein family 1 (4E-BP1) et p70S6K1. La liaison à ce motif est biochimiquement affectée au domaine N-terminal de Raptor. Il a été montré que mTORC1 peut phosphoryler certaines de ces cibles en l'absence de Raptor, suggérant deux mécanismes de reconnaissance des substrats, l'un médié par Raptor et l'autre se liant au domaine FRB (Tafur, 2020).

L'inhibiteur de mTORC1, PRAS40, est connue pour interagir avec Raptor et le domaine kinase de mTOR. PRAS40 possède également un motif de signalisation pour mTOR et peut être phosphorylé par mTORC1, entrant ainsi en compétition avec 4E-BP1 et p70S6K1. Par contre, DEPTOR, capable d'inhiber mTORC1 et mTORC2, interagit avec le domaine FAT de mTOR selon un mécanisme encore à définir (Tafur, 2020).

Figure 9. Structure de mTORC1



c. L'activation de mTORC1 par les Rags et Rheb

i. Rags et le complexe Ragulator

L'activation de mTORC1 nécessite son recrutement obligatoire à la membrane lysosomale par l'interaction avec le complexe Rag-Ragulator (Tafur, 2020).

Ragulator est un complexe pentamérique composé de LAMTOR1 à 5, ancré dans la membrane lysosomale par la queue N-terminale de LAMTOR1, et qui subit une myristoylation et une palmitoylation (Tafur, 2020).

Les deux paires de Rag GTPases, RagA et RagB, et RagC et RagD, fonctionnent en hétérodimères (RagA ou RagB avec RagC ou RagD). Le statut de charge en guanine nucléotide des Rag est déterminé en aval de signaux initiés par des détecteurs de nutriments dédiés. Quand les signaux de nutriments permettent la croissance, RagA/B est chargé avec un GTP et RagC/D avec un GDP, et cet hétérodimère se lie à mTORC1 le recrutant au lysosome (Tafur, 2020).

RagA/RagC interagit avec mTORC1 via le domaine ARM de Raptor avec ses domaines GTPase N-terminaux, quand leurs domaines *roadblock* C-terminaux interagissent entre eux et avec les sous-unités LAMTOR1 et LAMTOR2 de Ragulator (Tafur, 2020).

ii. Rheb

Une fois recruté à la membrane lysosomale, l'activation de mTORC1 nécessite l'interaction avec l'autre GTPase régulatrice majeure de mTORC1 : Rheb (Tafur, 2020).

Contrairement aux Rags, Rheb interagit directement avec la membrane lysosomale par sa queue C-terminale farnésylée. Le guanine nucléotide de Rheb est essentiellement, mais pas exclusivement, dédié aux signaux en aval des récepteurs de facteurs de croissance (Tafur, 2020).

De cette façon, les signaux issus des nutriments (via les Rags) et des facteurs de croissance (via Rheb) convergent vers le lysosome, et les deux sont nécessaires pour l'activation complète de mTORC1 (Figure 10). La structure du complexe mTORC1-Rheb montre que Rheb se lie aux domaines HEAT et FAT de mTOR à l'interface opposée au site actif (Tafur, 2020).

iii. Modèle d'ancrage de mTORC1 activé au lysosome

Ainsi, Rag-Ragulator ancre mTORC1 à la membrane lysosomale et limite son mouvement, favorisant son interaction avec le stock transitoire de Rheb localisé dans le lysosome (Figure 10). Une fois ancré, mTORC1 est orienté de façon à ce que le site actif de chaque monomère soit accessible aux substrats cytoplasmiques, dirigés à l'opposé de la membrane lysosomale (Rogala, 2019). Autrement, le complexe mTORC1-Rheb pourrait dissocier et phosphoryler des substrats qui sont dans d'autres localisations cellulaires. En effet, il semble que l'association de Rheb à mTORC1 déstabilise l'ancrage à la membrane lysosomale, suggérant que le complexe mTORC1-Rheb pourrait quitter le lysosome (Tafur, 2020).

d. Le contrôle des Rags et de Rheb

Les Rag GTPases ont une activité intrinsèque très faible, qui est exploitée *in vivo* pour un contrôle strict de leur activité par une protéine GAP (*GTPase Activity Protein*) dédiée (Tafur, 2020).

De la même façon, Rheb est contrôlée par le complexe TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), composé de TSC1, TSC2 et TBC1D7. TSC2 a une activité GAP dirigée contre Rheb, ainsi, l'activation de TSC « éteint » mTORC1. TSC est une plaque tournante d'information majeure dans la signalisation de mTORC1, car elle intègre de multiples signaux cellulaires, du statut énergétique à la signalisation par les facteurs de croissance. L'activité GAP de TSC2 a été localisée à sa région C-terminale, tandis que sa partie N-terminale intervient dans l'interaction avec TSC1 (Tafur, 2020).

e. La voie PI3K/AKT/mTORC1/p70S6K1/S6rp

Les phosphoinositides 3 kinases (PI3K) de classe IA sont des molécules hétérodimériques composées d'une sous-unité catalytique p110 (p110 α , p110 β ou PI3K δ) et d'une sous-unité régulatrice contenant un domaine SH2 pour Src homology 2 (p85 α , p55 α , p85 β ou p55 γ) (Jung, 2018 ; Nunes-Santos, 2019). Celle-ci peut se lier aux motifs YXXM de la queue cytoplasmique de récepteurs membranaires et recruter la PI3K à la membrane, la rapprochant ainsi de ses substrats (Jung, 2018). La PI3K phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), générant ainsi le phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃). PTEN (*Phosphatase and tensin homologue*) fonctionne principalement comme phosphatase lipidique et hydrolyse PIP₃ en PIP₂, renversant ainsi l'effet de la PI3K (Murphy, 2018).

PIP₃ sert de site plasmatique d'ancrage membranaire aux protéines contenant un domaine homologue de la pleckstrine (PH, *Pleckstrin Homology*) telle que la protéine kinase Akt et son activateur en amont PDK1. PDK1 active Akt par phosphorylation. L'activité d'Akt est également accentuée par mTORC2 (Jung, 2018).

Akt activée peut déclencher l'activité mTORC1 en inhibant ses inhibiteurs : directement en phosphorylant PRAS40 et indirectement en phosphorylant le complexe TSC qui libère Rheb (Wang, 2019 ; Jung, 2018).

La forme active de mTORC1 entraîne la phosphorylation de 4E-BP1 et de p70S6K1, essentielle à la croissance cellulaire (Jung, 2018).

f. La voie AMPK/mTORC1

AMPK (adénosine monophosphate-activée protéine kinase) est le principal détecteur d'énergie des cellules eucaryotes (Hardie, 2012). AMPK est un complexe hétérotrimérique avec une activité sérine/thréonine kinase hautement conservé, qui comporte une sous-unité catalytique (sous-unité α) et deux sous-unités régulatrices (sous-unité β et sous-unité γ) (Wang, 2019).

En conditions normales, la thréonine d'AMPK α est continuellement phosphorylée par la kinase LKB1 et déphosphorylée en permanence, probablement par la phosphatase PP2C, empêchant l'activation d'AMPK (Wang, 2019).

Quand les niveaux intracellulaires d'ATP déclinent et que les niveaux d'AMP augmentent, conséquence du stress cellulaire, comme dans le sevrage en nutriments ou l'hypoxie, l'AMP se lie directement au domaine Bateman, constitué de deux domaines de cystathionine- β -synthase (CBS) de la sous-unité γ d'AMPK. Par un blocage allostérique, la liaison de l'AMP empêche alors la déphosphorylation de la sous-unité α et permet l'activation d'AMPK (Puustinen, 2020 ; Leprivier, 2020).

Une fois activée, AMPK inhibe mTORC1 en activant son inhibiteur d'une part en phosphorylant le complexe TSC ; et en inhibant son activateur d'autre part en phosphorylant directement Raptor (Hardie, 2012).

g. Inhibiteurs pharmaceutiques de mTORC1

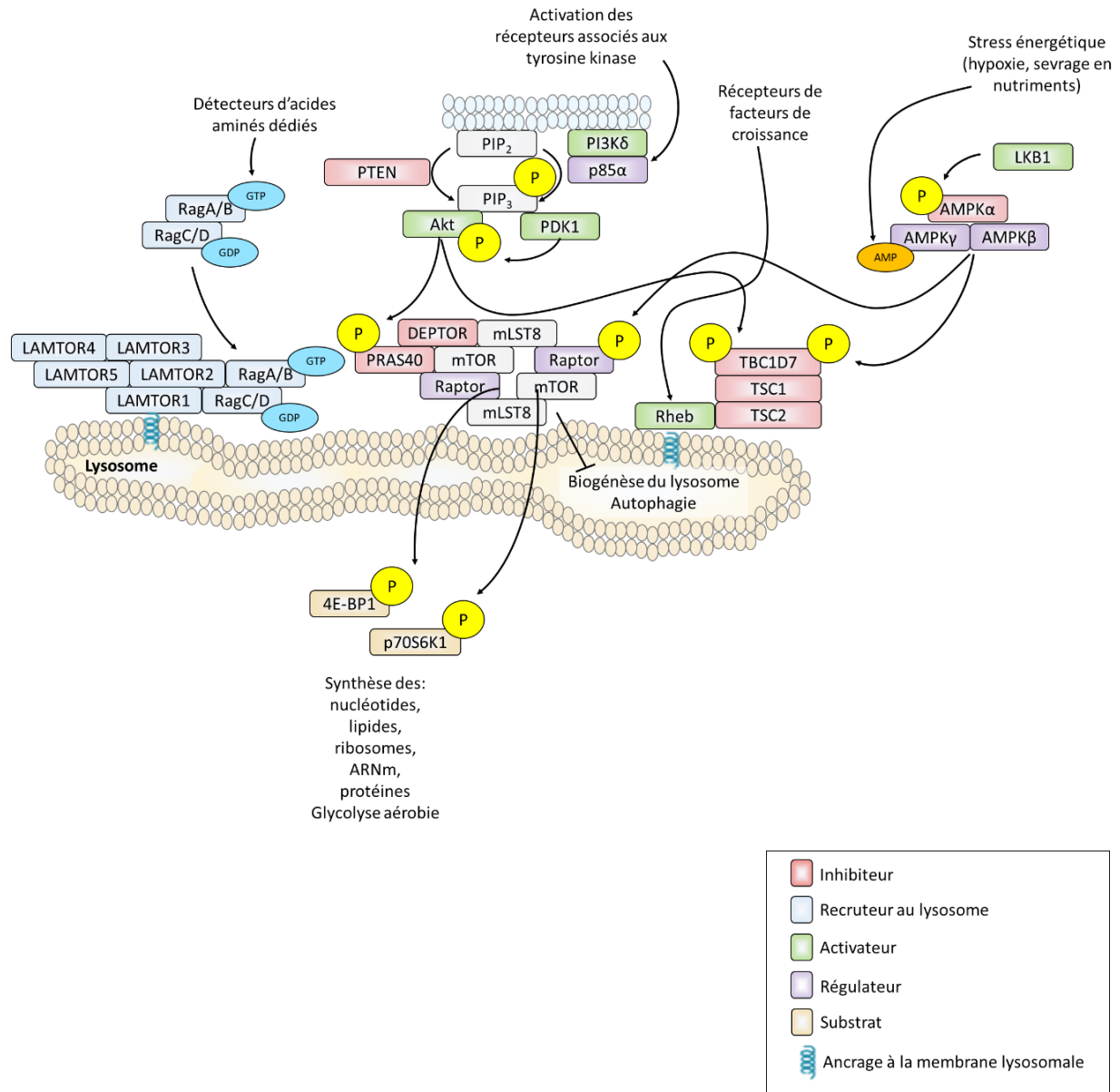
i. Rapamycine

La rapamycine forme un complexe gain-de-fonction avec FKBP12 (*12-kDa FK506-binding protein*) et ce complexe se lie spécifiquement et inhibe de façon allostérique mTORC1. La rapamycine s'est montrée un puissant inhibiteur de l'activation de S6K1, mais elle n'inhibe la phosphorylation des 4E-BP que de façon transitoire et incomplète (Dowling, 2010 ; Li, 2014).

ii. Torin1

Torin1, développé dans un cadre académique, est un inhibiteur puissant et sélectif du domaine kinase de mTOR avec une forte activité biologique dans de nombreuses études précliniques. Il inhibe fortement mTORC2 et mTORC1, avec une inhibition soutenue de la phosphorylation de 4E-BP1 (Dowling, 2010 ; Benjamin, 2011).

Figure 10. La voie de signalisation mTORC1



mTORC1 est un complexe stable au sein duquel la kinase centrale mTOR s'homodimérise par ses régions HEAT, et s'associe à ses partenaires Raptor et mLST8. Les protéines DEPTOR et PRAS40 inhibent directement par obstruction stérique l'activité kinase de mTOR au sein du complexe mTORC1. mTORC1 phosphoryle particulièrement deux substrats canoniques, 4E-BP1 et p70S6K1, qui induisent la synthèse des nucléotides, des lipides, des ribosomes, des ARNm et de protéines, ainsi que la glycolyse aérobie nécessaire à la croissance et à la prolifération cellulaire. Par d'autres substrats non décrits ici, mTORC1 inhibe l'autophagie et la biogénèse du lysosome. La localisation à la membrane lysosomale est une condition indispensable à l'activation de mTORC1. Le complexe est recruté à la membrane lysosomale via l'activation des hétérodimères de Rag GTPases (RagA/B et RagC/D). En présence d'acides aminés, le statut inactif des hétérodimères changent de RagA/B porteurs de GDP à GTP et RagC/D porteurs de GTP à GDP, forme active se liant alors à Raptor. Les Rag GTPases sont ancrées au lysosome par le complexe Ragulator, composé des 5 protéines LAMTOR. La liaison entre les Rag GTPases et Raptor rapproche mTORC1 de la membrane lysosomale où il peut rencontrer Rheb, ancrée au lysosome, rendant ainsi accessible son site actif dirigé vers le cytoplasme à ses substrats. En fonction de multiples signaux, notamment issus des récepteurs de facteur de croissance, Rheb est régulée négativement par le complexe TSC composé de TSC1, TSC2 et TBC1D7, et en particulier par la région GAP de TSC2. Le complexe TSC possède de nombreux sites de phosphorylation qui peuvent l'inhiber ou l'activer selon la voie utilisée. Le complexe AMPK est un autre régulateur négatif de mTORC1. En cas de stress énergétique (hypoxie, sevrage en nutriments/glucose), le ratio ATP : AMP s'inverse et l'AMP se lie aux domaines CBS de la sous-unité régulatrice γ , permettant de stabiliser la phosphorylation de la sous-unité catalytique α par LKB1. Une fois activé, AMPK inhibe mTORC1 par deux moyens : en phosphorylant le complexe TSC et en empêchant la libération de Rheb ; et en phosphorylant Raptor, obstruant d'autant plus le site actif de mTOR. mTORC1 peut être activé par la voie PI3K-Akt. A l'activation des récepteurs associés aux tyrosine-kinase, la sous-unité régulatrice p85 α de PI3K est recrutée à la membrane, permettant à la sous-unité catalytique p110 δ d'accéder à son substrat PIP2 et de le phosphoryler en PIP3. La sous-unité p85 α permet également de stabiliser PTEN, phosphatase lipidique qui, à l'inverse, convertit PIP3 en PIP2. PIP3 active Akt et PDK1, kinase qui phosphoryle Akt, conduisant à l'activation de mTORC1 par deux voies : en phosphorylant PRAS40, libérant le site actif de mTOR ; et en phosphorylant le complexe TSC et en l'empêchant de retenir Rheb.

4E-BP1 : *eIF4E Binding Protein family* ; AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : AMP-dépendante protéine kinase ; DEPTOR : *DEP-domain-containing mTOR-interacting protein* ; LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator* ; mLst8 : *mammalian lethal with Sec13 protein 8* ; mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; mTORC1 : mTOR complexe 1 ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; PTEN : *Phosphatase and tensin homologue* ; PRAS40 : *proline-rich AKT substrate 40 kDa* ; Raptor : *regulatory protein associated with mTOR* ; Rheb : *Ras homolog enriched in brain* ; S6K1 : *S6 kinase 1* ; TSC : *tuberous sclerosis complex*.

II. Effets immunitaires de la voie mTORC1

a. Activation immunitaire de la voie mTORC1

Dans les cellules immunitaires, les PI3Ks de classe IA peuvent être activées par de multiples récepteurs associés aux tyrosine-kinases de surface (BCR, TCR, TLR, CD19, ICOS, PD-1, CTLA-4) qui portent des motifs YXXM dans leur domaine cytoplasmique (Jung, 2018). PI3K δ est l'isoforme catalytique essentiellement exprimée dans les cellules immunitaires (Nunes-Santos, 2019). Après l'activation du récepteur, les motifs YXXM phosphorylés fournissent des sites pour le domaine SH2 de la sous-unité régulatrice p85 qui entraîne la sous-unité catalytique p110 à la membrane (Jung, 2018). De façon directe et indirecte par l'activation de PI3K et Akt, la costimulation par CD28 permet d'augmenter le flux glycolytique, pour que les lymphocytes T anticipent les besoins énergétiques et biosynthétiques associés à une réponse soutenue (Frauwirth, 2002).

Dans les lymphocytes T, mTOR peut être activée par 3 grandes catégories de signaux : (1) les signaux d'activation immunitaire transmis par les DC (stimulation antigénique, costimulation et cytokines), (2) les signaux environnementaux comme les facteurs de croissance et immunomodulateurs, (3) les signaux métaboliques dont principalement les nutriments. Dans les lymphocytes T naïfs, TSC est actif et contrôle mTORC1, tandis qu'après stimulation antigénique, TSC est inactivée par les signaux du TCR et autorise l'activation de mTORC1 (Chi, 2012).

mTORC1 et mTORC2 sont tous les deux activés en quelques minutes après la stimulation du TCR. L'importance de l'activation de mTOR est directement corrélée à la durée de l'interaction lymphocyte T-DC et à la quantité d'antigène reconnu (Turner, 2009).

b. Régulation des lymphocytes T

i. Fonction et métabolisme cellulaire

Les lymphocytes T au repos sont cataboliques et utilisent l'autophagie pour produire l'énergie et les molécules nécessaires à la synthèse protéique. Après activation, les lymphocytes T deviennent anaboliques et passent à la glycolyse pour produire de l'énergie et les divers substrats requis pour proliférer. La transition de l'état de repos à l'état actif nécessite l'activation de voies métaboliques contrôlées par mTORC1 (Akabay, 2020).

L'activation des lymphocytes requiert une biosynthèse significativement augmentée de protéines, de nucléotides et de lipides (Powell, 2012).

L'activation de PI3K par CD28 conduit à l'activation d'Akt, et de mTORC1. L'importance de ces voies métaboliques dans la fonction lymphocytaire est mise en évidence par le fait que le blocage de ces voies inhibe l'activation des lymphocytes T. De plus, malgré une stimulation adéquate par les facteurs de croissance, l'activité de mTORC1 nécessite également la présence d'acides aminés. Les besoins métaboliques spécialisés de l'activation des lymphocytes T représentent une cible de choix pour la régulation de leur fonction. Les lymphocytes T anergiques présentent une activation diminuée de mTOR en réponse à une nouvelle activation. La reconnaissance du TCR en l'absence d'activité mTOR conduit à l'anergie ou à la génération de T_{REG}. À l'inverse, l'activation du TCR dans différentes conditions entraîne une différenciation effectrice dépendant de mTORC1 ou mTORC2 (Powell, 2012).

L'activation complète des lymphocytes T est associée avec une augmentation de la phosphorylation de S6K1, cible de mTOR. À l'inverse, l'induction de l'anergie aboutit à une diminution importante de phosphorylation de S6K1 (Zheng, 2007).

L'hyperactivité de mTORC1 altère l'activation et la fonction des lymphocytes T (Wang, 2012). Les lymphocytes T déficients en TSC1 présentent une activité mTORC1 renforcée, comme attendu, mais échouent, au moins initialement, à produire des réponses immunitaires efficaces (Yang, 2011).

ii. Différenciation en lymphocytes T CD4⁺ effectrices

Les lymphocytes T CD4 se différencient en lignées effectrices en réponse aux cytokines inflammatoires qui les environnent. mTORC1 soutient ce processus en favorisant la glycolyse et la biosynthèse lipidique (Akbay, 2020).

Après activation, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs déficients en mTOR échouent à se différencier en T_{H1}, T_{H2} ou T_{H17}, mais deviennent au contraire des lymphocytes T Foxp3⁺. De plus, les lymphocytes T déficients en Rheb échouent à se différencier en T_{H1} et T_{H17} (Akbay, 2020). Au contraire, l'activation de mTORC1 par la délétion de TSC1 facilite la génération de lymphocytes T_{H1} et T_{H17}, alors que l'activation de mTORC2 favorise la génération de lymphocytes T_{H2} (Powell, 2012).

L'activation de mTOR suivant la stimulation antigénique favorise la différenciation en lymphocytes effecteurs T_{H1}, T_{H2} et T_{H17} et inhibe l'induction de lymphocytes T_{REG} (Chi, 2012).

iii. Régulation des lymphocytes T_{REG} CD4⁺Foxp3⁺

Si la voie mTOR inhibe l'induction de lymphocytes T_{REG}, elle devient ensuite un rhéostat important dans la fonction et l'homéostasie des T_{REG} notamment en coordonnant la prolifération des T_{REG} et l'expression de CTLA-4 et ICOS. L'activité de base de mTORC1 est plus élevée dans les T_{REG} que dans les lymphocytes T naïfs (Zeng, 2013).

Les lymphocytes T_{REG} Foxp3⁺ présentent un avantage sélectif pour proliférer en l'absence d'activation de mTOR. En présence de rapamycine, les T_{REG} sont plus résistants à l'apoptose. De plus, ils sont connus pour développer une activation de mTORC1 diminuée après stimulation, en partie par l'augmentation de PTEN, inhibiteur de PI3K (Powell, 2012).

Tout comme l'inhibition de mTOR favorise la génération de T_{REG} , l'activation de l'axe Akt-mTOR par l'expression forcée d'Akt constitutivement actif bloque la génération de lymphocytes Foxp3^+ dans le thymus. Cet effet n'est pas retrouvé dans la délétion sélective de mTORC1 ou mTORC2 (Powell, 2012).

iv. Régulation des lymphocytes $T \text{ CD8}^+$

Les lymphocytes $T \text{ CD8}$ peuvent lyser les cellules cancéreuses ou infectées par les virus (lymphocytes T cytotoxiques) et maintenir une mémoire immunitaire à long terme (lymphocytes T mémoires). L'augmentation de l'activité de mTORC1 est favorable à la génération des lymphocytes $T \text{ CD8}$. Par contraste, l'activité de mTORC1 inhibe la formation de lymphocytes T mémoires, provoquant une réponse diminuée à une immunisation secondaire (Akabay, 2020).

Les lymphocytes $T \text{ CD8}^+$ sans mTORC1 échouent à devenir des lymphocytes effecteurs. D'un autre côté, la délétion de TSC2 permet de générer des lymphocytes $T \text{ CD8}^+$ avec une hyperactivité de mTORC1. L' $\text{IFN}\gamma$ et l'IL-12 conduit à l'expression prolongée mTORC1-dépendante de T-bet dans les lymphocytes $T \text{ CD8}^+$. La reconnaissance antigénique des lymphocytes $T \text{ CD8}^+$ conduit à la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 par l'activation de mTORC1 (Powell, 2012).

v. Circulation des lymphocytes T

Tout comme mTOR favorise la génération de lymphocytes T effectrices, l'axe PI3K-mTOR joue un rôle dans la régulation négative des récepteurs de chimiokines impliqués dans la circulation des lymphocytes T . Lors de la résolution d'une infection, le nombre de lymphocytes $T \text{ CD8}^+$ antigène-spécifiques débute une transition de l'anabolisme au catabolisme, d'une forte activité mTOR à une faible activité mTOR, et de lymphocytes effecteurs à lymphocytes mémoire. Ces transitions sont accompagnées de la réexpression de récepteurs de chimiokines qui permet aux nouveaux lymphocytes mémoires d'entrer et de sortir des organes lymphoïdes (Powell, 2012).

c. Régulation des lymphocytes B

Par rapport aux données concernant les lymphocytes T, celles concernant le rôle de mTOR dans la régulation de la différenciation et de la fonction des lymphocytes B sont relativement rares (Powell, 2012).

Comme évoqué précédemment, les lymphocytes B traversent de nombreuses étapes de maturation avant de devenir des plasmablastes et d'acquérir la capacité de sécréter des anticorps, ce qui est majeur dans la défense immunitaire. mTORC1 est particulièrement activé dans les étapes précoces du développement des lymphocytes B, et son activité diminue au fil de la maturation des lymphocytes B. Cette dernière étape est complètement abolie par la délétion homozygote de Raptor (Akabay, 2020).

Dans le modèle de souris mTOR hypomorphes, le développement des lymphocytes B est plus affecté que celui des lymphocytes T. Il existe des blocages partiels à certains stades du développement des précurseurs des lymphocytes B. Fonctionnellement, ils présentent une prolifération défectueuse en réponse aux mitogènes de lymphocytes B. De plus, la signalisation par le BCR est plus altérée que celle du TLR. Ainsi, la production d'anticorps est également diminuée. Inversement, la délétion de TSC1 entraîne une hyperactivité de mTORC1 associée à des défauts de maturation conduisant à une réduction de la production d'anticorps (Powell, 2012).

La signalisation du BCR conduit à une augmentation de l'activité de mTOR, proportionnellement à l'exposition antigénique. L'engagement des FcR inhibiteurs provoque l'inhibition de la signalisation PI3K et potentiellement la réduction de l'activité de mTOR. Ainsi, l'augmentation de l'activité de mTOR par le BCR et sa suppression par les FcR mettent en évidence un rôle majeur de mTOR dans les signaux qui affectent la fonction des lymphocytes B (Powell, 2012).

d. Régulation des cellules présentatrices d'antigènes

mTOR régule des fonctions variées des APC comme les DC. Le blocage de mTOR par la rapamycine altère la fonction, la maturation et le processus de macropinocytose des DC (Thomson, 2009).

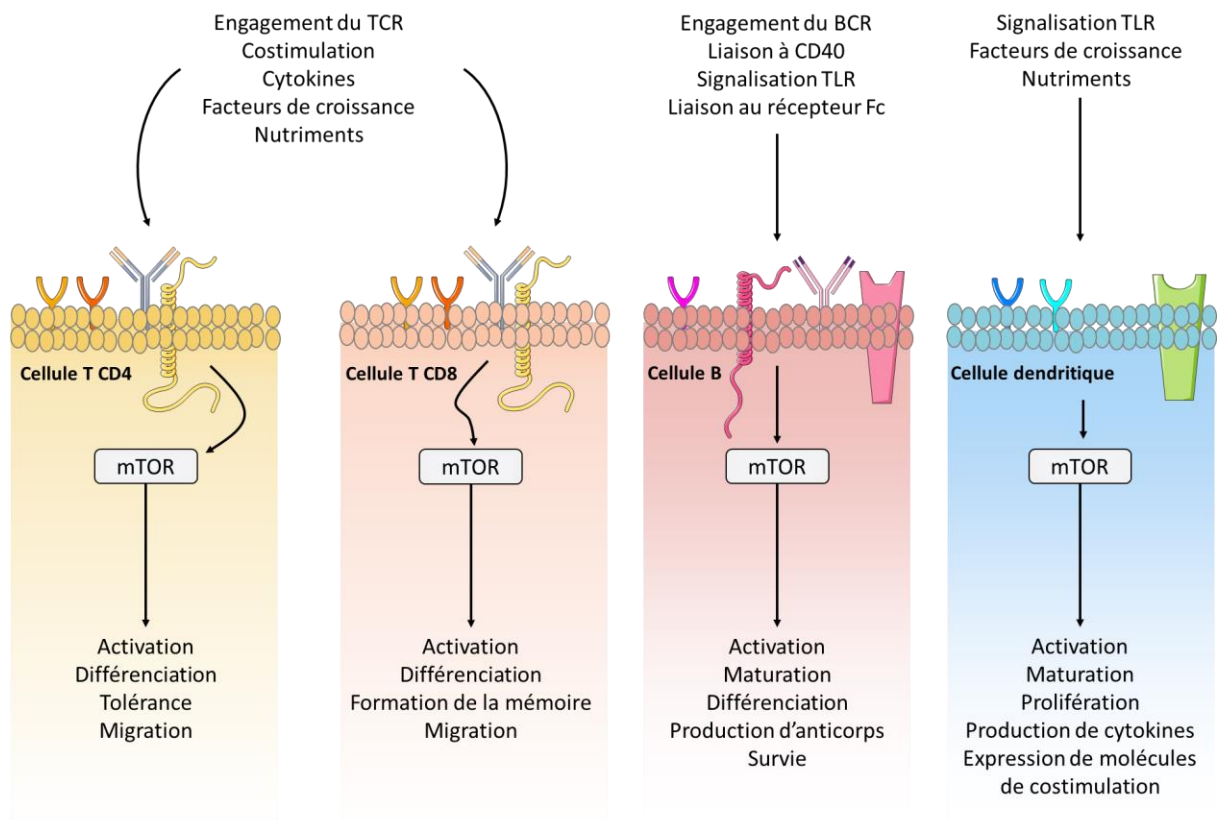
La régulation de la signalisation mTORC1 joue un rôle dans le maintien de la composition des DC *in vivo*. Dans les DC primaires, les monocytes et les macrophages, la signalisation mTOR inhibe l'expression de l'IL-12 et favorise la production de l'IL-10 (Powell, 2012).

e. Rôle dans la tolérance immunitaire

CTLA-4 étant un régulateur négatif de la costimulation par CD28, il bloque l'activation des lymphocytes T en empêchant l'augmentation d'absorption du glucose, notamment par l'inhibition de l'activation d'Akt (Frauwirth, 2002). L'axe PD1-PDL1, autre régulateur négatif de la costimulation des lymphocytes T, induit une diminution de la signalisation mTOR, favorisant la tolérance immunitaire (Francisco, 2009).

Le traitement par rapamycine réduit la fonction des lymphocytes T CD8 effecteurs, mais favorise la formation de lymphocytes mémoires et de l'immunité anti-tumorale (Rao, 2010). L'inhibition de mTOR par la rapamycine induit l'anergie des lymphocytes T CD4⁺ et/ou la différenciation en T_{REG} (Zheng, 2007).

Figure 11. mTORC1 dans les réponses immunitaires



III. Syndromes monogéniques par mutations de la voie mTOR

Les mutations somatiques affectant la voie mTOR sont classiquement associées aux cancers (Fruman, 2017).

Cependant, il existe des syndromes monogéniques causés par des mutations de certains gènes codant pour des partenaires clés de la signalisation mTORC1. Ces syndromes monogéniques sont résumés dans le Tableau 9 (Hillmann, 2019). Ils conduisent principalement à un phénotype de troubles de la croissance cellulaire ; mais dans certains cas, ils produisent des effets délétères sur le système immunitaire. Les syndromes monogéniques par mutations de la voie mTOR responsables de déficit immunitaire et/ou de manifestations auto-immunes sont décrits ici.

Tableau 9. Pathologies associées à des mutations de la voie PI3K/mTOR

Mutation	Pathologie
PIK3CA (p110α)	Syndrome d'hypercroissance associé à une mutation de PIK3CA Hémimégalencéphalie Lipomatose congénitale infiltrante de la face Macroductilie des doigts unilatérale Macroductilie des orteils unilatérale Syndrome CLOVES Syndrome de croissance segmentaire progressive avec hyperplasie fibroadipeuse Syndrome de la lipomatose multiple-hémihyperplasie Syndrome mégalencéphalie-malformation capillaire-polymicrogyrie
PIK3CD (p110δ)	Syndrome de PI3K δ activé (type 1)
PIK3R1 (p85α)	Syndrome de PI3K δ activé (type 2)
PTEN	Syndrome tumoral hamartomateux lié à PTEN Syndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba Syndrome de Cowden
mTOR	Syndrome de Smith-Kingsmore : syndrome de macrocéphalie-déficience intellectuelle-trouble neurologique du développement-petit thorax Dysplasie corticale focale isolée de type IIA et IIB Hémimégalencéphalie
LAMTOR2	Syndrome de déficit immunitaire primaire par déficit en LAMTOR2
AKT	Méningiome Syndrome de Cowden Syndrome de Protée
TSC1/2	Carcinome hépatocellulaire de l'adulte Dysplasie corticale focale isolée de type IIB Lymphangioléiomyomatose Sclérose tubéreuse de Bourneville
AMPK	Malformation focale corticale Cardiomyopathie hypertrophique familiale
LKB1	Syndrome de Peutz-Jeghers

a. Déficit immunitaire par hyperactivation de PI3K δ

Selon le gène muté, le syndrome de PI3K δ activé (APDS) est classé en : (1) APDS-1, causé par des mutations hétérozygotes gain-de-fonction de *PIK3CD* ; (2) APDS-2, causé par des mutations hétérozygotes perte-de-fonction de *PIK3R1* ; (3) APDS-L causé par des mutations perte-de-fonction de *PTEN* (Nunes-Santos, 2019).

i. APDS-1 par mutations gain-de-fonction de *PIK3CD*

1. Bases moléculaires

Les lymphocytes des patients qui portent des mutations hétérozygotes de *PIK3CD* présentent une activité kinase de PI3K δ accrue, mise en évidence par une augmentation de la production de PIP₃ et de la phosphorylation d'Akt, affirmant l'effet gain-de-fonction de la mutation. A ce jour, 10 mutations différentes ont été décrites dans l'APDS-1 (Nunes-Santos, 2019).

2. Phénotype clinique

Les infections des voies aériennes supérieures et inférieures sont retrouvées chez 96% des patients, avec des bronchiectasies pour 60% d'entre eux. La candidose cutanéomuqueuse est présente chez 13% des patients. Près de la moitié des patients souffrent d'infections sévères, chroniques, récidivantes, à herpes virus, en particulier à EBV et CMV (Nunes-Santos, 2019).

La lymphoprolifération se manifeste par des lymphadénopathies réactionnelles, une splénomégalie et/ou une hépatomégalie. Elle est présente chez 75 à 91% des patients. L'hyperplasie lymphoïde nodulaire des surfaces muqueuses est caractéristique de l'APDS. Elle atteint les voies aériennes et le tube digestif, et entraîne obstruction, saignement, diarrhée chronique et malabsorption. Les patients atteints d'APDS-1 sont particulièrement à risque de développer des tumeurs malignes, principalement des lymphomes B, présents chez 13% d'entre eux, avec un risque cumulé de 78% à l'âge de 40 ans (Nunes-Santos, 2019).

Les manifestations auto-immunes ne sont pas rares, avec un tiers des patients APDS-1 présentant des cytopénies auto-immunes. Les autres atteintes retrouvées comprennent : thyroïdite auto-immune, syndrome néphrotique, glomérulonéphrite, diabète insulino-dépendant, insuffisance pancréatique exocrine, HAI, arthrite, syndrome de Gougerot-Sjögren et péricardite. Une entéropathie symptomatique (diarrhée chronique, malabsorption) est retrouvée chez un quart des patients atteints d'APDS-1 (Nunes-Santos, 2019).

Un retard de neurodéveloppement est décrit chez 19% des patients avec APDS-1, avec macrocéphalie et troubles du spectre autistique (Nunes-Santos, 2019).

3. Caractéristiques immunologiques

Les anomalies les plus fréquentes retrouvées chez les patients atteints d'APDS comprennent une lymphopénie B, avec une réduction des lymphocytes B naïfs et mémoire, et une augmentation marquée des lymphocytes B de transition. Chez les patients APDS-1, cette anomalie est cliniquement associée à l'auto-immunité. Dans le compartiment T, les nombres de T naïfs sont fréquemment réduits, alors que les CD8⁺ mémoires ré-exprimant CD45RA sont plus abondants, conduisant à une inversion du ratio CD4/CD8 (Nunes-Santos, 2019).

La cytotoxicité des lymphocytes NK est défectueuse chez les patients atteints d'APDS-1, alors qu'on retrouve une apoptose augmentée des lymphocytes B et T. L'hyperphosphorylation d'Akt et de S6 dans les lymphocytes activés des patients avec APDS est une découverte majeure soulignant l'hyperactivation de la voie PI3K-Akt-mTOR. L'hyperphosphorylation d'Akt en conditions de base est facilement détectable *ex vivo*, en particulier dans les lymphocytes B (Nunes-Santos, 2019).

4. Traitement

La corticothérapie a, pendant longtemps, été le traitement le plus utilisé.

Une fois le rôle de la voie PI3K-Akt-mTOR caractérisé, le traitement par rapamycine a été encouragé par des études *in vitro* démontrant la possibilité de rétablir une activité normale de

mTOR. Elle permet de contrôler la lymphoprolifération de façon spectaculaire, mais les résultats concernant les cytopénies et l'entéropathie ne sont pas satisfaisants. De plus, les effets secondaires restent problématiques : ulcères aphtoïdes, toxicité hépatique et rénale, céphalées sévères, anorexie. De nouvelles pistes thérapeutiques sont à l'étude, comprenant les inhibiteurs spécifiques de PI3K δ ou la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (Nunes-Santos, 2019).

ii. APDS-2 par mutations perte-de-fonction de *PIK3R1*

1. Bases moléculaires

Les patients atteints d'APDS-2 portent, pour la plupart, des mutations hétérozygotes dans un site d'épissage qui conduit à l'exclusion de l'exon 11 dans *PIK3R1*. Une mutation hétérozygote faux-sens dans le domaine SH2 de *PIK3R1* a également été décrite. Ces mutations perte-de-fonction interrompent l'interaction entre les deux sous-unités et entraînent une perte d'inhibition dans la sous-unité catalytique p110 δ par p85 α , se conduisant ainsi comme des mutations gain-de-fonction de PI3K δ (Nunes-Santos, 2019).

2. Phénotype clinique

Dans la cohorte d'APDS-2 d'Elkaim *et al*, tous les patients présentent des infections des voies respiratoires hautes, 70% des infections des voies respiratoires basses et 18% des bronchiectasies. La candidose cutanéomuqueuse touche 8% des patients et les infections chroniques à herpes virus 36% (Elkaim, 2016 ; Nunes-Santos, 2019). La lymphoprolifération est retrouvée chez 89% des patients. Un tiers de la cohorte présente un lymphome B. Les cytopénies auto-immunes sont présentes chez 8% des patients. Une entéropathie symptomatique est retrouvée dans un quart de la cohorte. Un retard de neurodéveloppement est décrit chez 31% des patients, et quelques microcéphalies ont été rapportées ; 60% des patients sont de petite taille (Elkaim, 2016).

3. Caractéristiques immunologiques

La lymphopénie B, l'inversion du ratio CD4/CD8 et l'hyperphosphorylation d'Akt et de S6 dans les lymphocytes activés sont retrouvées chez les patients atteints d'APDS2 (Nunes-Santos, 2019).

iii. APDS-L par mutations perte-de-fonction de *PTEN*

1. Bases moléculaires

Les mutations germinales de *PTEN* conduisent à divers syndromes caractérisés par un risque accru de tumeurs bénignes et malignes, une macrocéphalie, un retard de développement psychomoteur et des troubles du spectre autistique. Aucun déficit immunitaire n'a été identifié dans les pathologies associées aux mutations germinales perte-de-fonction de *PTEN*, mais la présence d'anomalies immunologiques a été soulignée dans certaines publications (Nunes-Santos, 2019).

2. Phénotype clinique

Des infections récidivantes des voies respiratoires hautes et basses ont été rapportés parmi les patients atteints d'APDS-L, mais les infections virales ne sont pas fréquentes. L'hyperplasie lymphoïde est retrouvée chez 24% des patients porteurs de mutations germinales de *PTEN*. Près d'un tiers de la cohorte de patients avec APDS-L présente des manifestations auto-immunes. Le retard neurodéveloppemental est habituel (Nunes-Santos, 2019).

3. Caractéristiques immunologiques

Si la fréquence des populations de T_{REG} reste normale chez les patients avec APDS-L, les nombres absolus sont diminués par rapport à la normale. L'augmentation de la phosphorylation d'Akt est rapportée comme étant plus modérée par rapport aux APDS-1 et APDS-2 (Nunes-Santos, 2019).

b. Déficit immunitaire par défaut d'activation de $PI3K\delta$

Les mutations perte-de-fonction de la voie $PI3K\delta$ sont significativement plus rares que les variants gain-de-fonction. Elles sont décrites chez neuf patients issus de six familles différentes (Nunes-Santos, 2019). Trois patients portent des mutations bialléliques de *PIK3R1* et six patients de *PIK3CD* (Nunes-Santos, 2019).

L'expression de la protéine p110δ est fortement réduite voire abolie chez trois des six patients avec des mutations de *PIK3CD*. D'autres études montrent que ce mutant p110δ peut interagir normalement avec la sous-unité régulatrice p85α mais n'est pas capable de convertir PIP₂ en PIP₃, démontrant une perte de l'activité kinase. Chez un patient avec mutation de *PIK3R1*, l'expression protéique de p85α est absente, avec une diminution de l'expression de p110δ (Nunes-Santos, 2019).

Le phénotype clinique comprend : des infections des voies respiratoires hautes et basses, chez tous les patients ; une entéropathie, chez huit patients ; une œsophagite à *Candida* chez un patient ; une arthrite chez quatre patients ; un psoriasis chez deux patients ; une HAI chez un patient. Deux patients présentent de multiples dysmorphismes, anomalies ostéo-squelettiques et un retard neurodéveloppemental. La moitié des patients est décédée d'infections sévères. Tous les patients présentent une hypogammaglobulinémie ou une agammaglobulinémie et une lymphopénie B quasi-totale (Nunes-Santos, 2019).

c. Déficit immunitaire primaire par déficit en *LAMTOR2*

En 2007, Bohn *et al* décrivent quatre enfants d'une fratrie de 15 issue d'une famille caucasienne. Leur phénotype clinique associe une petite taille, une peau hypopigmentée, des traits grossiers et des infections bronchopulmonaires récurrentes à *Streptococcus pneumoniae*. Les individus atteints présentent des quantités de neutrophiles périphériques constamment réduites, alors que la maturation des neutrophiles dans la moelle osseuse reste intacte. Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques des individus affectés possèdent une activité cytotoxique réduite par rapport aux individus sains de leur famille. L'analyse structurelle et fonctionnelle suggère une maturation et une fonction anormale des lysosomes spécialisés dans les lymphocytes T cytotoxiques, les mélanocytes et les granulocytes. L'expression de *LAMTOR2* est deux fois moins importante chez les individus atteints par rapport aux individus sains. L'analyse de la séquence a montré une mutation homozygote de l'exon 4 (Bohn, 2007).

PARTIE 4 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le travail présenté ici cherchera à apporter des éléments de réponses à la problématique suivante : rechercher les bases génétiques de la rupture de tolérance immunitaire à l'origine des hépatites auto-immunes et déterminer leur impact moléculaire et fonctionnel.

Pour cela, les axes suivants seront approfondis :

- Sur le plan génétique, recherche de variants-candidats potentiellement délétères qui pourraient être impliqués dans la physiopathologie des HAI ;
- Sur le plan clinique, recherche d'une association entre la présence de variants-candidats et le phénotype clinique des patients ;
- Sur le plan moléculaire, recherche des conséquences des variants-candidats sur la protéine codée et la voie de signalisation sous-jacente ;
- Sur le plan immuno-phénotypique, recherche d'anomalies immunitaires distinctives entre les patients porteurs de variants-candidats et les autres ;
- Sur le plan immunologique fonctionnel, analyse du rôle des variants-candidats et de leur voie de signalisation dans les cellules immunitaires ;
- Sur le plan des pistes thérapeutiques, étude du rétablissement d'un phénotype sain par inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation mise en cause par les variants-candidats.

METHODES

I. Patients

a. Recrutement des patients

Le laboratoire reçoit en routine des échantillons sanguins de patients atteints de pathologies auto-immunes à début pédiatrique adressés par de multiples centres internationaux.

Les patients recrutés pour la cohorte d'étude sont issus de quatre centres : le service d'Hépatologie et Transplantation Hépatique Pédiatrique de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre (Le Kremlin-Bicêtre, France), le Centre Hépatobiliaire de l'Hôpital Paul Brousse (Villejuif, France), le service d'Hépatologie Pédiatrique de l'hôpital de Saint-Etienne (Saint-Etienne, France) et le service d'allergie et d'immunologie pédiatrique de l'hôpital pédiatrique de Manchester (Manchester, Royaume-Uni).

b. Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion dans la cohorte d'étude étaient : (i) diagnostic avéré d'hépatite auto-immune et (ii) disponibilité du matériel génétique.

Le diagnostic d'hépatite auto-immune était entériné par les critères publiés et admis par consensus international : l'IAIHG et l'ESPGHAN. Les critères de l'IAIHG permettaient de déterminer un score avant et après traitement, définissant une HAI probable entre 10 et 15 points et certaine au-dessus de 15 points avant traitement et une HAI probable entre 12 et 17 points et certaine au-dessus de 17 points après traitement (Alvarez, 1999). Les critères simplifiés permettaient de définir une HAI probable au-dessus de 6 points et certaine au-dessus de 7 points (Hennes, 2008). Les critères de l'ESPGHAN permettaient de définir une HAI probable au-dessus de 7 points et certaine au-dessus de 8 points (Mieli-Vergani, 2018). Les dossiers cliniques ont été examinés par des cliniciens experts pour décider de l'inclusion de chaque patient dans la cohorte d'étude.

Les patients ont été inclus rétrospectivement depuis l'année 2000 (début de l'étude génétique des patients avec HAI) et prospectivement de 2018 à 2020.

c. Recueil des données

Des informations cliniques minimales sont enregistrées pour chaque patient adressé au laboratoire. Pour les patients inclus dans la cohorte d'étude, une recherche exhaustive des données médicales de chaque dossier clinique a été réalisée à travers les données enregistrées dans les logiciels informatiques hospitaliers ou, à défaut, dans les archives physiques. Les données épidémiologiques, démographiques, familiales, cliniques, biologiques, iconographiques, histologiques, thérapeutiques et d'évolution ont été recueillies.

d. Traitement des échantillons sanguins

Pour chaque patient, un échantillon sanguin est prélevé sur tube d'héparinate de lithium pour la congélation de cellules mononucléées circulantes sanguines, ou d'EDTA pour l'extraction d'ADN génomique.

Un échantillon de sang total est conservé à -20°C. Le plasma est séparé par centrifugation et conservé à -20°C. Les cellules mononucléées circulantes sanguines sont séparées par gradient de densité. Elles sont ensuite lavées, numérées avec un compteur de cellule automatisé (Countess™, Invitrogen) puis congelées (Mr Frosty™, Invitrogen) et conservées dans l'azote liquide.

II. Biologie moléculaire

a. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique est extrait par la méthode du phénol-chloroforme et purifié à partir des échantillons de sang total selon la technique préalablement publiée (Miller, 1988).

b. Séquençage complet de l'exome

A partir de 3 µg d'ADN génomique ayant subi un contrôle qualité strict, l'ADN est capturé par une méthode d'enrichissement en solution (*Human All Exon v5—50 Mb*, Agilent Technologies, Californie, Etats-Unis).

Des banques d'exome enrichi (~20 000 gènes cibles) sont préparées sur un système automatisé, avec le robot NGSx (Perkin Elmer Inc, Massachussets, Etats-Unis) et le robot Bravo (Agilent Technologies, Californie, Etats-Unis) selon les instructions des fournisseurs.

Après normalisation et contrôle qualité, les banques d'exome enrichi sont séquencées sur un système HiSEQ 2000 (Illumina Inc., Californie, Etats-Unis) à partir des deux extrémités en fragments de 100 paires de bases.

La couverture moyenne de séquençage était au moins de 60 à 70x pour chaque échantillon. L'analyse des images et la lecture des profils bruts sont réalisées avec l'Illumina *Real Time Analysis Pipeline*. Les paramètres de qualité de séquence sont examinées quotidiennement par cycle de séquençage de 12 jours. Les séquences sont alignées avec le génome humain de référence hg19, par l'aligneur Burrows-Wheeler.

La suite de l'analyse est réalisée avec le *Genome Analysis Toolkit* (GATK), SAMtools, et Picard. Les variants sont qualifiés avec le GATK *Unified Genotyper*. Tous les profils bruts avec une couverture de lecture de séquence $\leq 2X$ ou un score de qualité SNP *Phredscaled* ≤ 20 ont été retirés de l'analyse.

Tous les variants ont été annotés par un logiciel développé par la plateforme de Bioinformatique de l'Université Paris Descartes (PolyWeb). Toutes les procédures d'annotation sont basées sur la dernière version de la base de données Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Cette technique a été réalisée en collaboration avec la plateforme de Génomique de l'Institut Imagine.

c. Traitement des données du séquençage complet de l'exome

i. Critères de sélection d'un variant-candidat

Un variant était considéré comme candidat en fonction des paramètres suivants :

- Sa rareté :
 - Parmi les variants rapportés dans la littérature internationale, évaluée par GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) ;
 - Parmi les variants retrouvés au sein de la base de données de séquençage complet de l'exome et du génome de tous les patients étudiés à l'Institut Imagine, évalué par le logiciel interne (PolyWeb) ;
- Sa pathogénicité prédite :
 - En tant que variant génétique, évaluée par le score *Combined Annotation-Dependent Depletion* (CADD, <https://cadd.gs.washington.edu/>), considéré comme délétère si > 20 ;
 - En tant que conséquence protéique potentielle, évaluée par le score *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT, <https://bio.tools/sift>), considéré comme délétère si $< 0,05$; et *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), considéré comme délétère si $> 0,85$;
- Sa pertinence biologique dans le contexte du phénotype du patient :
 - Utilisant la base de données OMIM (<https://www.omim.org/>) ;
 - Par une recherche bibliographique de relation génotype-phénotype ;
- Sa position au sein de la protéine codée :
 - De façon générale, évaluée en utilisant la base de données UniProt (<https://www.uniprot.org/>) ;
 - Dans les domaines d'activité de la protéine, évaluée en utilisant MassIVE (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) ;

- En tant que site de phosphorylation, d'ubiquitination ou d'acétylation, évaluée en utilisant PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/>) ;
- Ses conséquences structurelles sur la protéine codée :
 - Selon sa position dans la conformation tridimensionnelle de la protéine, évaluée en utilisant PDB (<https://www.rcsb.org/>) ;
 - Selon les caractéristiques de l'acide aminé échangé, évalué en utilisant HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>) (Venselaar, 2010).

ii. Analyses supervisées

Parmi les données de séquençage complet de l'exome, une recherche supervisée de variants présents dans une liste actualisée des gènes responsables de déficits immunitaires primitifs (Annexe 1A) a été réalisée avec le logiciel PolyWeb, avec les filtres suivants : variant retrouvé < 1% dans les bases de données internationales et < 10 fois dans la base de données interne de l'Institut Imagine.

Une recherche supervisée de variants présents dans une liste actualisée des gènes responsables de déficits immunitaires primitifs AL-PID (Annexe 1B) a été réalisée avec le filtre suivant : variant retrouvé < 5% dans les bases de données internationales.

Une recherche supervisée de variants transmis selon un modèle familial récessif a été réalisée avec les filtres suivants : variant retrouvé < 1% dans les bases de données internationales et < 10 fois dans la base de données interne de l'Institut Imagine.

iii. Analyse non supervisée

Les données de séquençage complet de l'exome ont ensuite été analysées uniquement sur la base des paramètres de sélection d'un variant-candidat, sans liste de gènes ni mode de transmission imposé.

d. Méthode de séquençage de type Sanger

La méthode de séquençage de type Sanger a été utilisée pour confirmer les résultats du séquençage complet de l'exome et analyser la ségrégation familiale de chaque variant-candidat.

Les amorces ont été conçues à l'aide du logiciel ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>) et de Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) à partir de la séquence de référence issue de la base de données Ensembl. Elles ont été produites par Eurofins Genomics. Les amorces utilisées pour les PCR sont détaillées dans l'Annexe 2.

L'ADN génomique est amplifié avec des amorces spécifiques, avec le kit d'amplification de la polymérase GoTaq® (Promega) selon les instructions du fournisseur. Après 40 cycles au thermocycleur, les produits de PCR (réaction en chaîne de polymérase) sont vérifiés par migration sur gel d'agarose 1%.

Ils sont ensuite purifiés par centrifugation sur gel de filtration (Sephadex™ G-50, Cytiva) puis séquencés avec BigDye™ Terminator (Invitrogen).

Les produits de séquençage sont purifiés de nouveau par centrifugation sur gel de filtration (Sephadex™ G-50, Cytiva), puis lus par électrophorèse capillaire sur le 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Les séquences sont analysées et alignées sur les séquences de référence à l'aide du logiciel ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/>).

III. Profil immunitaire

a. Immunophénotypage lymphocytaire

Les anticorps suivants sont ajoutés aux cellules mononucléées circulantes sanguines décongelées : anti-CD3 BV510 (OKT3) (iCyt-Sony 2186660), anti-CD4/4 FITC (Leu3a+3b) (BD347413), anti-CD25 PE (2A3) (BD 341011), anti-CD127 PeCy7 (HIL-7R-M21) (BD 560822), anti-CD45RA APC Vio770 (T6D11) (Miltenyi – 130-096-604). Après 30 minutes d'incubation sur glace à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées dans 2 ml de PBS par une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré délicatement et les cellules sont fixées et perméabilisées avec un ml de solution froide de fixation/perméabilisation du kit eBioscience™ (Invitrogen). Après 45 minutes à 2 heures d'incubation sur glace à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées deux fois dans le tampon de lavage de perméabilisation par une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Sur le culot, les anticorps suivants sont ajoutés directement : anti-FoxP3 APC (3G3) (Miltenyi 130-093-013), anti-Helios eF450 (22F6) (eBiosciences), anti-CTLA-4. Après 30 minutes à 2 heures d'incubation sur glace à l'abri de la lumière, les cellules sont lavées dans du tampon de lavage de perméabilisation et resuspendues dans 250 µl avant de passer au cytomètre en flux (Fortessa). Les données sont analysées avec FlowJo™ (BD Biosciences).

b. Dosage de cytokines plasmatiques

A partir des échantillons congelés de plasma, le dosage des 13 cytokines suivantes : IL-4, IL-2, CXCL-10, IL-1β, TNF-α, MCP-1, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN-γ, IL-12p70, IL-8 et TGF-β1 a été réalisé avec le kit multiplex LEGENDplex™ HU *Essential Immune Response Panel* (13-plex) w/VbP (BioLegend) selon les instructions du fournisseur.

c. Détection d'auto-antigènes plasmatiques

Le dosage simultané de 128 auto-antigènes (Annexe 3) a été réalisé dans les échantillons plasmatiques disponibles de 3 groupes d'individus : les individus sains, les patients porteurs de variants-candidats et les patients non porteurs de variants-candidats.

Cette technique (*Autoantigen Microarray for high-throughput autoantibody profiling*) a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Quan-Zhen Li (*Microarray Core, BioCenter, UT Southwestern Medical District, Dallas, Texas, Etats-Unis*).

IV. Culture cellulaire

a. Cellules mononucléées circulantes sanguines

Les cellules mononucléées circulantes sanguines sont congelées dans un milieu de congélation contenant 10% de DMSO dans du sérum fœtal de veau. La décongélation des ampoules se fait au bain-marie, puis les cellules sont lavées dans du RPMI par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes. Elles sont ensuite numérées au compteur automatisé de cellules (Countess™, Invitrogen) et utilisées pour les différentes techniques.

b. Lymphoblastes T

Après décongélation, les cellules mononucléées circulantes sanguines sont mises en culture dans un milieu contenant du RPMI, 10% de sérum fœtal de veau et 1% de pénicilline/streptomycine. Elles sont placées à une concentration de 2 millions/ml, et stimulées par des billes anti-CD3/CD28 selon les instructions du fournisseur (Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28, Invitrogen). Les cellules sont placées en incubateur stérile à 37°C et 5% de CO₂ pendant 72 heures. Elles sont ensuite lavées dans du RPMI par une centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes. La numération est réalisée par lecture au microscope sur lame Kova®, sur cellule de Malassez, ou avec le compteur automatisé de cellules (Countess™, Invitrogen). Les cellules sont remises en culture à la concentration de 0,5 à 1 million/ml avec de l'IL-2 (100 UI/L) en incubateur stérile pendant 48-72 heures. Elles peuvent ensuite être utilisées pour les différentes techniques.

La stimulation choisie par billes anti-CD3/CD28 et le délai de culture choisi de 6 jours des lymphoblastes étaient ceux permettant d'observer la plus grande différence de phosphorylation de S6K1 entre la condition de sevrage et de stimulation de la voie mTORC1 (Annexe 4A).

c. Lymphoblastes B immortalisés par l'EBV

A partir de sang total frais ou de cellules mononucléées circulantes sanguines congelées, une lignée de lymphoblastes B immortalisés par l'EBV pouvait être générée par le Centre de Ressources Biologiques de l'hôpital Necker (Paris, France).

V. Etudes physiologiques

a. Etude de l'activité de la voie mTORC1

La phosphorylation de S6K1 et de sa cible, la protéine ribosomale S6, permet d'étudier l'activité de la voie mTORC1. Lorsque mTORC1 est activé, il conduit à la phosphorylation de S6K1, étudiée par Western-Blot (cf Biochimie) et, par conséquence, de celle de sa cible, la protéine ribosomale S6, étudiée par cytométrie en flux.

Les cellules sont lavées avec du PBS par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes. Après retrait du surnageant, les cellules sont transférées dans un tube pour cytométrie en flux dans 500 µl de sérum fœtal de veau. Pour les cellules mononucléées circulantes sanguines, les anticorps suivants sont ajoutés à 1 µl/million de cellules : anti-CD3 PeCy7 (BD 345765), anti-CD4 BV510 (BioLegend, BLE317444), anti-CD19 BV421 (BioLegend, 302234), anti-CD45RA PE (Immunotech, 1834), anti-CD14 FITC (Miltenyi, 130-080-701).

Après incubation pendant 30 minutes en incubateur stérile à 37°C et 5% de CO₂, les cellules sont fixées et perméabilisées avec le kit PerFix EXPOSE (Beckman-Coulter) selon les instructions du fournisseur. L'anticorps anti-phospho-S6 (Ser240/244) (D68/F8) Alexa Fluor® 647 (Cell Signaling Technology, 5044) est ajouté après fixation et perméabilisation. L'isotype utilisé est un IgG de lapin (Alexa Fluor® 647 Conjugate) (Cell Signaling Technology, 3452), à la même concentration que l'anticorps anti-phospho-S6 (1 µl/million de cellules). Les cellules sont incubées à température ambiante à l'abri de la lumière pendant 30 à 60 minutes. Elles sont lavées dans le tampon de lavage du kit. Le surnageant est retiré délicatement puis les cellules sont passées au cytomètre en flux (Fortessa). Les données sont analysées avec FlowJo™ (BD Biosciences).

b. Inhibition de la voie mTORC1

Le sevrage en acides aminés inhibe la voie mTORC1, conduisant à une déphosphorylation de ses substrats, notamment S6K1 et S6. Après deux lavages dans du PBS par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes, les cellules sont sevrées pendant une heure en milieu sans acides aminés (RPMI *w/o aminoacids*, US Biologicals) en incubateur stérile à 37°C et 5% de CO₂. Elles peuvent ensuite être utilisées pour les différentes techniques.

La durée de sevrage choisie était la plus courte durée pour laquelle on observait une disparition de la phosphorylation de S6K1 et de S6 (Annexe 4B).

c. Stimulation de la voie mTORC1

La voie mTORC1 peut être activée notamment par l'apport en acides aminés et en facteurs de croissance, ou par l'activation métabolique et de récepteurs immunitaires. Les lymphoblastes étant des cellules en cours de prolifération, il est nécessaire de les sevrer initialement afin de synchroniser leurs cycles avant toute stimulation. Les lymphoblastes T ont été stimulés par IL-2 (100 UI/L) et par OKT3 (1 µg/ml). Les lymphoblastes B ont été stimulés par PMA (20 ng/ml).

Les *stimuli* choisis étaient ceux pour lesquelles la phosphorylation de S6K1 et de S6 était la plus importante selon les types cellulaires (Annexe 4C). La durée de stimulation choisie était la plus courte durée permettant d'observer une phosphorylation de S6K1 et de S6 selon les types cellulaires (Annexe 4C).

d. Traitement par inhibiteurs de mTOR

Les inhibiteurs de mTOR sont administrés aux cellules au moment du sevrage en acides aminés : rapamycine (50 nM) (Cell Signaling Technology, 9904) et Torin1 (5 µM) (Cell Signaling Technology, 14379). Ces molécules sont solubles dans du DMSO : un contrôle par l'ajout de DMSO seul était systématique associé.

VI. Biochimie

a. Extraction des protéines

Les cellules sont lavées dans du PBS froid par centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après retrait du surnageant, le culot cellulaire est repris dans 1 ml de PBS froid et transféré dans un tube stérile puis centrifugé à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après retrait délicat du surnageant, les cellules sont lysées dans un tampon de TNE-glycérol (20 ml de Tris pH 8, 40 ml de glycérol phosphate, 1,6 ml d'EDTA 0,5 M, 3,5 g de NaCl, 4 ml de NP40 ; compléter avec de l'eau distillée pour un volume final de 400 ml) additionné de 5% de fluorure de sodium, de cocktails d'inhibiteurs de phosphatases (Sigma-Aldrich, P5726 et 200-664-3) et d'inhibiteurs de protéases (Invitrogen, 87786) au 100X. Après 20 minutes à 1 heure d'incubation sur glace, les échantillons sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est transféré dans des tubes définitifs. Le tampon de lyse TNE/glycérol choisi était celui permettant une meilleure observation de l'expression de la protéine phosphorylée S6K1 en Western-Blot (Annexe 5).

b. Quantification des protéines

Les protéines sont quantifiées avec le kit Pierce™ BCA (Invitrogen, 23225). Une gamme d'étalonnage de référence est réalisée en diluant une solution stock de BSA à des concentrations fixes. Les échantillons protéiques sont dilués au tiers pour correspondre à l'intervalle optimal de concentrations détectées, puis déposés dans une plaque 96 puits. La solution de BCA est ajoutée. Après incubation pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière, elle est lue sur un spectrophotomètre.

c. Western-Blot

Les protéines sont réduites avec un agent dénaturant contenant du DTT (10X NuPAGE™, Invitrogen™) et chargées avec le tampon de charge (4X Protein Sample Loading Buffer, LI-COR Biosciences, Etats-Unis), dans un volume maximal de 25 µl (complété avec du tampon de lyse). Elles sont incubées pendant 10 minutes à 70°C dans un bloc chauffant.

Les échantillons sont déposés dans un mini-gel NuPAGE™ 10%, Bis-Tris, 1.0 mm (Invitrogen™). Les protéines sont séparées par poids moléculaire à 150V pendant 1 heure. Un marqueur de poids moléculaire est systématiquement ajouté (Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder, LI-COR Biosciences, Etats-Unis).

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec la technique iBlot™ 2 (Invitrogen) avec le programme P0 pré-enregistré.

La membrane est bloquée dans un tampon spécifique (Intercept® Blocking Buffer, LI-COR Biosciences, Etats-Unis) pendant au moins 1 heure sur agitateur à température ambiante.

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué au 1 : 1000 dans un tampon spécifique (Intercept® T20 Antibody Diluents, LI-COR Biosciences, Etats-Unis) sur agitateur à 4°C pendant la nuit, puis lavée 3 fois dans un tampon de TBS-Tween® 0,05% pendant 10 minutes sur agitateur à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anticorps souris anti-phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (1A5) (Cell Signaling Technology), anticorps lapin anti-p70 S6 Kinase (49D7) (Cell Signaling Technology, 2708), anticorps lapin anti-phospho-4EBP1 (Thr70) (Cell Signaling Technology, 9455) et anticorps souris anti-4EBP1 (554R16) (Cell Signaling Technology, AHO1382).

La membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué au 1 : 20 000 dans un tampon spécifique (Intercept® T20 Antibody Diluents, LI-COR Biosciences, Etats-Unis) pendant 1 heure sur agitateur à 4°C, puis lavée 3 fois dans un tampon de TBS-Tween® 0,05% pendant 10 minutes sur agitateur à température ambiante. Les anticorps secondaires utilisés sont : IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (H + L), IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (H + L), IRDye® 680RD Goat anti-Rabbit IgG (H + L), IRDye® 680RD Goat anti-Mouse IgG (H + L) (LI-COR Biosciences, Etats-Unis).

La révélation est réalisée avec le système d'imagerie Odyssey® CLx (LI-COR Biosciences, Etats-Unis). Cette technique détecte les signaux de fluorescence infrarouge qui sont directement proportionnels à la quantité de la protéine-cible, permettant une mesure précise et reproductible, sans saturation du signal. Les données sont analysées avec le logiciel d'acquisition et d'analyse Image Studio™ (LI-COR Biosciences, Etats-Unis).

Toutes les conditions techniques détaillées ici (révélation par fluorescence, tampon de blocage, durée d'incubation avec l'anticorps primaire, concentration d'anticorps secondaire) ont été choisies car elles permettaient la meilleure observation de l'expression de la protéine phosphorylée S6K1 en Western-Blot (Annexe 6).

VII. Statistiques

a. Analyse statistiques simples

Les analyses statistiques simples (somme, moyenne, médiane, proportions, minimum, maximum) ont été réalisées avec le logiciel Excel (Microsoft, Redmond, Etats-Unis).

b. Tests statistiques

Les analyses statistiques nécessitant des tests particuliers ont été réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad). Le test statistique utilisé pour comparer les données cliniques de deux groupes était le test de Student. Le test statistique utilisé pour comparer les données expérimentales de groupes deux à deux dans des analyses comportant plus de deux groupes était le test de Mann-Whitney.

RESULTATS

PARTIE 1 : DESCRIPTION CLINIQUE DE LA COHORTE D'ETUDE

I. Caractéristiques de la cohorte d'étude

a. Patients inclus

Vingt-deux patients ont été inclus, dont vingt filles et deux garçons, issus des quatre centres suivants : 17 patients (77%) du service d'Hépatologie et Transplantation Hépatique Pédiatrique de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre (Le Kremlin-Bicêtre, France), trois patients (14%) du Centre Hépatobiliaire de l'Hôpital Paul Brousse (Villejuif, France), un patient (5%) du service d'Hépatologie Pédiatrique de l'hôpital de Saint-Etienne (Saint-Etienne, France) et un patient (5%) du service d'allergie et d'immunologie pédiatrique de l'hôpital pédiatrique de Manchester (Manchester, Royaume-Uni).

b. Antécédents familiaux d'auto-immunité

Treize patients (59%) avaient une histoire familiale d'auto-immunité, pour un total de 21 apparentés malades. Ces antécédents incluaient les pathologies suivantes : thyroïdite (7 cas, 33%), hépatite (3 cas, 14%), psoriasis (3 cas, 14%), vitiligo (2 cas, 9%), lupus (1 cas, 5%), maladie cœliaque (1 cas, 5%), recto-colite hémorragique (1 cas, 5%), maladie de Crohn (1 cas, 5%), syndrome de Gougerot-Sjögren (1 cas, 5%), sclérose en plaques (1 cas, 5%).

c. Pathologies auto-immunes extra-hépatiques associées

Neuf patients (41%) présentaient au moins une pathologie auto-immune extra-hépatique associée. Quatre patients étaient atteints d'une autre pathologie, deux patients de deux autres pathologies, deux patients de trois autres pathologies et un patient était atteint de quatre pathologies supplémentaires.

Les 18 pathologies retrouvées se répartissaient ainsi : purpura thrombopénique immunologique (4 cas), anémie hémolytique auto-immune (3 cas), diabète (2 cas), maladie cœliaque (2 cas), syndrome de Gougerot-Sjögren (1 cas), gastrite (1 cas), alopecie (1 cas), sclérite (1 cas), thyroïdite (1 cas), psoriasis (1 cas), syndrome des anti-phospholipides (1 cas).

d. Présentation initiale au diagnostic

Les premiers symptômes révélateurs de l'HAH comprenaient : altération de l'état général (10 cas, 45%), ictère cutanéomuqueux (13 cas, 59%), prurit (5, 23%), angiomes stellaires (4 cas, 18%) et douleurs abdominales (3 cas, 14%). Cinq patients (23%) se présentèrent avec une insuffisance hépatocellulaire d'emblée, contre-indiquant la biopsie hépatique.

L'âge médian au diagnostic était de neuf ans (1-26).

Au moment du diagnostic, le premier examen clinique retrouvait une hépatomégalie chez sept patients (32%) et une splénomégalie chez quatre patients (18%).

Le dosage sanguin des transaminases était supérieur à dix fois la normale (40 UI/L) chez 13 patients (59%). Le dosage sanguin des GGT était supérieur à la normale (40 UI/L) chez 14 patients (64%). Le dosage sanguin de la bilirubine conjuguée était supérieur à 10 fois la normale (5 µmol/L) chez neuf patients (41%). Le temps de prothrombine était inférieur à 70% chez 12 patients (54%). Le facteur V était inférieur à 70% chez neuf patients (41%).

Le dosage des IgG plasmatiques était supérieur à deux fois la normale chez 12 patients (54%). Le phénotypage lymphocytaire réalisé en pratique courante n'a pas retrouvé d'anomalie significative chez les cinq patients pour lesquels les résultats étaient disponibles.

e. Auto-anticorps associés

Des auto-anticorps anti-nucléaires ont été retrouvés chez huit patients (36%), quatre parmi les 6 patients atteints d'HAI de type 1 (67%) et quatre parmi les 16 patients atteints d'HAI de type 2 (25%). L'immunofluorescence retrouvait un aspect moucheté chez trois patients et un aspect finement granuleux chez un patient. Des auto-anticorps anti-muscle lisse ont été retrouvés chez six patients (27%), dont une patiente avec HAI de type 2. Des auto-anticorps ciblant l'actine-F ont été retrouvés chez trois patients avec HAI de type 1. La présence concomitante d'auto-anticorps anti-nucléaires et anti-muscle lisse a été retrouvée chez trois patients avec HAI de type 1.

La classification des hépatites auto-immunes reposait sur la présence d'auto-anticorps anti-LKM-1 ou anti-LC-1. Parmi les 16 patients avec HAI de type 2, des auto-anticorps anti-LKM-1 ont été retrouvés chez 11 patients et des auto-anticorps anti-LC-1 chez cinq patients. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les patients selon le type d'HAI (Tableau 10).

D'autres auto-anticorps ont été retrouvés chez 14 patients (64%) : anticorps anti-transglutaminase (4 cas, 18%), anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires (3 cas, 14%), anticorps anti-ilots de Langerhans (3 cas, 14%), anticorps anti-cellules pariétales gastriques (3 cas, 14%), anticorps anti-plaquettes (2 cas, 9%), anticorps anti-thyroglobuline (2 cas, 9%), anticorps anti-gliadine (2 cas, 9%), anticorps anti-IA2 (2 cas, 9%), anticorps anti-GAD (2 cas, 9%), anticorps anti-ADN natif (1 cas, 5%), anticorps anti-SSA (1 cas, 5%), anticorps anti-insuline (1 cas, 5%), anticorps anti-réticuline (1 cas, 5%).

f. Histologie hépatique

Une hépatite d'interface a été retrouvée sur les biopsies hépatiques réalisées chez 17 patients (77%).

Les autres signes histologiques étaient : la présence de plasmocytes (11 cas), une cholangiolite (4 cas), des modifications biliaires (4 cas), une prolifération cholangiolaire (1 cas). Aucune ductopénie n'a été observée. Chez les cinq patients pour qui la biopsie n'a pu être réalisée, l'absence d'atteinte des voies biliaires a été attestée par la normalité de la cholangio-IRM.

g. Prise en charge thérapeutique

Le traitement de référence associant corticothérapie et azathioprine a pu être instauré dans les 15 premiers jours suivant le diagnostic pour 16 patients (73%). La molécule utilisée pour la corticothérapie était la prednisone pour 20 patients (91%) et la budésonide pour les deux patients restants (9%).

Treize patients (59%) ont présenté au moins une rechute. Parmi les HAI de type 1, une patiente a présenté deux rechutes et une autre patiente en a présenté trois. Parmi les HAI de type 2, quatre patients ont présenté un seul épisode de rechute, trois patients en ont présenté deux, un patient en a présenté trois, et trois patients en ont présenté plus de trois. Le délai médian entre le diagnostic et la première rechute était de sept ans (1-24). Le délai médian entre la première et la deuxième rechute était de trois ans (1-5).

Un traitement de deuxième ligne a été nécessaire chez cinq patients (23%). La ciclosporine A a été administrée à quatre patientes, pour les raisons suivantes : cortico-dépendance, intolérance glucidique sévère, rémission incomplète et forme sévère d'emblée. Deux patientes ont reçu du mycophénolate mofétil, pour les raisons suivantes : cytopénies sous azathioprine et cortico-dépendance. La patiente ayant reçu de la ciclosporine A pour intolérance glucidique sévère et du mycophénolate mofétil pour cortico-dépendance, a également reçu du tacrolimus.

h. Suivi et évolution

La durée médiane de suivi était de sept ans (1-27). L'âge médian au dernier suivi était de 20 ans (3-35).

Dix-neuf patients (86%) étaient toujours sous traitement au dernier suivi. Le traitement en cours comprenait l'association corticoïdes et azathioprine pour 13 patients, corticoïdes seuls pour deux patients, azathioprine seule pour trois patients, mycophénolate mofétil pour une patiente. Pour les quatre patients sevrés de corticoïdes, la durée médiane de traitement était de 15 ans (2-23). Pour les trois patients sevrés d'azathioprine, la durée médiane de traitement était de sept ans (3-24). Le traitement par ciclosporine A initié pour forme sévère d'emblée chez une patiente a pu être arrêté au bout de 11 mois.

Dix patients (45%) présentait une cirrhose hépatique au dernier suivi.

Deux patientes (9%) ont nécessité une transplantation hépatique, toutes deux pour décompensation cirrhotique. Une patiente a reçu un premier greffon après 11 ans d'évolution, puis un deuxième en super-urgence pour dysfonction primaire du greffon, permettant une évolution favorable. Une deuxième patiente a été inscrite sur la liste de transplantation en super-urgence après 21 ans d'évolution et est décédée d'une défaillance multiviscérale après la greffe.

Tableau 10. Comparaison entre les patients selon le type d'hépatite auto-immune

Caractéristiques	HAI de type 1	HAI de type 2
Sexe ratio (F/M)	6/0	14/2
Histoire familiale d'auto-immunité	4 (67%)	9 (56%)
Consanguinité	0	1
Age médian au diagnostic	12 (7-26)	6 (1-22)
Hépatomégalie au diagnostic	1 (17%)	6 (38%)
Splénomégalie	1 (17%)	3 (19%)
ALAT (UI/L)	780 (23-1542)	506 (49-1923)
GGT (UI/L)	85 (16-97)	55 (21-409)
Bilirubine conjuguée (µmol/L)	59 (4-147)	65 (7-195)
Temps de prothrombine (%)	43 (31-85)	52 (28-100)
Facteur V (%)	55 (37-83)	46 (30-110)
Gammaglobulines (g/L)	33 (7-63)	20 (13-26)
Au moins une pathologie auto-immune associée	2 (33%)	11 (69%)
Au moins une rechute	2 (33%)	11 (69%)
Durée de suivi (années)	5 (1-16)	13 (1-27)
Traitement en cours au dernier suivi	5 (83%)	15 (94%)
Cirrhose au dernier suivi	3 (50%)	7 (44%)

Les chiffres sont donnés en nombre de patients (%) ou en médiane (minimum-maximum) selon que les caractéristiques soient discrètes ou continues. ALAT : alanine aminotransférase ; HAI : hépatite auto-immune ; GGT : gamma-glutamyl transférase.

II. Description des patients porteurs de variants-candidats

L'analyse des données d'exome des 22 patients de la cohorte d'étude a mis en évidence la présence de variants-candidats chez huit patients (36%), désignés ci-après de A à H (Tableau 11). La recherche de particularités cliniques des patients porteurs de variants-candidats par rapport aux autres patients atteints d'HAI a retrouvé une surreprésentation des pathologies auto-immunes extra-hépatiques associées ($p = 0,0524$).

a. Patient A

Le patient A est issu de parents non apparentés, sans antécédents familiaux d'auto-immunité. Il a subi en période néonatale une intervention chirurgicale pour sténose du pylore. Depuis la petite enfance, il a présenté une cataracte avec opacité corticale, de nombreux épisodes d'infections pulmonaires hautes et une candidose buccale récidivante.

A l'âge de 12 ans, il a présenté des douleurs osseuses révélant des lésions ostéolytiques métaphysaires fémorales liées à une pancytopénie, conduisant à des explorations complémentaires. Le diagnostic d'HAI de type 2 a ainsi été porté fortuitement, devant une cytolyse hépatique, une hypergammaglobulinémie, une insuffisance hépatocellulaire et une hypoalbuminémie. L'examen clinique initial retrouvait une volumineuse splénomégalie. L'échographie hépatique montrait une hypertension portale sévère. La biopsie hépatique au diagnostic retrouvait un infiltrat lymphoplasmocytaire portal avec des lésions d'hépatite d'interface, associé à une stéatose très importante. La recherche d'anomalies immunitaires associées retrouvait un déficit en IgA, une gastrite auto-immune et une insuffisance surrénalienne.

Le traitement de référence a été instauré un mois après le diagnostic. Les paramètres cliniques et biologiques ont évolué favorablement permettant l'arrêt de la prednisone après deux ans et cinq mois.

Au dernier suivi, le patient A est en rémission clinique sous azathioprine seule.

b. Patient B

La patiente B est issue d'une grossesse gémellaire obtenue par fécondation *in vitro* de parents non apparentés. Sa mère présentait un psoriasis et son père une rectocolite hémorragique sous traitement.

Des symptômes évoquant une hépatopathie chronique (angiomes stellaires, altération de l'état général) ont débuté insidieusement vers l'âge de six ans. Le diagnostic d'HAI de type 1 a été confirmé devant la présence d'une cytolyse hépatique et d'auto-anticorps anti-muscle lisse. L'examen clinique initial retrouvait une volumineuse splénomégalie. L'échographie hépatique retrouvait une hypertension portale sévère. La biopsie hépatique au diagnostic retrouvait une hépatite d'interface avec un infiltrat lympho-plasmocytaire, une nécrose parcellaire sans atteinte des voies biliaires.

Le traitement de référence a été instauré dès le diagnostic avec une évolution favorable des paramètres cliniques et biologiques. La présence concomitante de cytopénies auto-immunes a conduit à remplacer l'azathioprine par du mycophénolate mofétil. La patiente B présentait par ailleurs une maladie cœliaque. La dernière tomodensitographie hépatique retrouvait un foie nodulaire.

Au dernier suivi, la patiente B est en rémission clinique sous corticoïdes et mycophénolate mofétil.

c. Patient C

La patiente C est issue de parents non apparentés sans histoire familiale d'auto-immunité. A l'âge de quatre mois, elle a présenté un ictère cutanéomuqueux progressif avec prurit et urines foncées.

Le diagnostic d'HAI de type 2 est porté à l'âge de 15 mois devant la présence d'une cytolyse hépatique, d'une insuffisance hépatocellulaire et d'auto-anticorps anti-LKM-1. L'examen clinique initial retrouvait une hépatomégalie ferme. La biopsie hépatique retrouvait des lésions d'hépatite d'interface avec un infiltrat lympho-plasmocytaire.

Le traitement de référence a été débuté dès le diagnostic avec une amélioration biologique initiale. Après trois semaines de traitement, l'apparition d'une intolérance glucidique sévère a motivé l'arrêt progressif de la corticothérapie et de l'azathioprine pour un relais par ciclosporine A.

Au cours du suivi, la patiente C a présenté un diabète auto-immun insulino-dépendant à l'âge de 3 ans, une alopecie auto-immune à l'âge de 4 ans, une sclérite auto-immune à l'âge de 7 ans, une anémie hémolytique auto-immune traitée par rituximab à l'âge de 8 ans. Dans un souci d'épargne cortisonique, elle a reçu du mycophénolate mofétil, et de façon transitoire, du tacrolimus. L'évolution est marquée par de nombreuses rechutes, la première quatre ans après le diagnostic. Les derniers examens hépatiques retrouvaient un stade cirrhotique (élastométrie élevée, aspect IRM et échographique compatible).

Au dernier suivi, la patiente C est en rémission sous traitement par prednisone, ciclosporine A et mycophénolate mofétil.

d. Patient D

La patiente D est issue de parents non apparentés sans histoire familiale d'auto-immunité.

Les premiers symptômes sont apparus à l'âge de 12 ans avec une altération de l'état général avec subictère conjonctival. Le diagnostic d'HAI de type 1 est posé devant la présence d'une cytolyse hépatique, d'une insuffisance hépato-cellulaire, d'auto-anticorps anti-muscle lisse avec spécificité anti-actine F et d'auto-anticorps anti-nucléaires d'aspect moucheté en immunofluorescence. Une cholangio-IRM est réalisée devant le risque hémorragique contre-indiquant la biopsie hépatique et ne retrouvait pas d'atteinte des voies biliaires.

Le traitement de référence a été débuté au diagnostic avec une bonne réponse.

Au dernier suivi, la patiente D est en rémission sous traitement par azathioprine et par budésonide en cours de décroissance.

e. Patient E

Le patient E est issu de parents cousins germains. Sa mère présentait une maladie cœliaque. Le patient E présentait également une maladie cœliaque diagnostiquée à l'âge de sept mois.

Les premiers symptômes évoquant l'HAI sont survenus à l'âge de 13 ans par une altération de l'état général, des douleurs abdominales et une pâleur. Le diagnostic d'HAI de type 2 est porté devant la présence d'une cytolyse hépatique et d'auto-anticorps anti-LC-1. L'examen clinique initial retrouvait une hépatomégalie et deux angiomes stellaires. La biopsie hépatique retrouvait un infiltrat lympho-plasmocytaire avec des lésions d'hépatite d'interface, sans atteinte des voies biliaires.

Le traitement de référence a été instauré dès le diagnostic avec une évolution favorable des paramètres cliniques et biologiques. Le traitement par azathioprine est arrêté après deux ans et neuf mois. Trois ans après le diagnostic, une rechute conduit à la reprise de l'azathioprine.

Au dernier suivi, le patient E est en rémission sous traitement par prednisone et azathioprine.

f. Patient F

La patiente F est issue de parents non apparentés. Sa mère présentait une thyroïdite auto-immune.

Les premiers symptômes sont survenus à l'âge de 13 ans par une altération de l'état général, des douleurs abdominales et un prurit. Le diagnostic d'HAI de type 2 est porté devant la présence de troubles de l'hémostase, d'une hypertension portale et d'auto-anticorps anti-LC-1. L'examen initial ne retrouvait ni hépatomégalie ni splénomégalie. La biopsie hépatique au diagnostic retrouvait une cirrhose auto-immune avec des lésions d'hépatite d'interface.

Le traitement de référence a été instauré un mois après le diagnostic avec une réponse clinique et biologique favorisant l'arrêt des traitements après cinq ans d'évolution.

Une première rechute est survenue sept ans après le diagnostic, conduisant à reprendre le traitement par prednisone et azathioprine. Le premier accouchement de la patiente E a entraîné une deuxième rechute d'évolution favorable sous traitement.

A l'âge de 34 ans, elle a présenté une encéphalopathie hépatique sur infection du liquide d'ascite post-opératoire évoluant vers une insuffisance hépato-cellulaire. Malgré une transplantation hépatique en urgence, la patiente F est décédée d'une défaillance multi-viscérale.

g. Patient G

La patiente G est issue de parents non apparentés, sans antécédents familiaux d'auto-immunité.

Les premiers symptômes sont apparus à l'âge de 13 ans par des douleurs abdominales, un subictère conjonctival et une altération de l'état général. Le diagnostic d'HAI de type 2 est porté devant la présence d'une cytolyse hépatique, de troubles de la coagulation, d'une hypergammaglobulinémie et d'auto-anticorps anti-LC-1. L'examen clinique initial ne retrouvait pas d'hépatomégalie ni de splénomégalie. La biopsie hépatique au diagnostic retrouvait une cirrhose auto-immune avec des lésions actives d'hépatite d'interface, un infiltrat lymphocytaire très dense, sans atteinte des voies biliaires.

Le traitement de référence a été débuté deux semaines après le diagnostic avec une évolution favorable des paramètres cliniques et biologiques. L'azathioprine est arrêté par la patiente un mois après le début du traitement.

L'évolution est marquée par de multiples rechutes liées à une mauvaise observance thérapeutique. A l'âge de 31 ans, une nouvelle tentative de traitement par azathioprine est débutée dans un souci d'épargne cortisonique, permettant la décroissance de la prednisone.

Au dernier suivi, la patiente G est en rémission sous traitement par prednisone et azathioprine.

h. Patient H

La patiente H est issue de parents non apparentés sans antécédents familiaux d'auto-immunité. A 15 ans, elle développe une thyroïdite auto-immune. Depuis l'âge de 21 ans, elle est traitée par hydroxychloroquine pour un syndrome de Gougerot-Sjögren. A partir de l'âge de 24 ans, les examens de suivi retrouvaient une hypergammaglobulinémie persistante.

Les premiers symptômes sont survenus à l'âge de 27 ans par un ictère cutanéomuqueux révélant une cytolyse hépatique avec insuffisance hépato-cellulaire. Le diagnostic d'HAI de type 1 est porté devant la présence d'auto-anticorps anti-ADN natifs. L'examen clinique initial ne retrouvait ni hépatomégalie ni splénomégalie. La recherche d'anomalies immunitaires associées a retrouvé une thyroïdite auto-immune. La biopsie hépatique au diagnostic montrait des lésions d'hépatite d'interface avec un infiltrat lympho-plasmocytaire sans atteinte des voies biliaires.

Le traitement de référence a été introduit dans la semaine suivant le diagnostic avec évolution favorable des paramètres cliniques et biologiques favorables permettant une décroissance progressive de la prednisone.

Au dernier suivi, la patiente H est en rémission sous traitement par prednisone et azathioprine.

Tableau 11. Description détaillée des patients porteurs de variants-candidats

Patients	A	B	C	D	E	F	G	H
Variants-candidats	<i>RRAGC</i>	<i>PRKAG1</i>	<i>LAMTOR1</i>	<i>LAMTOR3</i>	<i>mTOR</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TSC2</i>	<i>TSC2</i>
Sexe	Masculin	Féminin	Féminin	Féminin	Masculin	Féminin	Féminin	Féminin
Consanguinité	-	-	-	-	+	-	-	-
AI familiale	-	+	-	-	+	+	-	-
Age aux 1^{ers} symptômes	12	6.5	0.3	12	13	13	12.5	15
Age au diagnostic	12	15	1.5	12	13	13	12.5	26
Alat, UI/L (N<40)	156	23	280	780	254	49	473	768
Bilirubine, μmol/L (N<5)	32	4	155	36	9	7	104	113
TP, % (N>70)	32	ND	56	52	100	42	38	31
GGT, UI/L (N<40)	20	16	200	97	28	21	409	76
Facteur V, % (N >80)	39	ND	64	71	ND	34	ND	37
IgG^f, g/L	25	5	18	33	13	14	26	63
Anti-LKM-1	1/640	-	1/640	-	-	-	-	-
Anti-LC-1	-	-	-	-	1/640	1/100	1/640	-
Anti-muscle lisse	-	1/640	-	1/640	-	-	-	-
Anti-nucléaires	-	-	-	1/1280	-	-	-	1/1280

Patients	A	B	C	D	E	F	G	H
Score IAIHG								
Avant traitement	16	16	24	19*	20	14	19	20
Après traitement	18	18	27	21*	23	17	22	22
Score simplifié	7	6	8	6*	7	8	8	7
Score d'ESPGHAN	8	8	11	8*	9	8	8	8
Score METAVIR	A2F2	A2F2	A3F3	ND	A2F2	A2F4	A3F4	A3F2
Pathologies associées	AI PTI, NAI, AHAI, gastrite AI	PTI, NAI, maladie cœliaque	DID, AIHA, sclérite, alopecie	-	Maladie cœliaque	-	-	Gougerot-Sjögren, thyroïdite
Autres anticorps	auto- Anti-estomac, anti-GAD, anti-IA2	-	Anti-GAD, anti-IA2, anti-cellules de Langerhans, anti-insuline	-	Anti-réticuline, anti-gliadine, anti-transglutaminase	-	-	Anti-ADN natif
Durée de suivi	5.7	4.6	22	1	3.4	21.8	20.3	1
Rechute	-	-	+	-	+	+	+	-
2^e ligne	-	+	+	-	-	-	-	-
Statut au dernier suivi	Rémission	Cirrhose	Cirrhose	Rémission	Rémission	Décédée	Cirrhose	Rémission
Age au dernier suivi	17	17	23	13	16	34	33	27

Les âges et durées sont données en années. *Les scores ont été calculés pour la patiente D même en l'absence de résultats histologiques. Score IAIHG (*International autoimmune hepatitis group*) : avant traitement, un score > 15 définit une HAI certaine et 10-15 une HAI probable ; après traitement, un score > 17 définit une HAI certaine et 12-17 une HAI probable. Score simplifié : un score ≥ 7 définit une HAI certaine et ≥ 6 une HAI probable. Score ESPGHAN (*European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*) : un score ≥ 8 définit une HAI certaine et ≥ 7 une HAI probable. IgG : immunoglobulines G, ^Lvaleurs normales : 6.1-13 à la naissance, 4.6-8.6 à 1 mois, 2.9-5.5 à 3 mois, 2.3-4.4 à 6 mois, 3.3-6.2 à 1 an, 4.8-8.9 à 3 ans, 5.5-11.5 entre 5 et 9 ans, 6.5-12.3 à 15 ans et 6.6-12.8 chez l'adulte. AI : auto-immune ; AHAI : anémie hémolytique auto-immune ; Alat : alanine aminotransférase ; GAD : glutamate acide décarboxylase ; GGT : gammaglutamyl transférase ; HAI : hépatite auto-immune ; IA2 : anti-tyrosine phosphatase ; LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator* ; LC-1 : *liver cytosol 1* ; LKM-1 : *liver kidney microsome 1* ; mTOR : *mechanistic target of rapamycin* ; mTORC1 : mTOR complexe 1 ; ND : non disponible ; PIK3R1 : *phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1* ; PRKAG1 : *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1* ; PTI : purpura thrombopénique immunologique ; RRAGC : *Ras-related GTP-binding protein C* ; TSC2 : *tuberous sclerosis complex 2*.

PARTIE 2 : VARIANTS-CANDIDATS DE LA VOIE mTORC1

Les analyses supervisées effectuées sur les données d'exome des 22 patients de la cohorte d'étude n'ont pas retrouvé de variant-candidat pertinent. Une analyse non supervisée a permis de mettre en évidence neuf variants dans sept gènes impliqués dans la voie mTORC1 chez huit patients (Tableau 12). La présence de chaque variant a été vérifié par le séquençage de type Sanger chez les patients (Figure 12) et chez leurs apparentés quand le matériel génétique était disponible (Figure 13). La position de chaque variant est représentée dans la Figure 14.

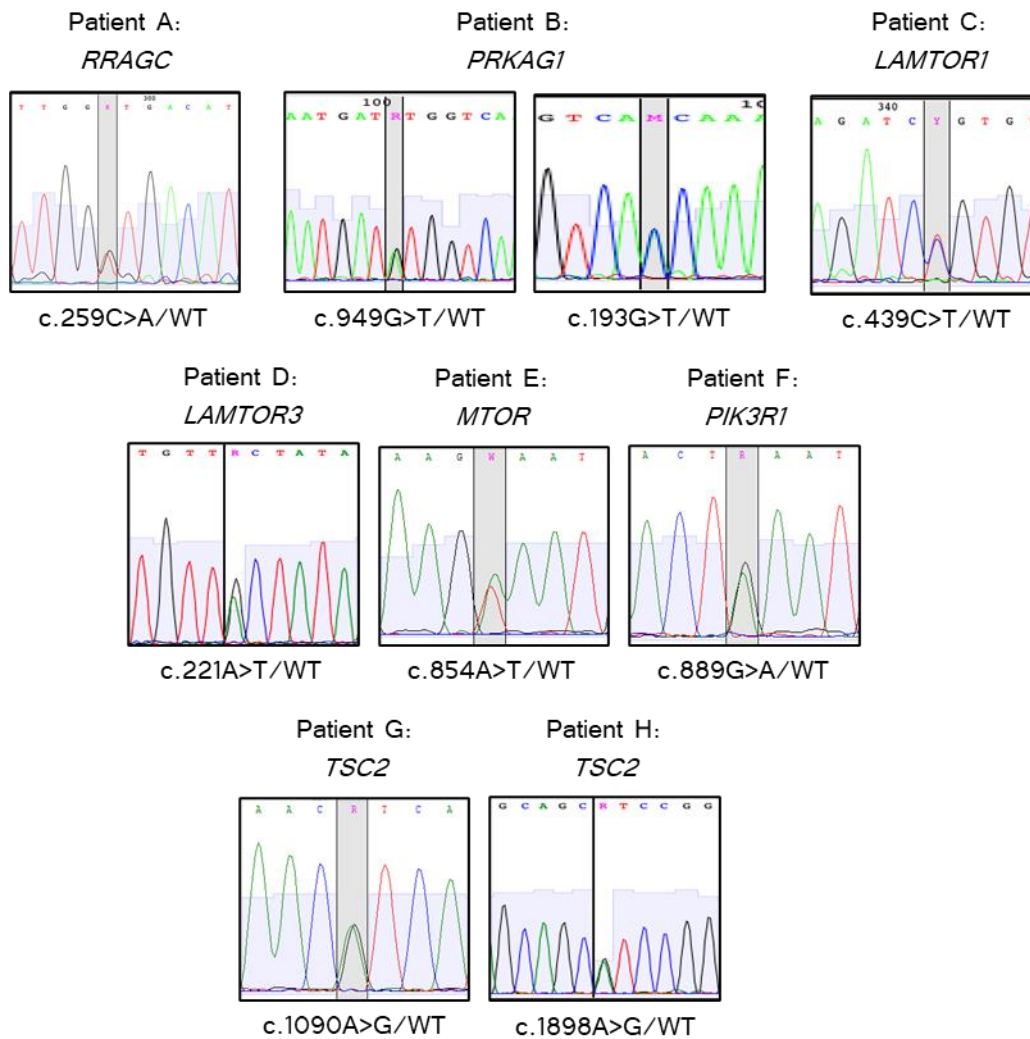
Les descriptions suivantes analysent les conséquences des variants-candidats sur la protéine codée et la voie de signalisation sous-jacente à l'aide des outils de modélisation génétique et protéique en ligne et à l'aide des ressources bibliographiques disponibles.

Tableau 12. Analyse *in silico* des variants-candidats

Patients	A	B	B	C	D	E	F	G	H
Gène	RRAGC	PRKAG1 (allèle 1)	PRKAG1 (allèle 2)	LAMTOR1	LAMTOR3	mTOR	PIK3R1	TSC2	TSC2
Protéine	RagC	AMPK γ 1	AMPK γ 1	LAMTOR1	LAMTOR3	mTOR	p85 α	TSC2	TSC2
Localisation cytogénétique	1p34.3	12q13.12	12q13.12	11q13.4	4q23	1p36.22	5q13.1	16p13.3	16p13.3
Variant transcrit	c.259C>A	c.193G>T	c.949G>A	c.439C>T	c.221A>G	c.854A>T	c.889G>A	c.1090A>G	c.1828A>G
Variant protéique	p.Pro87Thr	p.Val65Leu	p.Val317Met	p.Arg147Cys	p.Tyr74Cys	p.Glu285Val	p.Glu297Lys	p.Ile364Val	p.Ile610Val
Score CADD	27.4	24.5	22.8	34	30	25.4	23.2	24.9	24
Score Polyphen-2	0.998	0.003	0.7	0.627	0.811	0.95	0.003	0.911	0.911
Score Sift	0	0.03	0.21	0	0.04	0.17	0.52	0.05	0.1
gnomAD	NR	1.42e-5	NR	8.03e-6	NR	NR	9.34e-5	NR	NR

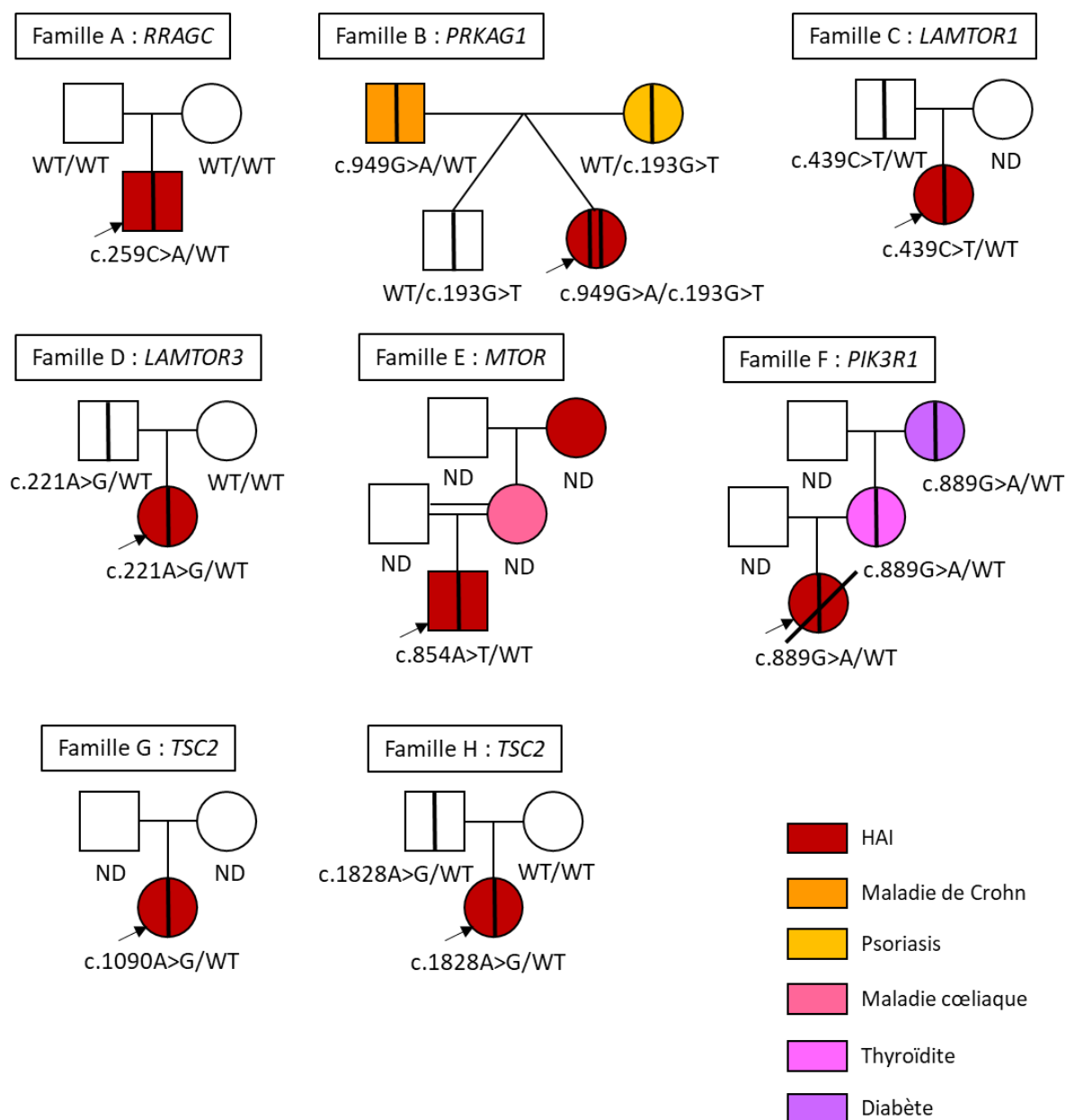
AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : AMP-dépendante protéine kinase ; CADD : *combined annotation dependent depletion* ; gnomAD : *Genome Aggregation Database* ; LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator* ; MAPK : *mitogen-activated protein kinases* ; mTOR : *mechanistic target of rapamycin* ; mTORC1 : mTOR complexe 1 ; NR : non rapporté précédemment dans la littérature ; PIK3R1 : *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1* ; PRKAG1 : *protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1* ; Sift : *sorting intolerant from tolerant* ; RRAGC : *Ras-related GTP binding C* ; TSC2 : *tuberous sclerosis complex 2*. Les scores prédictifs, la nomenclature et les conséquences prédites sont données pour chaque transcrit canonique. Le génome humain de référence utilisé est GRCh38p.13

Figure 12. Validation de la présence des variants-candidats par la méthode de séquençage de type Sanger



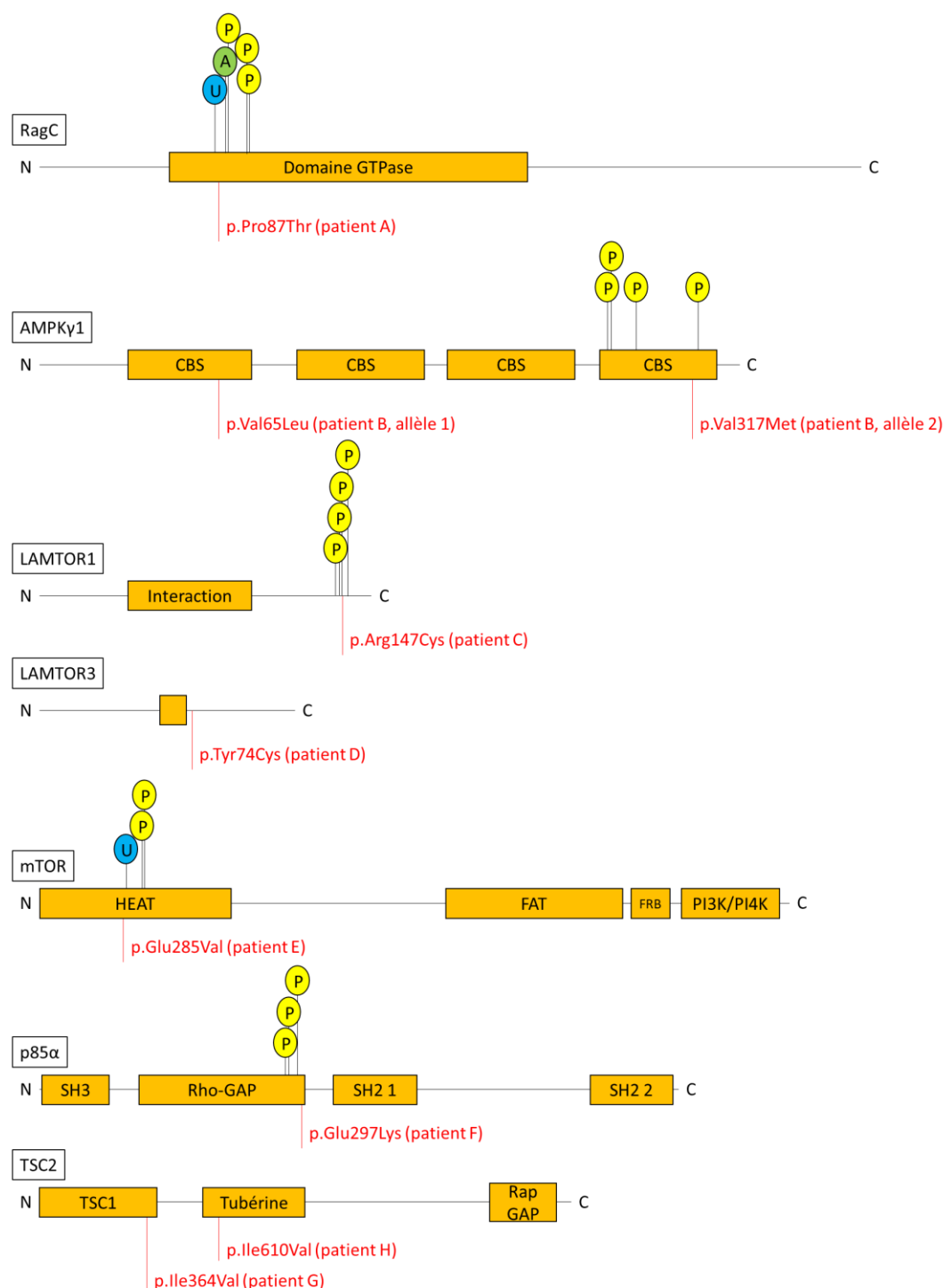
Electrophorogrammes après séquençage de type Sanger sur ADN génomique extrait de cellules mononucléées circulantes sanguines des patients. WT : *wild type*.

Figure 13. Ségrégation familiale des variants-candidats



Les barres verticales représentent la présence du variant-candidat. La flèche noire désigne le propositus. La double barre marque la consanguinité. La barre noire diagonale indique le décès de l'individu. HAI : hépatite auto-immune ; ND : non disponible ; WT : *wild type*.

Figure 14. Position des variants-candidats sur chaque protéine



La nomenclature est donnée pour les transcrits canoniques de chaque gène. A : site d'acétylation ; CBS : cystathionine-β-synthase ; FAT : domaine d'interaction avec FRAP, ATM et TRAPP ; GAP : GTPase activating protein ; HEAT : *Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR* ; P : site de phosphorylation ; FRB : FKBP12-rapamycin binding ; LAMTOR : late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator ; mTOR : mammalian or mechanistic target of rapamycin ; PI3K/PI4K : domaine d'interaction avec PI3K/PI4K ; SH : *Src homology* ; TSC : *tuberous sclerosis complex* ; U : site d'ubiquitination.

I. Patient A : *RRAGC*

Le variant c.259C>A retrouvé dans le gène *Ras-related GTP-binding protein C (RRAGC)* conduit à la substitution protéique d'une thréonine par une proline en position 87 dans la protéine RagC (UniProt: Q6HB90, PDB: 6ULG, OMIM: 608267).

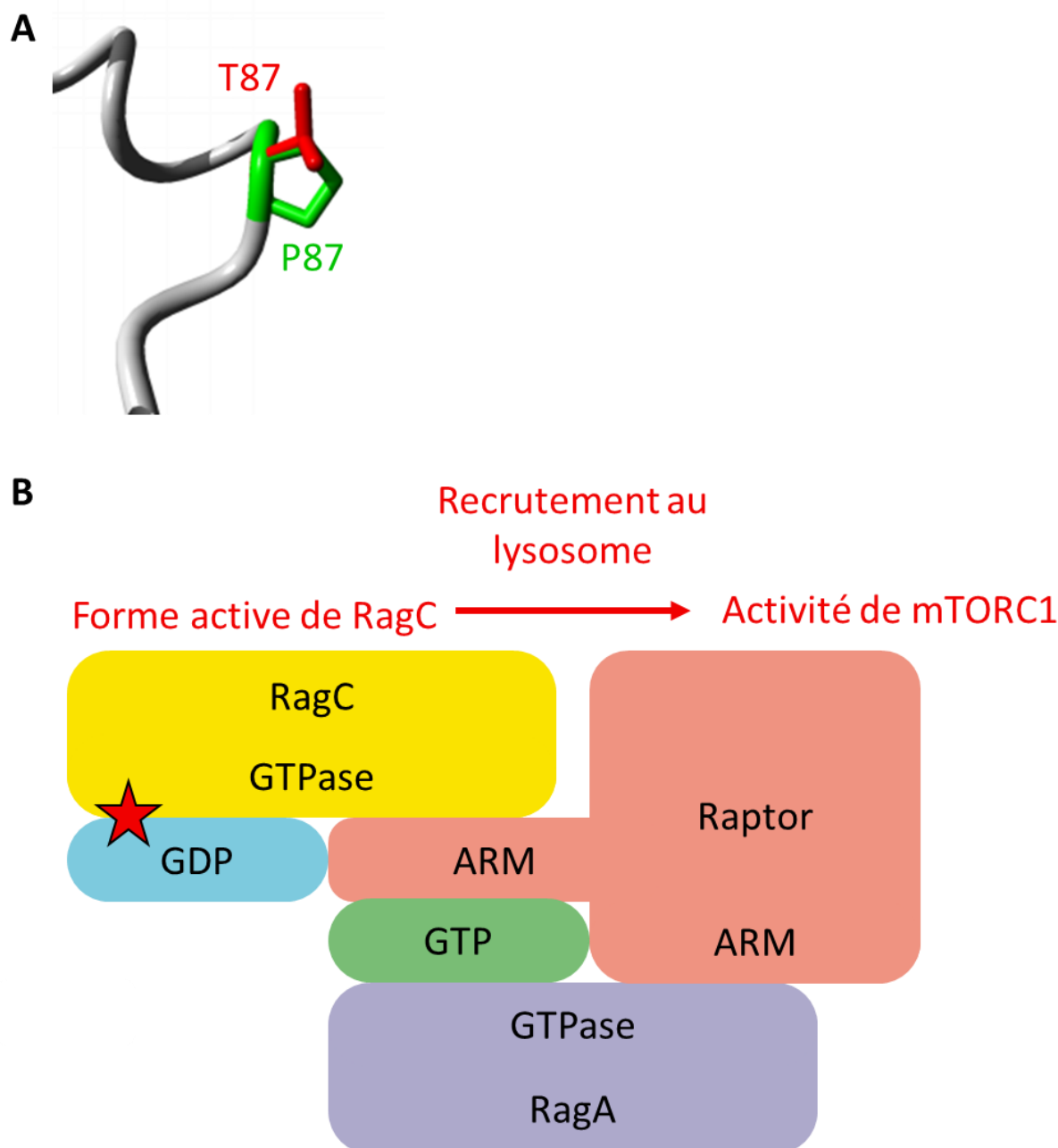
Ce variant est apparu *de novo* chez le patient A (Figure 13). Le résidu muté est situé dans le domaine GTPase, juste après un site de phosphorylation sur une sérine en position 86 (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat affectant *RRAGC* est illustrée dans la Figure 15.

La proline a une structure rigide en coude, contrairement à la thréonine. A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec la proline ou avec la thréonine (Figure 15A).

Long *et al* ont décrit une mutation p.Ser75Tyr qui entraîne une dissociation des interactions avec le ligand et augmentait le statut lié à GDP, forme active de RagC (Long, 2016). De la même manière, la substitution p.Pro87Thr pourrait accroître le statut actif de RagC, favorisant sa liaison à Raptor et le recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale promouvant son activation, quel que soit l'apport cellulaire en acides aminés (Figure 15B).

Figure 15. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de l'activateur RagC^{P87T}



A. Représentation spatiale de l'acide aminé sauvage (proline, en vert) et de l'acide aminé muté (thrénine, rouge). La substitution d'une proline, très stable, par une thrénine, est susceptible de déstabiliser la conformation protéique. B. Représentation schématique de la liaison entre Raptor et RagA/RagC. Le résidu muté est représenté par l'étoile rouge. Gênant l'échange de charge de GDP à GTP, la mutation favoriserait le statut actif chargé de GDP de RagC et ainsi sa liaison à Raptor par sa région ARM, recrutant d'autant mTORC1 au lysosome, conduisant à son activation. ARM : α -solénoïde/armadillo ; Raptor : *regulatory protein associated with mTOR*.

II. Patient B : *PRKAG1*

Deux variants ont été identifiés dans le gène *Protein Kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1 (PRKAG1)* chez la patiente B (Figure 12).

L'étude de la ségrégation familiale a montré une transmission autosomique biallélique, l'un des variant étant porté par la mère et l'autre étant porté par le père, tous deux atteints de pathologie auto-immune (Figure 13).

Le variant c.193C>T, porté par la mère et le frère de la patiente B, conduit à la substitution protéique d'une valine par une leucine en position 65 dans le premier domaine CBS (CBS-1) de la protéine AMPK γ 1 (UniProt: P54619, PDB: 5ISO, OMIM: 602742), sous-unité régulatrice d'AMPK (Figure 14).

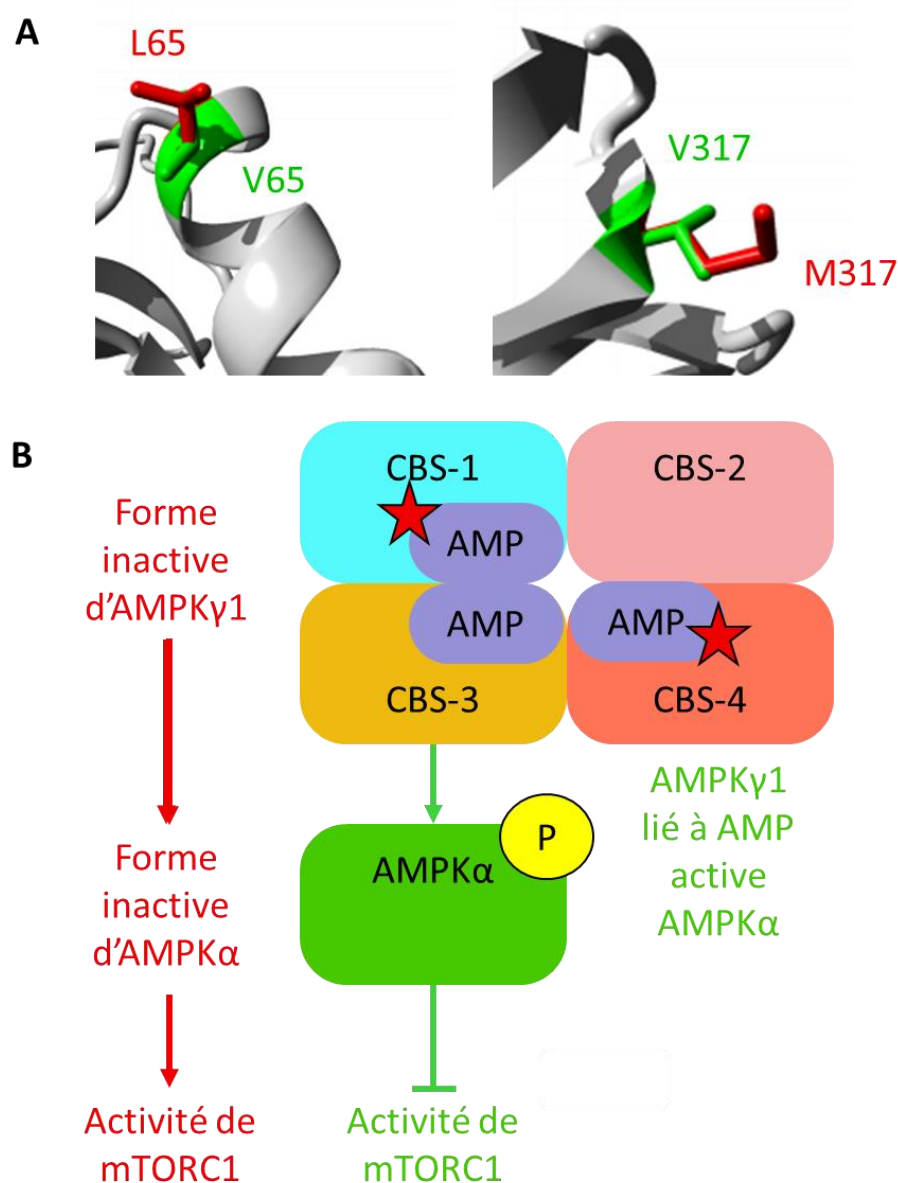
Le variant c.949G>A, porté par le père de la patiente B, conduit à la substitution protéique d'une valine par une méthionine en position 317 dans une région de liaison à l'AMP du dernier domaine CBS (CBS-4) de la protéine AMPK γ 1 (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat affectant *PRKAG1* est illustrée dans la Figure 16.

La leucine et la méthionine sont de taille plus importante que la valine, pouvant créer une convexité perturbant la conformation de la protéine au sein de ses domaines d'activité. A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec la valine, la leucine ou avec la méthionine (Figure 16A).

Certaines mutations dans CBS-4 sont connues pour abolir la liaison à l'AMP, conduisant à une perte de fonction d'AMPK γ 1, régulant négativement AMPK (Yan, 2018). De la même manière, les variants p.Val65Leu et p.Val317Met pourraient, par leur taille, altérer la liaison à l'AMP dans les deux domaines CBS-1 et CBS-4, inhibant l'activation d'AMPK en situation de stress cellulaire, conduisant à une activation inadaptée de mTORC1 en conditions de sevrage (Figure 16B).

Figure 16. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur AMPK γ 1^{V65L/V317M}



A. Représentation spatiale des acides aminés sauvages (valine, en vert) et des acides aminés mutés (leucine à gauche et méthionine à droite, rouge). La substitution de la valine, petit acide aminé, par une leucine et une méthionine, présentant des structures plus grandes pourrait gêner les interactions. B. Représentation schématique des interactions entre AMPK γ 1 avec ses 4 régions CBS avec AMPK α . Les résidus mutés sont représentés par les étoiles rouges. En conditions normales, la liaison de l'AMP aux régions CBS 1, 3 et 4 permet à la région CBS 3 de stabiliser la phosphorylation d'AMPK α , activant le complexe AMPK qui inhibe l'activité de mTORC1. Les résidus mutés sont situés au sein des sites de liaison à l'AMP des régions CBS 1 et 4 et pourraient empêcher cette liaison, maintenant AMPK γ 1 dans une forme inactive, permettant la déphosphorylation d'AMPK α , retenant l'activité d'AMPK et favorisant l'activité de mTORC1. AMPK : AMP-dépendante protéine kinase ; CBS : cystathionine β -synthase ; mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin*.

III. Patients C et D : *LAMTOR1* et *LAMTOR3*

Le variant c.439C>T dans le gène *Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator (LAMTOR) 1* retrouvé chez la patiente C conduit à la substitution d'une arginine en cystéine en position 147 dans la protéine LAMTOR1 (UniProt: Q6IAA8, PDB: 6EHR, OMIM: 613510) (Figure 12). Le variant c.221A>G dans le gène *LAMTOR3* retrouvé chez la patiente D conduit à la substitution d'une tyrosine en cystéine en position 74 dans la protéine LAMTOR3 (UniProt: Q9UH44, PDB: 6B9X, OMIM: 603296) (Figure 12).

Ces variants sont retrouvés également, pour chacune, chez leurs pères asymptomatiques (Figure 13).

L'arginine en position 147 de LAMTOR1 se situe dans une zone de phosphorylation. Elle forme d'une part des liaisons hydrogènes avec la sérine en position 144 (site de phosphorylation) et la glutamine en position 145 ; et d'autre part, des ponts disulfures avec l'acide aspartique en position 149, dans une région particulièrement conservée et essentielle dans l'activation de mTORC1 par la voie des Rag GTPases (Figure 14).

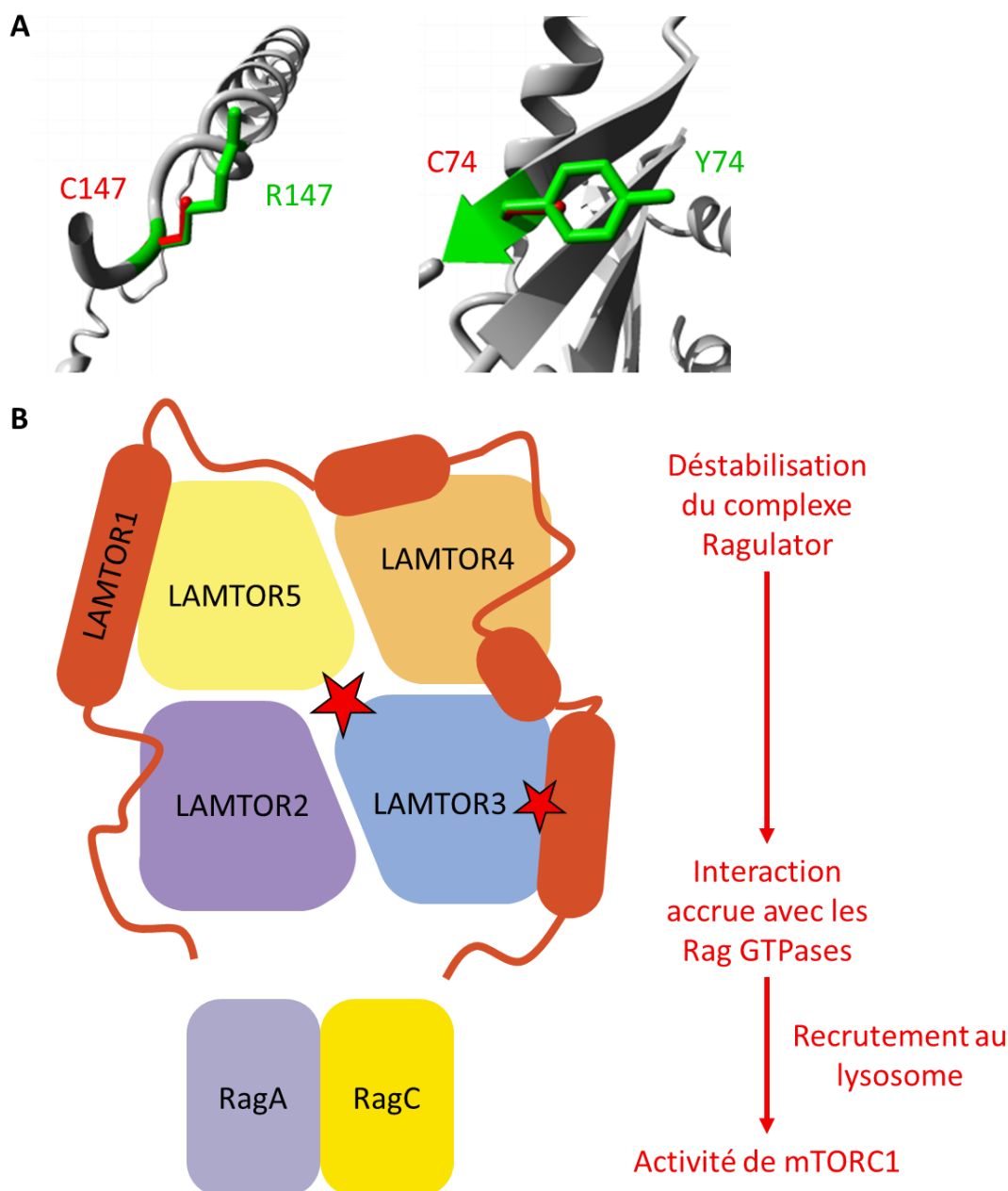
La tyrosine en position 74 de LAMTOR3 est enfouie au cœur de la protéine et est impliquée dans un contact multimérique avec LAMTOR2, LAMTOR5 et la voie des Rag GTPases (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour les variants-candidat affectant *LAMTOR1* et *LAMTOR3* est illustrée dans la Figure 17.

La cystéine est plus petite que l'arginine et que la tyrosine, plus hydrophobe et ne porte pas de charge électrique. Elle peut créer un espace vide, perturbant le repliement des protéines, et rompre les liaisons hydrogènes avec d'autres résidus. A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec l'arginine, la tyrosine ou avec la cystéine (Figure 17A).

Il est possible que les substitutions p.Arg147Cys de LAMTOR1 et p.Tyr74Cys de LAMTOR3 déstabilisent le complexe Ragulator et favorisent les interactions avec les Rag GTPases, promouvant une activité inadaptée de mTORC1 (Figure 17B).

Figure 17. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de l'activateur Ragulator par LAMTOR1^{R147C} et LAMTOR3^{Y74C}



A. Représentation spatiale des acides aminés sauvages (arginine et tyrosine, en vert) et des acides aminés mutés (cystéine, rouge) dans LAMTOR1 (à gauche) et LAMTOR3 (à droite). La cystéine est plus petite que l'arginine et que la tyrosine et n'a pas leurs propriétés hydrophiles et électriques. Cette substitution est susceptible de supprimer toute interaction entre ces acides aminés et leurs partenaires habituels. B. Les résidus sauvages en position 147 et 74 sont impliqués dans des interactions stabilisatrices du complexe Ragulator. C. Représentation schématique du complexe Ragulator et de RagA/RagC. Les résidus mutés sont représentés par des étoiles rouges. La déstabilisation de la structure de Ragulator pourrait augmenter son interaction avec RagA/C, favorisant le recrutement au lysosome de mTORC1 et son activité subséquente. LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator*.

IV. Patient E : *MTOR*

Le variant c.854A>T dans le gène *MTOR* retrouvé chez le patient E conduit à la substitution d'un acide glutamique en position 285 par une valine dans la protéine mTOR (UniProt: P42345, OMIM: 60734, 616638) (Figure 12).

En l'absence de matériel génétique disponible pour la famille de ce patient, il a été impossible de déterminer la transmission de ce variant (Figure 13).

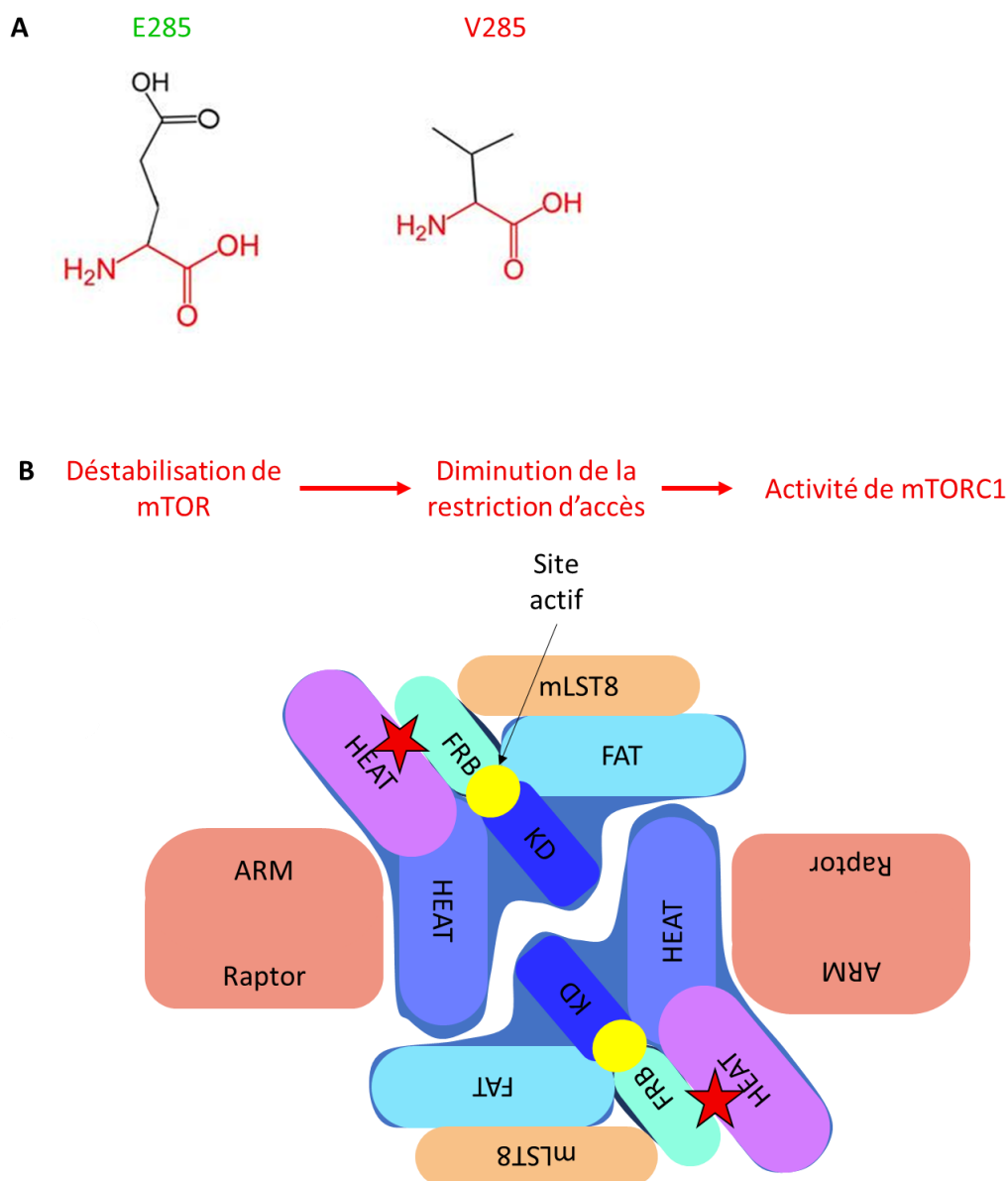
Le résidu en position 285 est situé dans une région HEAT (répétée dans la protéine mTOR), indispensables au maintien de la structure de l'homodimère de mTOR au sein du complexe mTORC1 (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat affectant *mTOR* est illustrée dans la Figure 18.

La valine est plus petite que l'acide glutamique, plus hydrophobe et ne porte pas de charge électrique, ce qui pourrait supprimer des interactions ioniques ou des liaisons hydrogènes avec d'autres molécules ou d'autres résidus, ou perturber le repliement de mTOR. A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec l'acide glutamique ou avec la valine (Figure 18A).

La déstabilisation de la conformation de la protéine mTOR pourrait générer une perte de rigidité du complexe mTORC1, favorisant l'accès au site actif du domaine kinase de mTOR, promouvant la phosphorylation des substrats environnementaux (Figure 18B).

Figure 18. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de la kinase mTOR^{E285V}



A. Représentation de l'acide aminé sauvage (acide glutamique, en vert) et de l'acide aminé muté (valine, rouge). Compte tenu de la taille de la protéine mTOR, aucune représentation spatiale pour le changement ponctuel d'acide aminé n'était disponible. La substitution d'un acide glutamique par une valine plus petite et aux propriétés différentes pourrait abolir des interactions et est susceptible de déstabiliser la conformation protéique. B. Représentation schématique du complexe mTORC1. Le résidu muté est représenté par l'étoile rouge. La valine pourrait déstabiliser la structure de la région HEAT, réduisant ainsi la restriction d'accès au site actif du domaine kinase de mTOR, favorisant l'accès aux substrats et l'activité de mTORC1. ARM : α -solénoïde/armadillo ; FAT : domaine d'interaction avec FRAP, ATM et TRAPP ; FRB : *FKBP12-rapamycin binding* ; HEAT : *Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR* ; KD : kinase domain ; mLst8 : *mammalian lethal with Sec13 protein 8* ; mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; Raptor : *regulatory protein associated with mTOR*.

V. Patient F : *PIK3R1*

Le variant c.889G>A dans le gène *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1 (PIK3R1)* retrouvé chez la patiente F conduit à la substitution d'un acide glutamique en position 297 par une lysine dans la protéine p85 α ((UniProt: P27986, PDB: 1PBW, OMIM: 615214, 616005, 269880) (Figure 12).

L'étude de la ségrégation familiale a montré une transmission autosomique dominante par la mère et la grand-mère maternelle, toutes deux atteintes de pathologies auto-immunes (Figure 13).

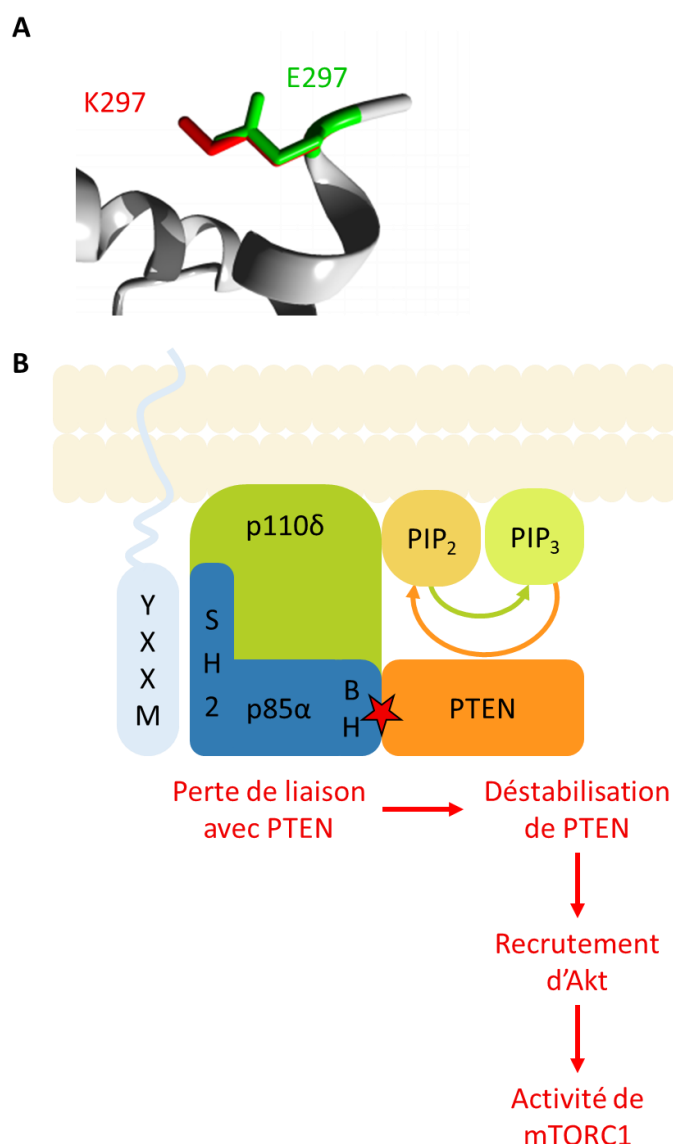
Le résidu en position 297 est situé dans le domaine Rho-GAP (aussi appelé BH) à la surface de p85 α (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat affectant *PIK3R1* est illustrée dans la Figure 19.

L'acide glutamique en position 297 forme un pont disulfure avec la lysine en position 224 de p85 α et l'arginine en position 189 de PTEN (Marshall, 2018). La substitution p.Glu297Lys modifie les propriétés électriques (charge positive versus négative) et la taille du résidu (plus importante), ce qui pourrait modifier les interactions avec d'autres molécules ou d'autres régions de p85 α . A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec l'acide glutamique ou avec la valine (Figure 19A).

La sous-unité p85 α stabilise et stimule PTEN, cette phosphatase lipidique qui rétablit la forme PIP₂ à partir de PIP₃, empêchant le recrutement d'Akt et l'activation de mTORC1. Il est possible que p.Glu297Lys de p85 α perturbe cette interaction, conduisant à une perte de fonction de l'inhibiteur PTEN sur la voie PI3K-Akt-mTORC1 (Figure 19B).

Figure 19. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur p85α^{E297K}



A. Représentation spatiale de l'acide aminé sauvage (acide glutamique, en vert) et de l'acide aminé muté (lysine, rouge). La lysine porte une charge positive, contrairement à l'acide glutamique, et sa taille est un peu plus grande. Ces modifications sont susceptibles de déstabiliser la conformation protéique. B. Représentation schématique de PI3Kδ et de ses partenaires. Le résidu muté est représenté par l'étoile rouge. PI3Kδ est recruté à la membrane cytoplasmique par sa sous-unité régulatrice p85α dont les domaines SH2 reconnaissent les motifs YXXM des récepteurs associés aux tyrosine kinase lorsqu'ils sont activés. Ce recrutement permet à la sous-unité catalytique p110δ d'accéder à son substrat PIP₂ et de le phosphoryler en PIP₃, activant Akt et ainsi mTORC1. La sous-unité p85α stabilise la phosphatase lipidique PTEN, qui convertit PIP₃ en PIP₂, bloquant le recrutement d'Akt. La substitution de l'acide glutamique par une lysine pourrait perturber cette stabilisation et empêcher PTEN de convertir PIP₃ en PIP₂, favorisant l'activation de la voie Akt-mTORC1. mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; PI3K : *Phosphoinositide 3-kinase* ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; PTEN : *Phosphatase and tensin homologue* ; SH : *Src homology*.

VI. Patients G et H : *TSC2*

Deux patientes portaient des variants dans le même gène *Tuberous Sclerosis Complex (TSC) 2*.

Le variant c.1090A>G, retrouvé chez la patiente G, conduit à la substitution d'une isoleucine par une valine en position 364 dans la protéine TSC2 (UniProt: P49815, OMIM: 607341, 606690, 613254). Le variant c.1828A>G, retrouvé chez la patiente H, conduit à la substitution d'une isoleucine par une valine en position 610 (Figure 12).

En l'absence de matériel génétique disponible, il a été impossible de déterminer la transmission de p.Iso364Val. Le variant p.Iso610Val est retrouvé chez le père asymptomatique de la patiente H (Figure 13).

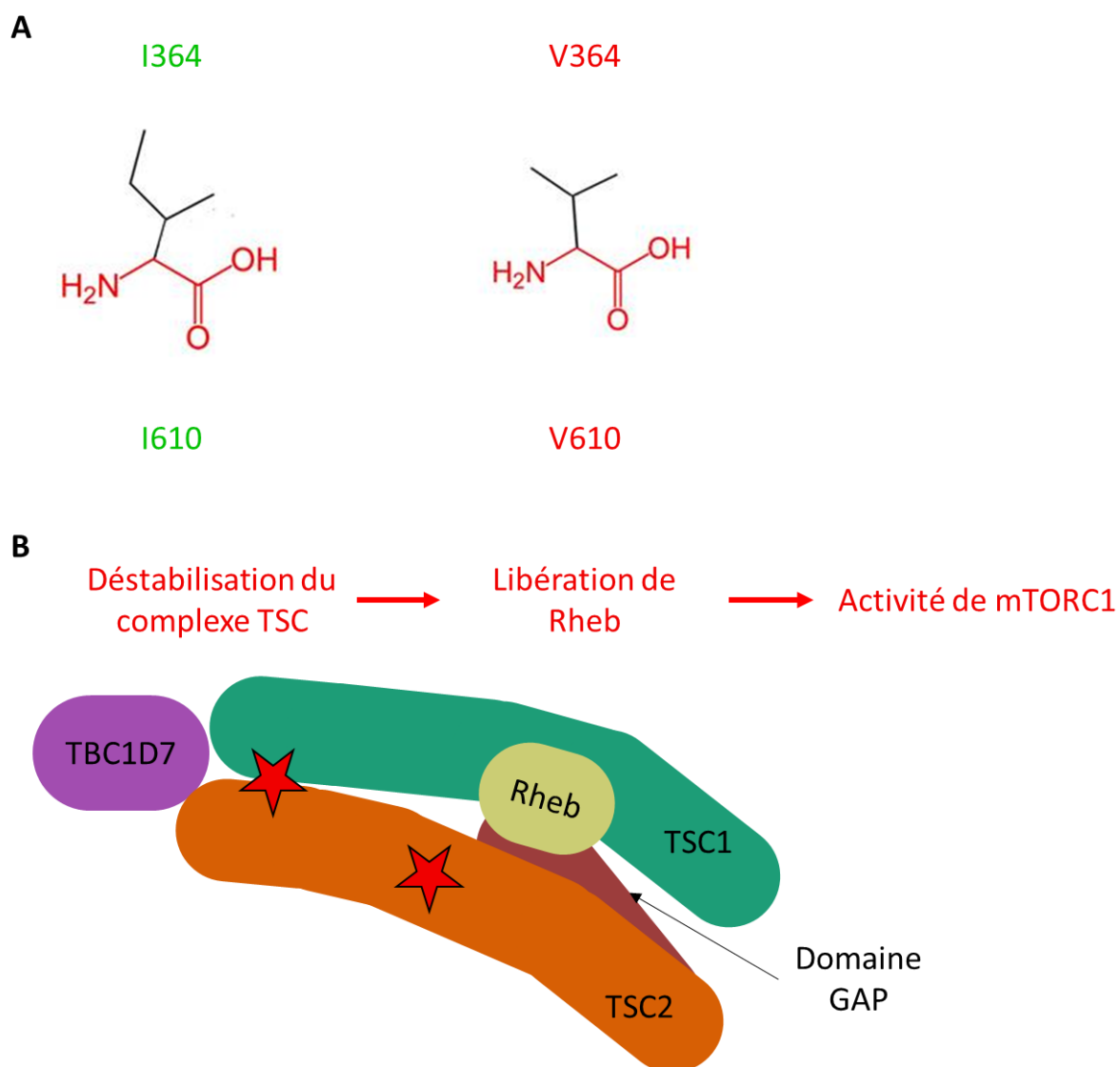
Le résidu en position 364 est situé dans le domaine d'interaction avec TSC1. Ce résidu est conservé à 100% à cette position : un changement d'acides aminés pourrait être dommageable. La région N-terminale interagissant avec TSC1 est stabilisée par des interactions hydrophobes entre chaque hélice. Le résidu en position 610 est situé dans le domaine tubérine de TSC2, qui maintient la structure de la protéine et donc du complexe TSC entier (Figure 14).

L'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat affectant *TSC2* est illustrée dans la Figure 20.

La valine est plus petite que l'isoleucine, ce qui pourrait supprimer des interactions dans chacun des domaines de TSC2, déstabiliser sa structure et dissocier le complexe TSC. A l'aide de HOPE, il a été possible de modéliser les deux structures secondaires avec l'isoleucine ou avec la valine (Figure 20A).

La dissociation du complexe TSC causée par les variants conduiraient à une perte de fonction de l'inhibiteur, échouant à retenir Rheb, favorisant une activité inadaptée de mTORC1 (Figure 20B).

Figure 20. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V}



A. Représentation de l'acide aminé sauvage (isoleucine, en vert) et de l'acide aminé muté (valine, rouge). Compte tenu de la taille de la protéine mTOR, aucune représentation spatiale pour le changement ponctuel d'acide aminé n'était disponible. La substitution d'une isoleucine par une valine, plus petite, pourrait abolir des interactions et est susceptible de déstabiliser la conformation protéique. B. Représentation schématique du complexe TSC avec Rheb. Les résidus mutés sont représentés par les étoiles rouges. L'activité GAP de TSC2 vis-à-vis de Rheb nécessite une stabilité parfaite du complexe TSC et la moindre substitution est susceptible de le déstabiliser et ainsi de libérer Rheb, alors disponible à l'activation de mTORC1. GAP : GTPase *activating protein* ; mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; Rheb : *Ras homolog enriched in brain* ; TSC : *tuberous sclerosis complex*.

PARTIE 3 : PROFIL IMMUNITAIRE DES PATIENTS PORTEURS DE VARIANTS-CANDIDATS

I. Immunophénotypage lymphocytaire

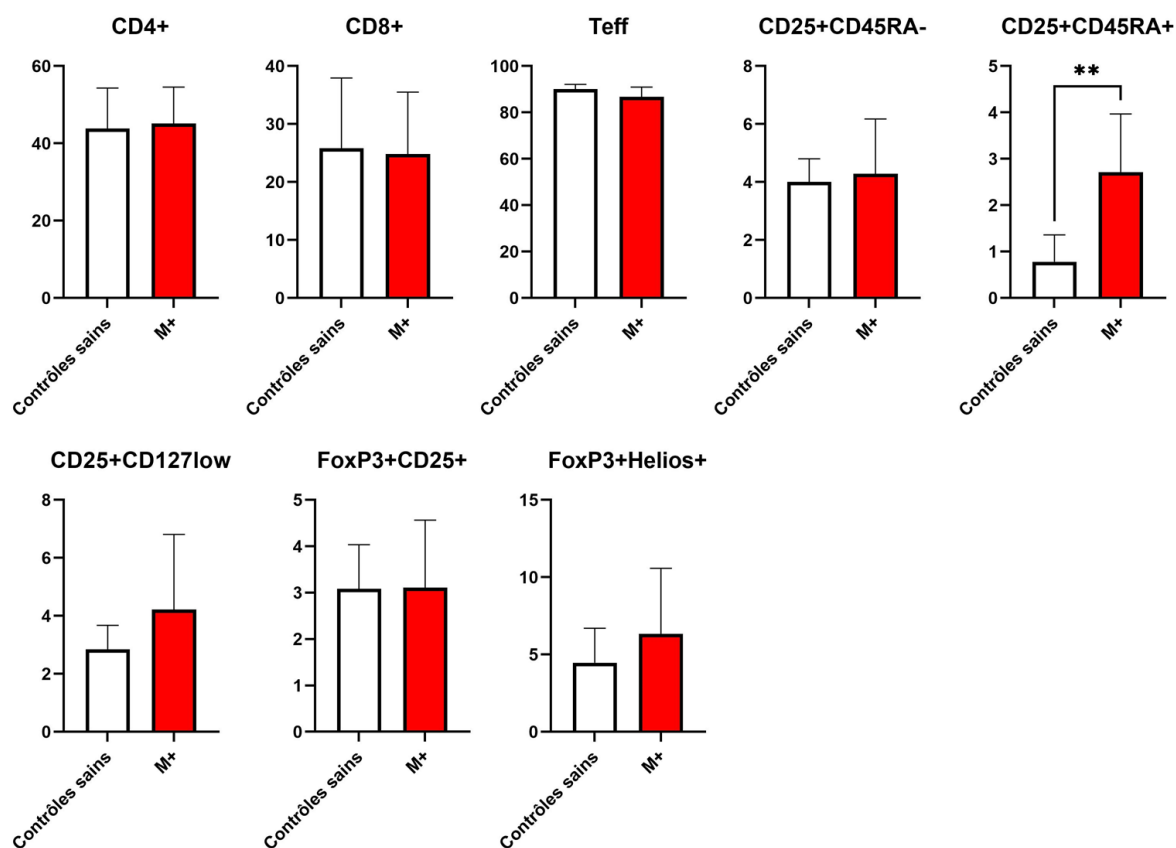
L'immunophénotypage portant sur les lymphocytes T et sur les lymphocytes T régulateurs présents dans les cellules mononucléées circulantes sanguines cherchait à mettre en évidence des différences significatives entre les patients porteurs de variants-candidats et les individus sains. Les cellules mononucléées circulantes sanguines étaient disponibles pour cinq patients porteurs des variants-candidats : RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}, LAMTOR3^{Y74C}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V}. Les prélèvements ont tous été réalisés au dernier suivi des patients, en rémission sous traitement par corticothérapie, azathioprine ou mycophénolate mofétil, aux âges de 17 ans, 13 ans, 33 ans et 27 ans. Les cellules mononucléées circulantes sanguines de cinq individus sains âgés de 23 à 65 ans ont été utilisées en tant que contrôle négatif.

a. Quantification des lymphocytes T

Les nombres de lymphocytes T des patients et des individus sains sont représentés sur la Figure 21. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux groupes, que ce soit pour les lymphocytes T effecteurs (CD4⁺, CD8⁺) ou pour les lymphocytes T régulateurs (CD25⁺CD127^{low}, FoxP3⁺CD25⁺, FoxP3⁺Helios⁺).

On observe une augmentation significative de la proportion de lymphocytes T naïfs (CD25⁺CD45RA⁺) chez les patients porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains ($p = 0,002$) (Figure 21).

Figure 21. Proportion des différentes populations de lymphocytes T

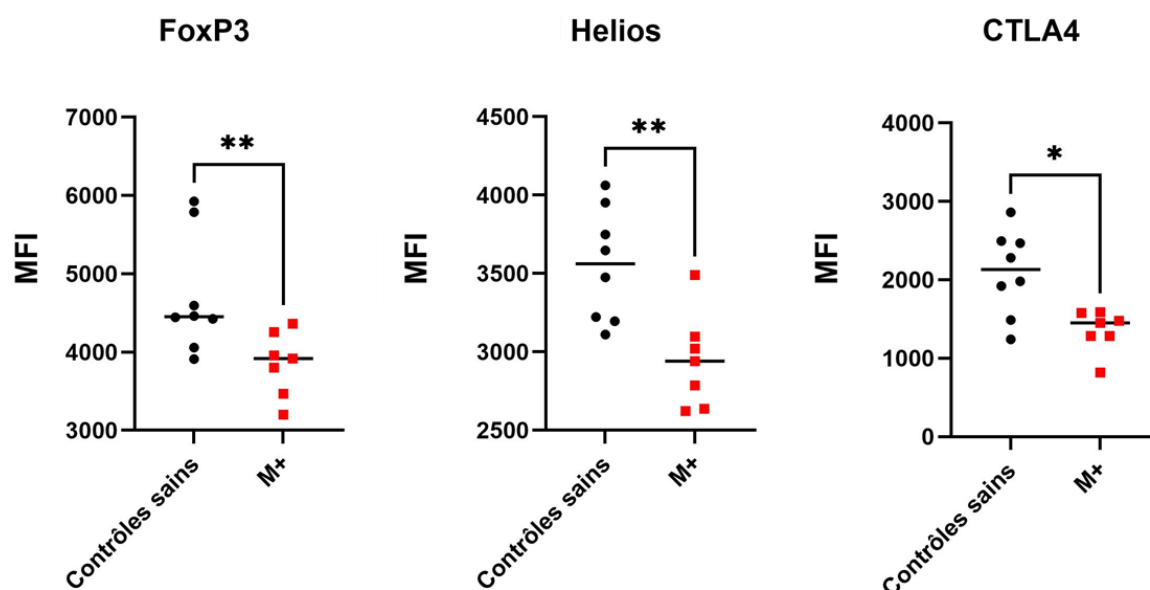


Quantification en pourcentage des différentes sous-populations de lymphocytes T selon la détection de marqueurs membranaires et intracellulaires par cytométrie en flux à partir de cellules mononucléées circulantes sanguines non stimulées, immédiatement après décongélation, d'un groupe d'individus sains et d'un groupe de patients porteurs de variants-candidats. Les * indiquent une différence significative. FoxP3 : *forkhead box P3* ; M+ : données des patients porteurs de variants-candidats ; Teff : lymphocytes T effecteurs.

b. Marqueurs intra-cellulaires associés à la fonction des lymphocytes T régulateurs

En l'absence de différence significative dans les quantités des populations lymphocytaires, l'expression de marqueurs intra-cellulaires associés à la fonction des lymphocytes T régulateurs a été réalisée sur les mêmes prélèvements. La Figure 22 illustre les différences détectées entre les deux groupes. Dans la population de lymphocytes T régulateurs $CD4^+CD127^{low}FoxP3^+CD25^+$, on observe une diminution significative de la médiane d'intensité de fluorescence de FoxP3 ($p = 0,0093$), d'Helios ($p = 0,0037$) et de CTLA-4 ($p = 0,0193$) chez les patients porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains.

Figure 22. Marqueurs intra-cellulaires associés à la fonction des T régulateurs



Comparaison des médianes d'intensité de fluorescence des marqueurs intracellulaires (FoxP3, Helios et CTLA4) détectées par cytométrie en flux dans les lymphocytes T régulateurs définis comme FoxP3⁺CD25⁺ à partir de cellules mononucléées circulantes sanguines non stimulées, immédiatement après décongélation, d'un groupe d'individus sains et d'un groupe de patients porteurs de variants-candidats. Les * indiquent une différence significative. FoxP3 : *forkhead box P3* ; M+ : données des patients porteurs de variants-candidats ; MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

II. Cytokines plasmatiques

Le dosage simultané de 13 cytokines essentielles à la réponse immunitaire a été réalisé dans l'objectif de mettre en évidence des différences concernant la réaction immunitaire globale, reflétant les interactions pro ou anti-inflammatoire entre les différents acteurs de l'immunité innée et adaptative. Les échantillons plasmatiques étaient disponibles pour six patients porteurs des variants-candidats : RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}, LAMTOR1^{R147C}, LAMTOR3^{Y74C}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V}. Leurs résultats ont été comparés à ceux de huit patients atteints d'HAI sans variants-candidats identifiés et à ceux de treize individus sains. Le groupe de patients sans variants-candidats identifiés était en rémission sous traitement, de façon à être comparable au groupe de patients porteurs de variants-candidats. Les groupes ont été appariés selon le sexe et l'âge.

La Figure 23 illustre les différences retrouvées ou non entre les groupes.

Une augmentation significative a été observée dans le groupe de patients porteurs de variants-candidats par rapport au groupe d'individus sains pour : IL-4 ($p = 0,047$), IL-6 ($p = 0,02$), IL-12p70 ($p = 0,003$), IL-17A ($p = 0,03$), IFN- γ ($p = 0,02$) et TNF- α ($p = 0,019$) (Figure 6A).

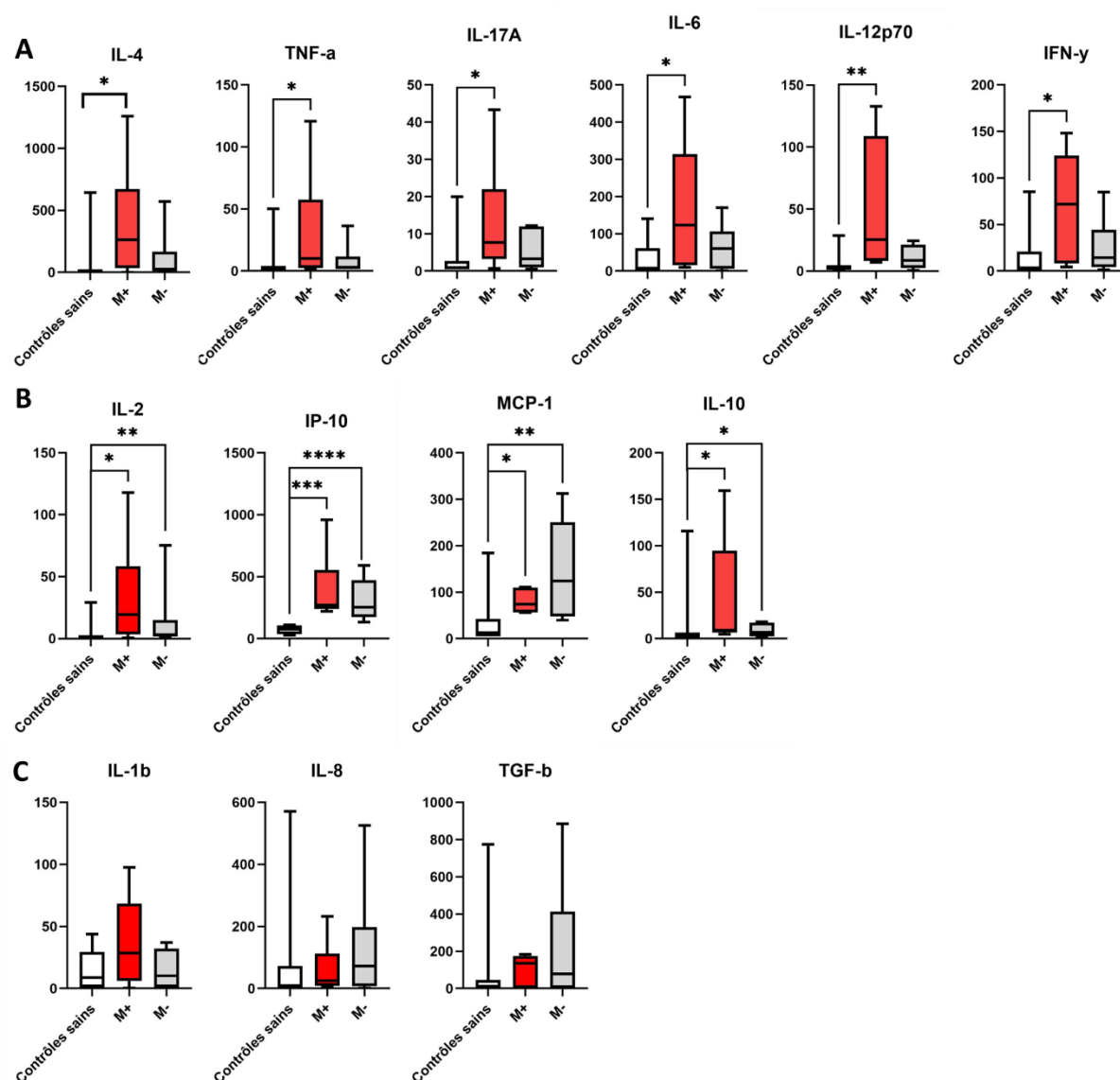
Une augmentation significative a été observée dans les deux groupes de patients (porteurs ou non de variants-candidats) par rapport au groupe d'individus sains pour : IL-2, IL-10, CXCL-10 et MCP-1 (Figure 6B).

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les trois groupes pour : TGF- β 1, IL-1 β et IL-8 (Figure 6C).

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les deux groupes de patients, porteurs ou non de variants-candidats.

Ces résultats démontrent que le profil cytokinique plasmatique pro-inflammatoire prédomine chez les patients atteints d'HAI en général et porteurs de variants-candidats en particulier.

Figure 23. Dosage plasmatique des cytokines

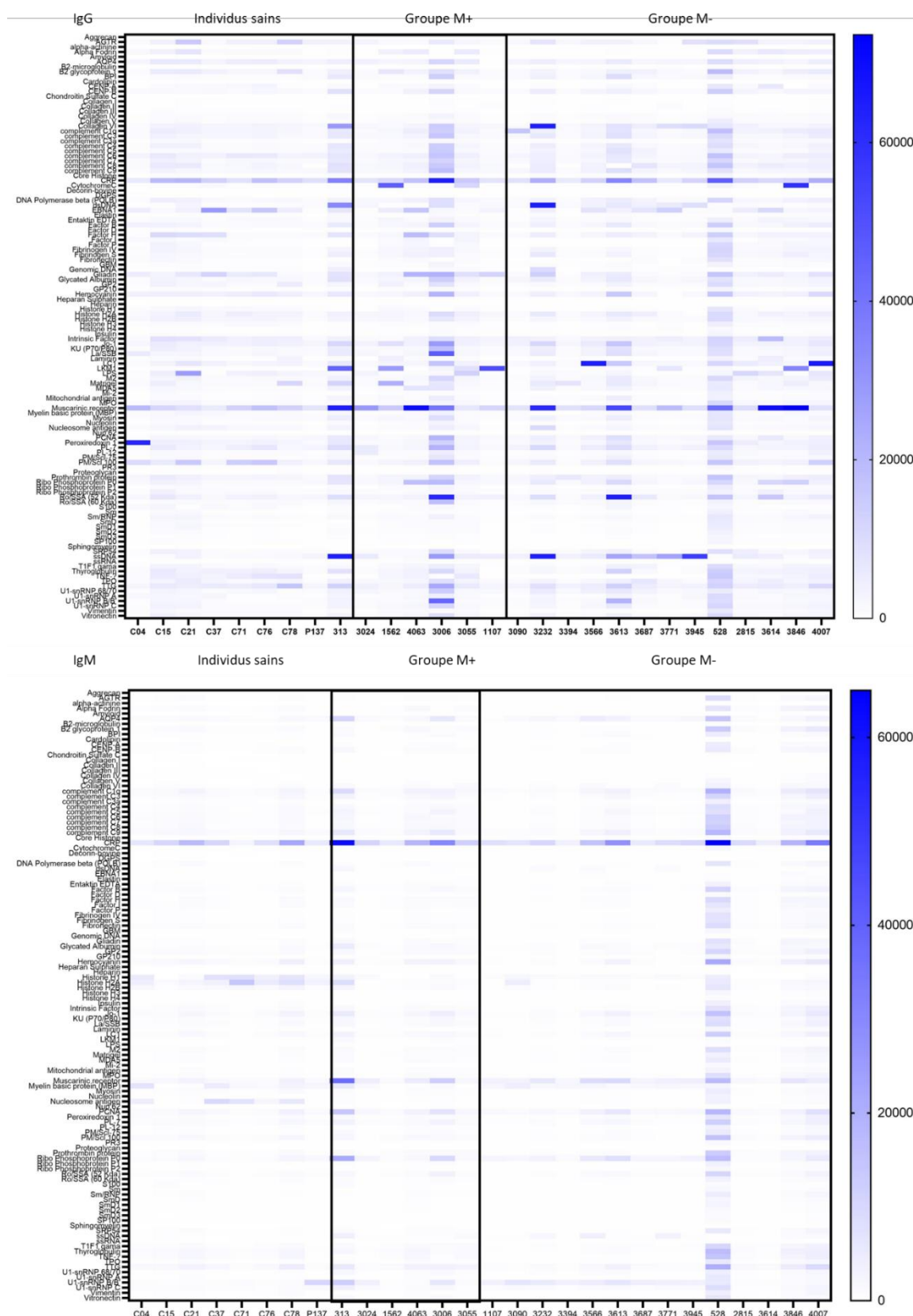


Comparaison des dosages de 13 cytokines réalisés par cytométrie en flux à partir d'échantillons plasmatiques issus d'individus sains, de patients porteurs de variants-candidats et de patients non porteurs de variants-candidats. Les * indiquent une différence significative. A : Cytokines pour lesquelles une différence significative a été mise en évidence entre les patients porteurs de variants-candidats et les individus sains. B : Cytokines pour lesquelles une différence significative a été mise en évidence entre les patients (porteurs ou non de variants-candidats) et les individus sains. C : Cytokines pour lesquelles aucune différence significative n'a été mise en évidence. IFN : interféron ; IL : interleukine ; M+ : patients porteurs de variants-candidats ; M- : patients non porteurs de variants-candidats ; MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1* ; TGF : *transforming growth factor*, facteur de croissance transformant- β ; TNF : *tumor necrosis factor*.

III. Auto-antigènes plasmatiques

Le dosage plasmatique simultané de 128 auto-antigènes a été réalisé dans l'objectif de rechercher des biomarqueurs différenciant les différents groupes d'individus. Les mêmes échantillons plasmatiques ont été utilisés pour le dosage des cytokines.

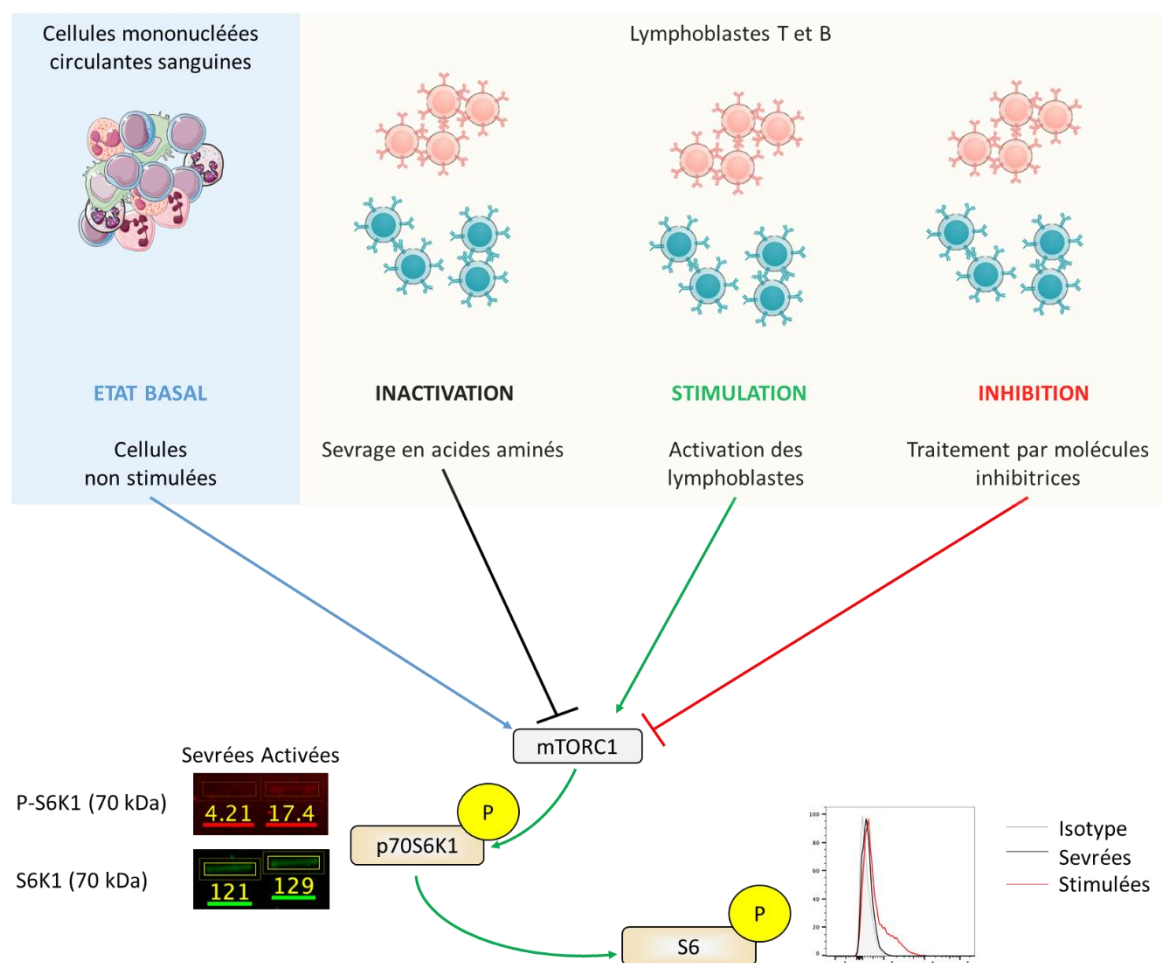
Les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de différence significative entre les individus sains, les patients porteurs de variants-candidats et les patients non porteurs de variants-candidats (Figure 24).



PARTIE 4 : ACTIVITE DE mTORC1 DANS LES CELLULES IMMUNITAIRES

L'analyse de l'état d'activation de la voie mTORC1 est basée sur la phosphorylation ou non de S6 (détectée par cytométrie en flux) et sur la phosphorylation ou non de S6K1 (détectée en Western-Blot). Différentes conditions ont été utilisées afin d'étudier l'activité basale (cellules non stimulées), l'inactivation (sevrage en acides aminés), la stimulation (activation des cellules) et l'inhibition (traitement par molécules inhibitrices) de la voie mTORC1. Celle-ci étant ubiquitaire, centrale au sein du métabolisme cellulaire, finement régulée et aux potentielles fonctions variables, son activité a été étudiée dans différents types cellulaires : les cellules mononucléées circulantes sanguines, les lymphoblastes T et B. La Figure 25 illustre les moyens utilisés pour l'analyse de l'activation de la voie mTORC1 dans les cellules immunitaires.

Figure 25. Techniques, conditions et types cellulaires utilisés pour l'étude de l'activité de mTORC1



Les cellules mononucléées circulantes sanguines sont étudiées à l'état basal en l'absence de stimulation. L'activité de mTORC1 est reflétée par la phosphorylation de p70-S6K1, cible canonique du complexe, qui phosphoryle ensuite la protéine ribosomale S6. La présence de la protéine phosphorylée ou non p70-S6K1 est étudiée par Western Blot (technique Li-Cor, voir Méthodes). La présence de la protéine phosphorylée S6 est étudiée par cytométrie en flux (histogramme représentant la médiane d'intensité de fluorescence de phospho-S6rp en conditions de sevrage et de stimulation). Les lymphoblastes T et B sont utilisés pour tester différentes conditions : l'inactivation de la voie mTORC1 par le sevrage en acides aminés ; la stimulation par l'activation des lymphoblastes et l'inhibition par traitement pharmacologique par molécules inhibitrices. mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; S6 : protéine ribosomale S6 ; S6K1 : S6 kinase 1.

I. Hyperactivité de mTORC1 dans les cellules circulantes des patients porteurs de variants

L'état d'activation de la voie mTORC1 à l'état basal a été analysé dans les cellules mononucléées circulantes sanguines juste après décongélation, sans stimulation. Afin d'étudier l'impact des variants-candidats identifiés sur la voie mTORC1 dans les cellules immunitaires, et de tester l'hypothèse de travail selon laquelle ils conduiraient à une activation excessive de la voie mTORC1, les cellules de cinq patients porteurs de variants-candidats : RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}, LAMTOR3^{Y74C}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V} ; ont été comparées avec celles de deux patients atteints d'HAI sans variants-candidats identifiés, celles d'un patient atteint d'ALPS, celles de deux individus sains de 23 et 16 ans (groupe contrôle négatif) et celles d'un patient atteint de syndrome de PI3K δ activé (groupe contrôle positif). Les résultats sont illustrés par la Figure 26.

Comme attendu, la proportion de lymphocytes T et B exprimant phospho-S6 est augmentée chez le patient atteint d'APDS par rapport aux individus sains, de même que la médiane d'intensité de fluorescence. D'autre part, les plus basses mesures correspondent à celles des individus sains. Ces deux paramètres permettent de valider ce modèle expérimental. Les résultats du patient atteint d'ALPS sont similaires à ceux du groupe contrôle négatif.

Les résultats des patients porteurs de variants-candidats ont été considérés dans leur ensemble à la recherche d'un effet commun activateur de la voie mTORC1, indépendamment des différentes mutations et des différentes protéines impliquées. Au sein de ce groupe, on observe des différences, avec notamment le patient A (RagC^{P87T}) qui présente systématiquement une activité supérieure aux autres.

La proportion de lymphocytes T et B exprimant phospho-S6 et la médiane d'intensité de fluorescence sont significativement augmentées dans le groupe des patients porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains et par rapport aux autres patients atteints d'HAI non porteurs de variants-candidats. Ces résultats démontrent l'hyperactivité de la voie mTORC1 induites par les variants-candidats.

Figure 26. Activation excessive de la voie mTORC1 dans les cellules mononucléées circulantes sanguines des patients porteurs de variants-candidats

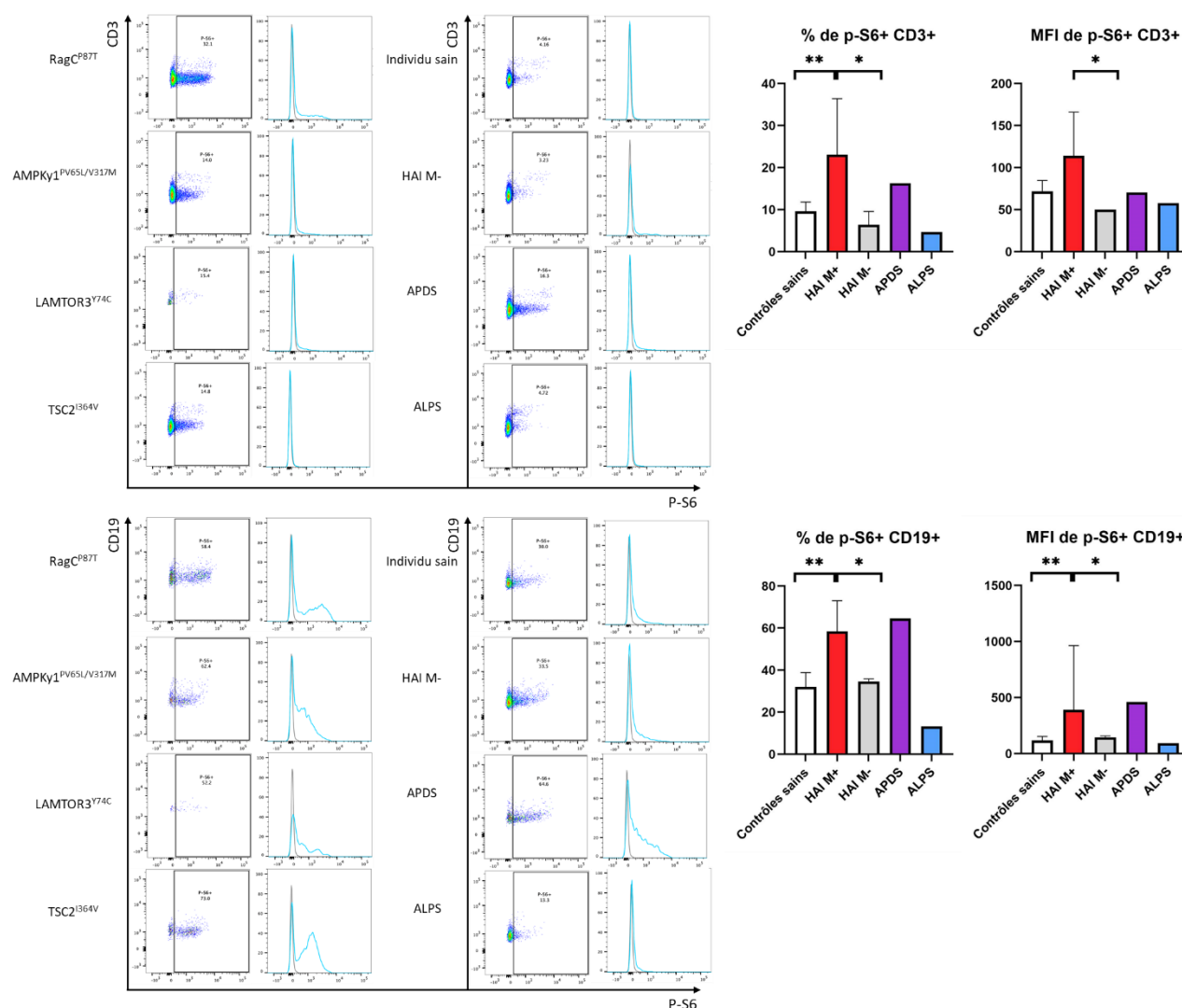


Diagramme de points représentant la proportion de lymphocytes phospho-S6⁺ et histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphocytes T CD3⁺ et CD19⁺ à partir de cellules mononucléées circulantes sanguines non stimulées, immédiatement après décongélation, d'individus sains, de patients porteurs de variants-candidats (M+), de patients non porteurs de variants-candidats (M-), d'un patient atteint d'APDS et d'un patient atteint d'ALPS. Comparaison des données entre les groupes de patients. Cette expérience a pu être répétée deux fois pour le groupe M+ et individus sains. Les * indiquent une différence significative. ALPS : *Autoimmune LymphoProliferative Syndrome* ; APDS : *Activated PI3K delta syndrome* ; MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

II. Hyperactivité de mTORC1 dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants

Afin de confirmer les résultats précédents et d'étudier l'impact des variants-candidats sur l'activité de la voie mTORC1 dans différentes conditions, des cellules mononucléées circulantes sanguines ont été activées pour générer des lymphoblastes T. Cette technique nécessite des manipulations supplémentaires qui peuvent augmenter l'écart entre les données expérimentales et la situation physiologique *in vivo*. Elle présente cependant le bénéfice non négligeable de produire davantage de matériel cellulaire, permettant de répéter les expériences et de tester différentes conditions : inactivation (sevrage en acides aminés), stimulation (activation des cellules) et inhibition (traitement par inhibiteurs de mTOR).

L'analyse de l'activation de mTORC1 repose sur la phosphorylation de S6 détectée par cytométrie en flux. Des lymphoblastes T ont été générés pour cinq patients porteurs des variants-candidats : RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}, LAMTOR3^{Y74C}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V}. Leurs résultats ont été systématiquement comparés à ceux de lymphoblastes T issus d'individus sains (contrôle négatif). Lorsque cela était possible, ils ont été comparés également à ceux de lymphoblastes T issus de deux patients atteints d'HAI sans variants-candidats identifiés.

Toutes les expériences ont pu être répétées au moins deux fois.

a. Hyperactivité de mTORC1 en condition de sevrage

Afin d'étudier l'inactivation de la voie mTORC1, les lymphoblastes T sont sevrés en acides aminés pendant une heure, puis la phosphorylation de S6 est analysée en cytométrie en flux. Dans des conditions normales, le sevrage en acides aminés mime le stress cellulaire et inhibe l'effet de croissance et de prolifération cellulaire lié à l'activité de mTORC1. De plus, l'apport en acides aminés correspond à la voie des Rag GTPases impliquées dans la plupart des variants-candidats identifiés. Cette expérience permet de tester l'hypothèse de travail selon laquelle ces variants-candidats induisent une persistance de l'activité de mTORC1 en l'absence d'apport d'acides aminés, résistant ainsi à son mécanisme inhibiteur principal. De la même manière que dans les expériences précédentes, les patients porteurs de différents variants-candidats sont considérés en tant que groupe afin d'évaluer l'effet commun activateur de la voie. Comme précédemment, le patient A (RagC^{P87I}) présente une activité de mTORC1 supérieure à celle des autres patients.

Dans ces conditions, on observe une augmentation significative de la proportion de cellules exprimant phospho-S6 et de la médiane d'intensité de fluorescence parmi les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains. La phosphorylation de S6 est également augmentée par rapport aux patients atteints d'HAI sans variant-candidat identifié. Ces données sont illustrées dans la Figure 27.

Ces résultats démontrent que les variants-candidats rendent l'activité de la voie mTORC1 insensibles au sevrage en acides aminés (voie de régulation des Rag GTPases) dans les lymphoblastes T.

Figure 27. Activation excessive de la voie mTORC1 en condition de sevrage en acides aminés dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats

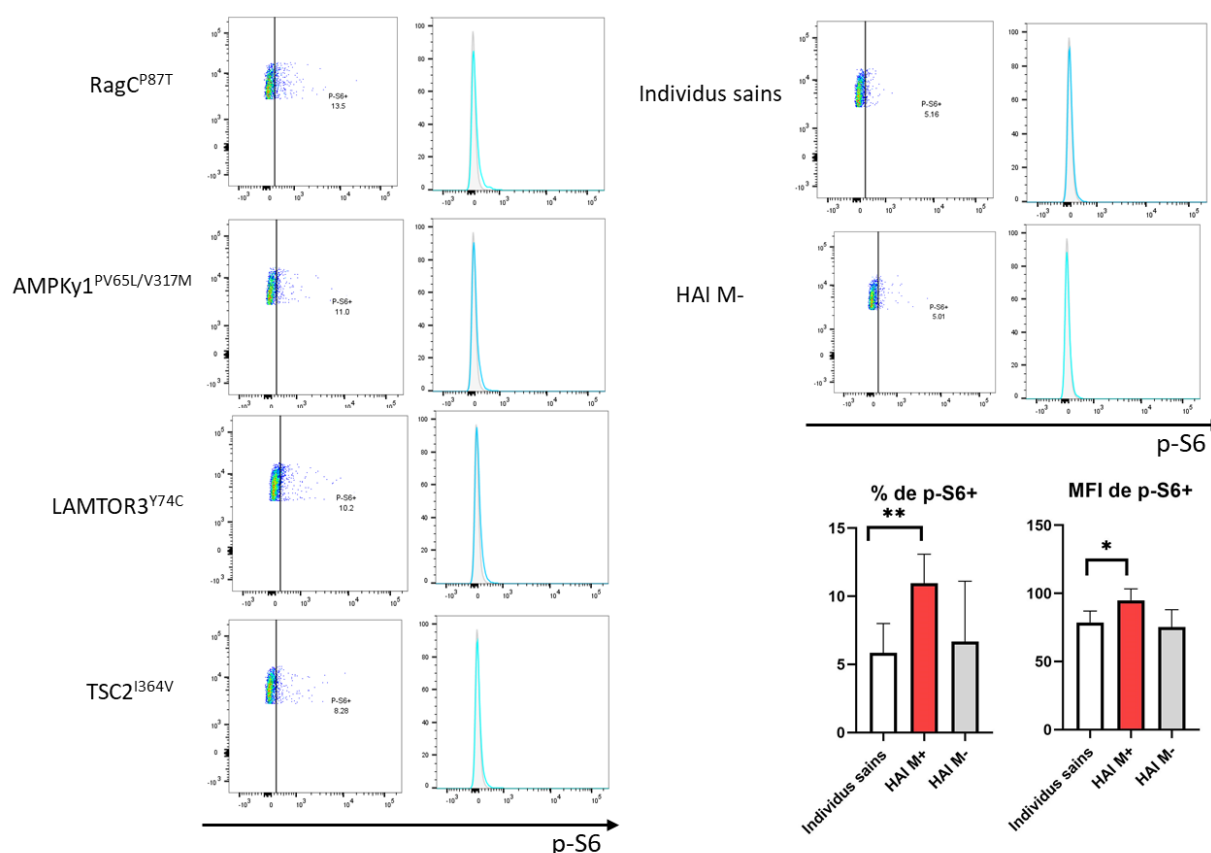


Diagramme de points représentant la proportion de cellules phospho-S6⁺ et histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes T d'individus sains, de patients porteurs de variants-candidats (M+), et de patients non porteurs de variants-candidats (M-). Les lymphoblastes T sont produits par stimulation par billes anti-CD3/CD28 de cellules mononucléées circulantes sanguines, ils sont cultivés pendant 6 jours puis sevrés en acides aminés pendant une heure. Comparaison des données entre les groupes de patients. Les * indiquent une différence significative. HAI : hépatite auto-immune ; MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

b. Absence d'hyperactivité de mTORC1 en condition de stimulation par IL-2

Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle les variants-candidats, par l'hyperactivité de la voie mTORC1, impactent la réponse immunitaire, différentes conditions de stimulation ont été étudiées sur les lymphoblastes T.

La stimulation par IL-2 permet d'activer la prolifération des lymphoblastes T, sans passer par l'activation du TCR.

Après un sevrage en acides aminés pendant une heure, les lymphoblastes T ont été stimulés pendant 30 minutes par un apport conséquent d'IL-2. La phosphorylation de S6 a ensuite été analysée par cytométrie en flux. Dans le groupe contrôle négatif, la proportion de cellules exprimant phospho-S6 double, ce qui permet de valider le modèle expérimental. Ces données sont présentées dans la Figure 28.

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre le groupe de patients porteurs de variants-candidats et les autres groupes.

Ces résultats démontrent que les variants-candidats n'altèrent pas la réponse de l'activité de mTORC1 à la stimulation par IL-2 dans les lymphoblastes T.

Figure 28. Activation identique de la voie mTORC1 après stimulation par IL-2 dans les lymphoblastes T porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains

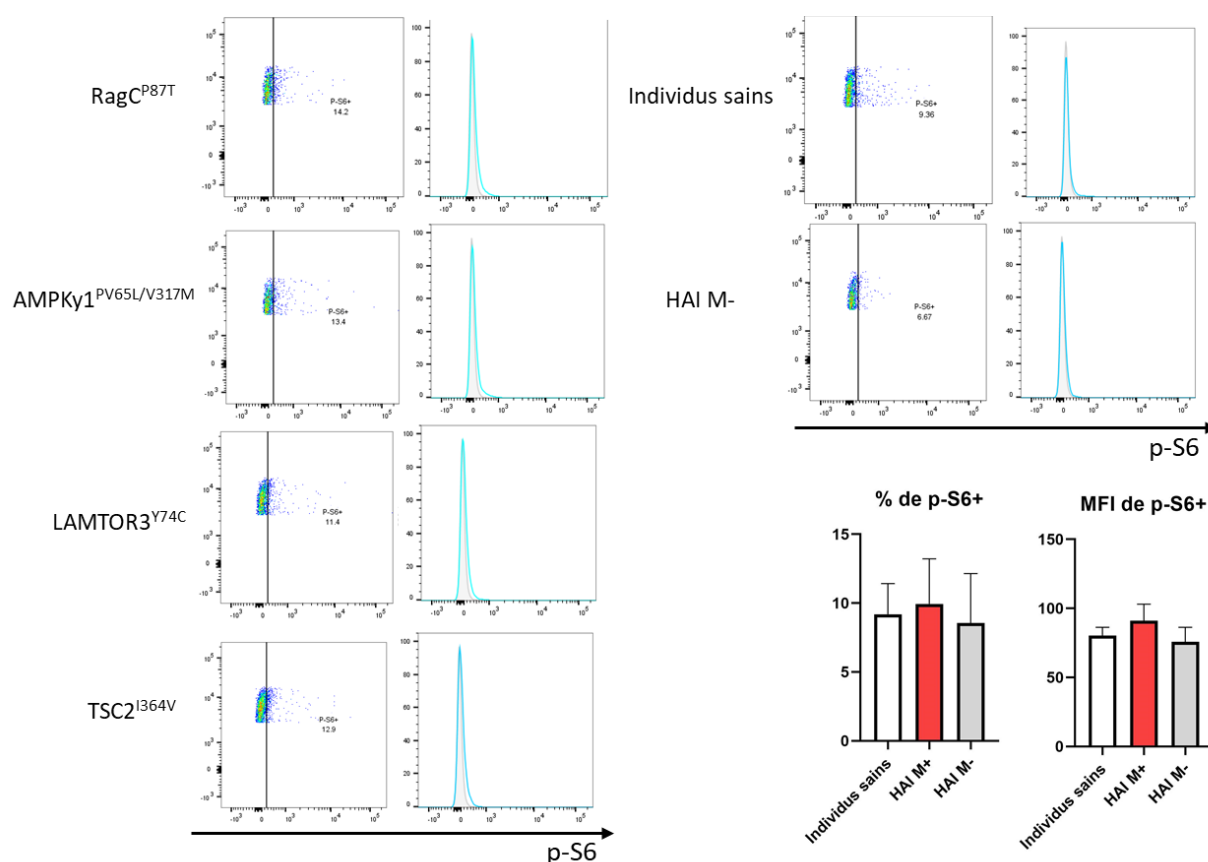


Diagramme de points représentant la proportion de cellules phospho-S6⁺ et histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes T d'individus sains, de patients porteurs de variants-candidats (M+), et de patients non porteurs de variants-candidats (M-). Les lymphoblastes T sont produits par stimulation par billes anti-CD3/CD28 de cellules mononucléées circulantes sanguines, ils sont cultivés pendant 6 jours puis sevrés en acides aminés pendant une heure. Ils sont ensuite stimulés par IL-2 pendant 30 minutes. Comparaison des données entre les groupes de patients. Les * indiquent une différence significative. HAI : hépatite auto-immune ; MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

c. Hyperactivité de mTORC1 en condition de stimulation par OKT-

3

La stimulation par OKT-3 permet de mimer l'activation du TCR en conditions expérimentales. Comme vu précédemment, cette stimulation active la voie mTORC1 dans des conditions normales. Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle les variants-candidats, par l'excès d'activation de mTORC1, impactent la réponse immunitaire, les lymphoblastes T sont sevrés en acides aminés pendant une heure, puis stimulés par OKT-3 pendant 30 minutes. La phosphorylation de S6 est ensuite analysée par cytométrie en flux. Dans le groupe contrôle négatif, la proportion de cellules exprimant phospho-S6 double, ce qui permet de valider le modèle expérimental. Ces données sont représentées dans la Figure 29.

On observe une augmentation significative de la proportion de cellules exprimant phospho-S6 chez les patients porteurs de variants-candidats par rapport aux patients atteints d'HAI sans variants-candidats identifiés ; ainsi qu'une augmentation significative de la médiane d'intensité de fluorescence de phospho-S6 par rapport aux individus sains et aux patients atteints d'HAI sans variants-candidats identifiés.

Ces résultats démontrent que les variants-candidats induisent une activation excessive de la voie mTORC1 en réponse à la stimulation du TCR dans les lymphoblastes T.

Figure 29. Activation excessive de la voie mTORC1 après stimulation par OKT-3 dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats

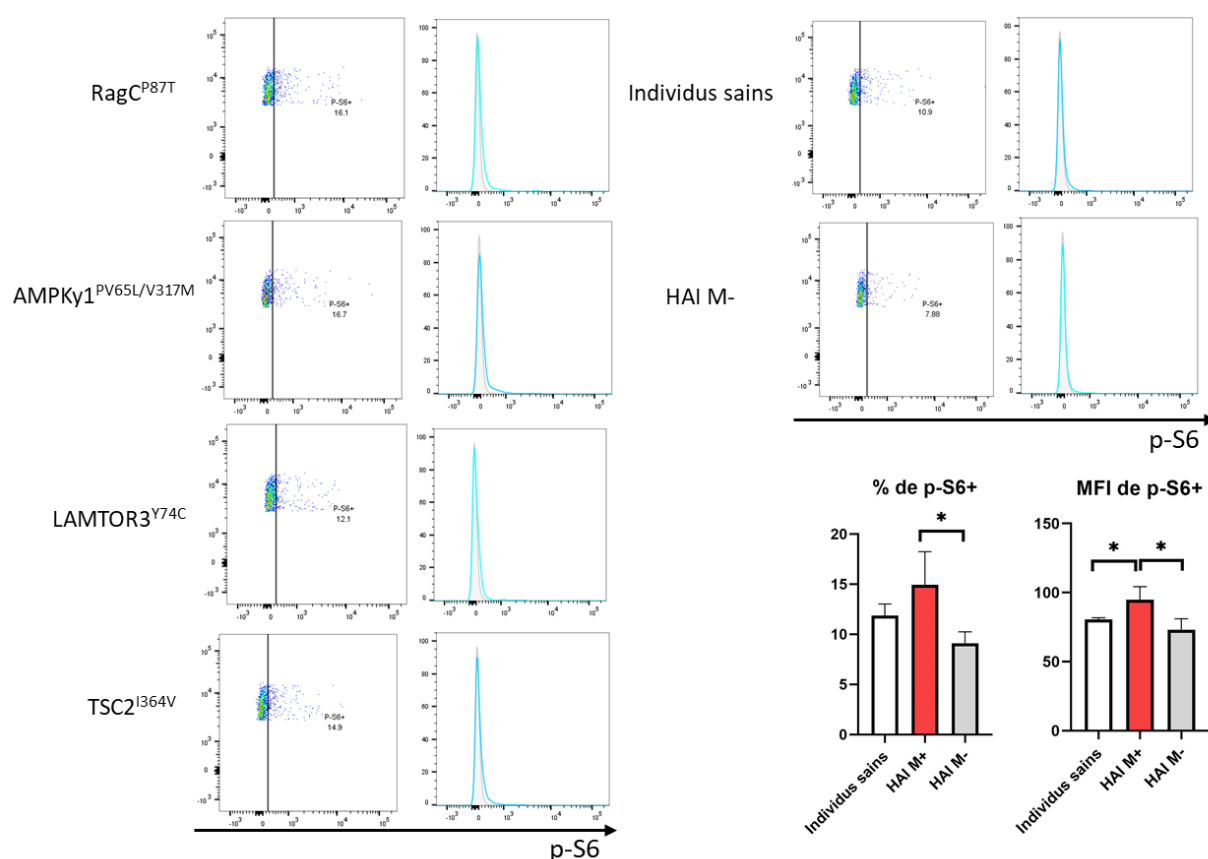


Diagramme de points représentant la proportion de cellules phospho-S6⁺ et histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes T d'individus sains, de patients porteurs de variants-candidats (M+), et de patients non porteurs de variants-candidats (M-). Les lymphoblastes T sont produits par stimulation par billes anti-CD3/CD28 de cellules mononucléées circulantes sanguines, ils sont cultivés pendant 6 jours puis sevrés en acides aminés pendant une heure. Ils sont ensuite transférés dans des puits recouverts d'OKT-3 (1 µg/ml) pendant 30 minutes. Comparaison des données entre les groupes de patients. Les * indiquent une différence significative. HAI : hépatite auto-immune ; MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

d. Normalisation de l'activité de mTORC1 après traitement par inhibiteurs de mTOR

La rapamycine est un inhibiteur de mTOR connu pour agir plus spécifiquement sur mTORC1 que sur mTORC2. Torin1 est un inhibiteur de mTOR généré pour être aussi efficace sur mTORC1 et sur mTORC2.

Les lymphoblastes T ont été incubées avec les inhibiteurs de mTOR (rapamycine et Torin1) au moment du sevrage en acides aminés, permettant un traitement d'une heure. Les cellules ont ensuite été stimulées par OKT-3, cette condition ayant montré une différence d'effet selon la présence ou non de variants-candidats.

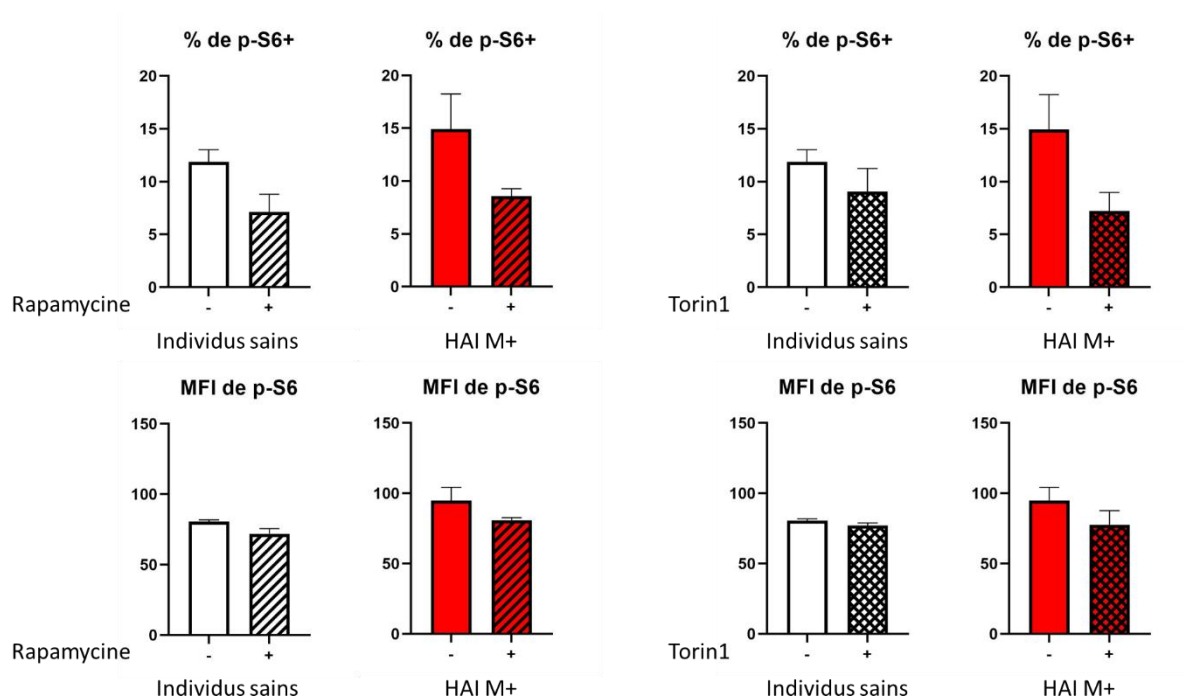
Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle l'hyperactivité de mTORC1 induite par les variants-candidats est sensible au traitement par inhibiteurs de mTOR, la phosphorylation de S6 a été analysée dans les lymphoblastes T de deux patientes porteuses de variants-candidats : LAMTOR3^{Y74C} et TSC2^{I364V}. Les résultats ont été comparées à ceux de deux individus sains (groupe contrôle négatif).

Le traitement par inhibiteur de mTOR a provoqué une légère diminution de la proportion de cellules exprimant phospho-S6 et de sa médiane d'intensité de fluorescence dans le groupe contrôle négatif, avec un effet dose-dépendant. Ces données ont permis de valider le modèle expérimental.

La Figure 30 montre que le traitement induit une réduction de l'activité de mTORC1 en condition de stimulation par OKT-3, restaurant une proportion de cellules exprimant phospho-S6 et une médiane d'intensité de fluorescence similaire chez les lymphoblastes de patients porteurs de variants-candidats et chez les individus sains.

Ces résultats démontrent d'une part l'implication de la voie mTORC1 dans l'excès de phosphorylation de S6 présent dans les lymphoblastes des patients porteurs de variants-candidats, et d'autre part, ils ouvrent une perspective intéressante de pistes thérapeutiques.

Figure 30. Inhibition de l'activation excessive de la voie mTORC1 par les inhibiteurs de mTOR dans les lymphoblastes T porteurs de variants-candidats stimulés par OKT-3



Comparaison de la proportion de cellules phospho-S6⁺ détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes T d'individus sains et de patients porteurs de variants-candidats selon qu'elles ont été traitées ou non par un inhibiteur de mTOR. Les lymphoblastes T sont produits par stimulation par billes anti-CD3/CD28 de cellules mononucléées circulantes sanguines, ils sont cultivés pendant 6 jours puis traités par Rapamycine ou Torin1. Ils sont ensuite sevrés en acides aminés pendant une heure puis transférés dans des puits recouverts d'OKT-3 (1 µg/ml) pendant 30 minutes. MFI : médiane d'intensité de fluorescence.

III. Hyperactivité de mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur de RagC^{P87T}

Comme vu précédemment, les cellules issues du patient porteur du variant-candidat RagC^{P87T} présentent systématiquement une activité de mTORC1 supérieure à celle des autres patients.

Afin d'étudier l'impact du variant RagC^{P87T} dans les lymphocytes B et de tester l'hypothèse de travail selon laquelle il aurait le même impact que dans les lymphocytes T, une lignée immortalisée de lymphoblastes B a été générée à partir de cellules mononucléées circulantes sanguines infectées par l'EBV.

Cette technique nécessite des manipulations supplémentaires, et les lymphoblastes qu'elle produit présentent de nombreuses différences par rapport aux lymphocytes B circulants en conditions physiologiques. Elle offre néanmoins le bénéfice non négligeable de travailler sur une quantité virtuellement infinie de cellules car elles peuvent être cultivées plusieurs semaines, contrairement aux cellules mononucléées circulantes sanguines et aux lymphoblastes T que l'on peut conserver maximum trois semaines en culture.

Deux lignées de lymphoblastes B immortalisées ont été générées à partir de cellules mononucléées circulantes sanguines d'individus sains (groupe contrôle négatif) et comparées systématiquement à celle du patient porteur du variant RagC^{P87T}.

L'utilisation de cette lignée de lymphoblastes B immortalisés permet ainsi d'étudier non seulement la phosphorylation de S6 en cytométrie en flux, mais également la phosphorylation de S6K1 en Western-Blot, dans différentes conditions. Les expériences présentées ci-après ont été réalisées au moins deux fois.

a. Hyperactivité de mTORC1

Le sevrage en acides aminés est une condition permettant d'inactiver la voie mTORC1 dans la plupart des types cellulaires en conditions normales.

Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle le variant-candidat RagC^{P87T} rend l'activité de mTORC1 insensible au sevrage en acides aminés, les lymphoblastes B ont été sevrés pendant une heure, puis la phosphorylation de S6 a été analysée par cytométrie en flux et celle de S6K1 par Western-Blot.

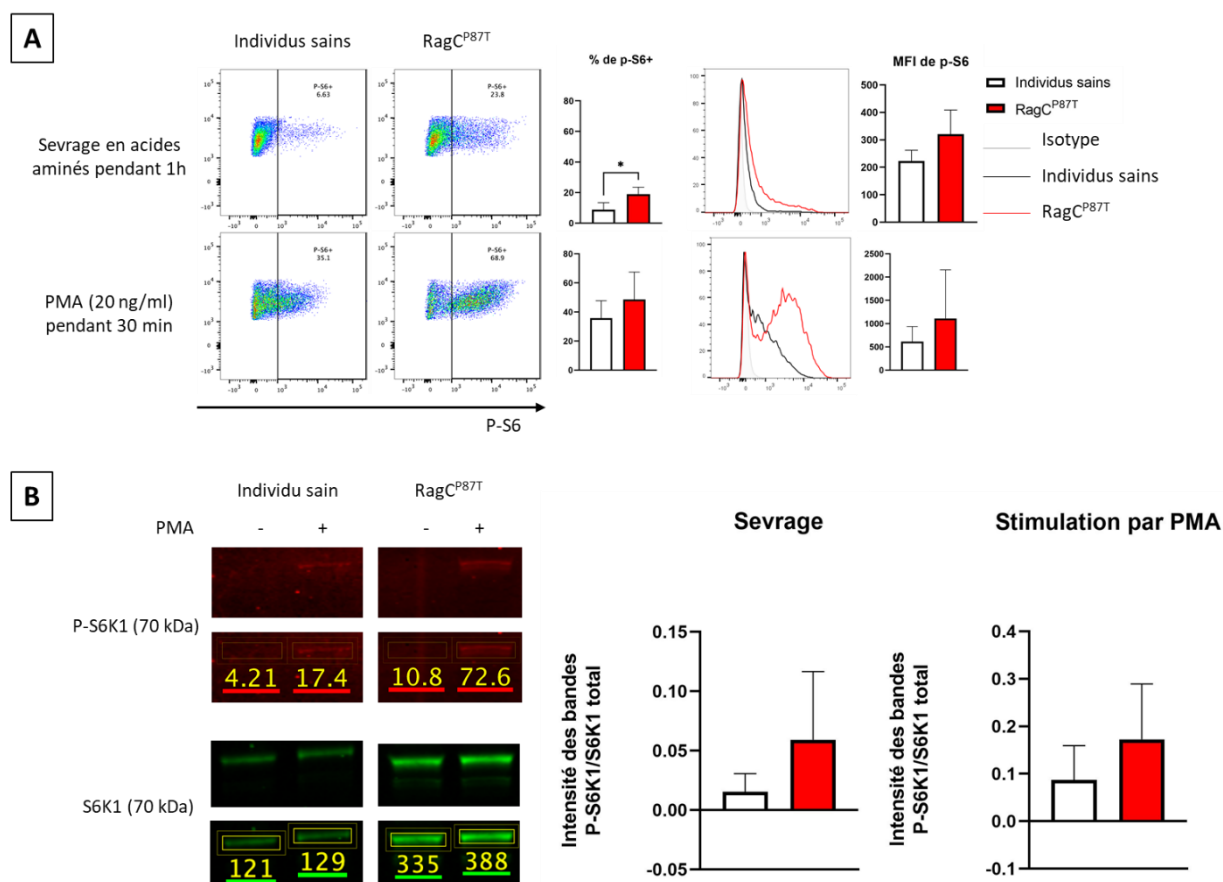
En condition de sevrage en acides aminés, on observe une disparition de la phosphorylation de S6K1 dans le groupe contrôle négatif. Cela permet de valider le modèle expérimental de sevrage. En revanche, on observe une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de S6K1 parmi les lymphoblastes B du patient porteur du variant RagC^{P87T}. De plus, la proportion de cellules exprimant phospho-S6 est significativement supérieure dans les lymphoblastes de ce patient par rapport aux individus sains ($p = 0,0476$), ainsi que la médiane d'intensité de fluorescence.

La stimulation par PMA permet d'activer de façon aspécifique les lymphoblastes B, provoquant en conditions normales une augmentation de l'activité de mTORC1.

Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle le variant-candidat RagC^{P87T} accroît l'activation de mTORC1 en réponse à la stimulation, les lymphoblastes B ont été sevrés pendant une heure puis stimulés par PMA. Dans ces conditions, on observe une augmentation de la forme phosphorylée de S6K1 et de la proportion des cellules exprimant phospho-S6 dans le groupe contrôle négatif par rapport à la condition de sevrage, ce qui permet de valider le modèle expérimental. De plus, la forme phosphorylée de S6K1, la proportion de cellules exprimant phospho-S6 et sa médiane d'intensité de fluorescence est significativement augmentée dans les lymphoblastes B du patient porteur de RagC^{P87T}.

Ces résultats, présentés dans la Figure 31, confirment que le variant RagC^{P87T} rend l'activation de mTORC1 non seulement insensible au sevrage en acides aminés mais aussi excessive en réponse à la stimulation dans les lymphoblastes B.

Figure 31. Activation excessive de la voie mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur du variant-candidat RagC^{P87T}



A : Diagramme de points représentant la proportion de cellules phospho-S6⁺ et histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes B immortalisés d'individus sains et du patient porteur du variant-candidat RagC^{P87T}. Les cellules sont sevrées en acides aminés pendant une heure, puis stimulées par PMA (20 ng/ml) pendant 30 minutes. MFI : médiane d'intensité de fluorescence ; PMA : *phorbol myristate acetate*. B : Expression protéique de phospho-S6K1 par Western-Blot. Révélation de la membrane et quantification par immunofluorescence (technique LiCor). Comparaison des données réalisées en duplicats. Les * indiquent une différence significative.

b. Baisse de l'hyperactivité de mTORC1 sous inhibiteurs de mTOR

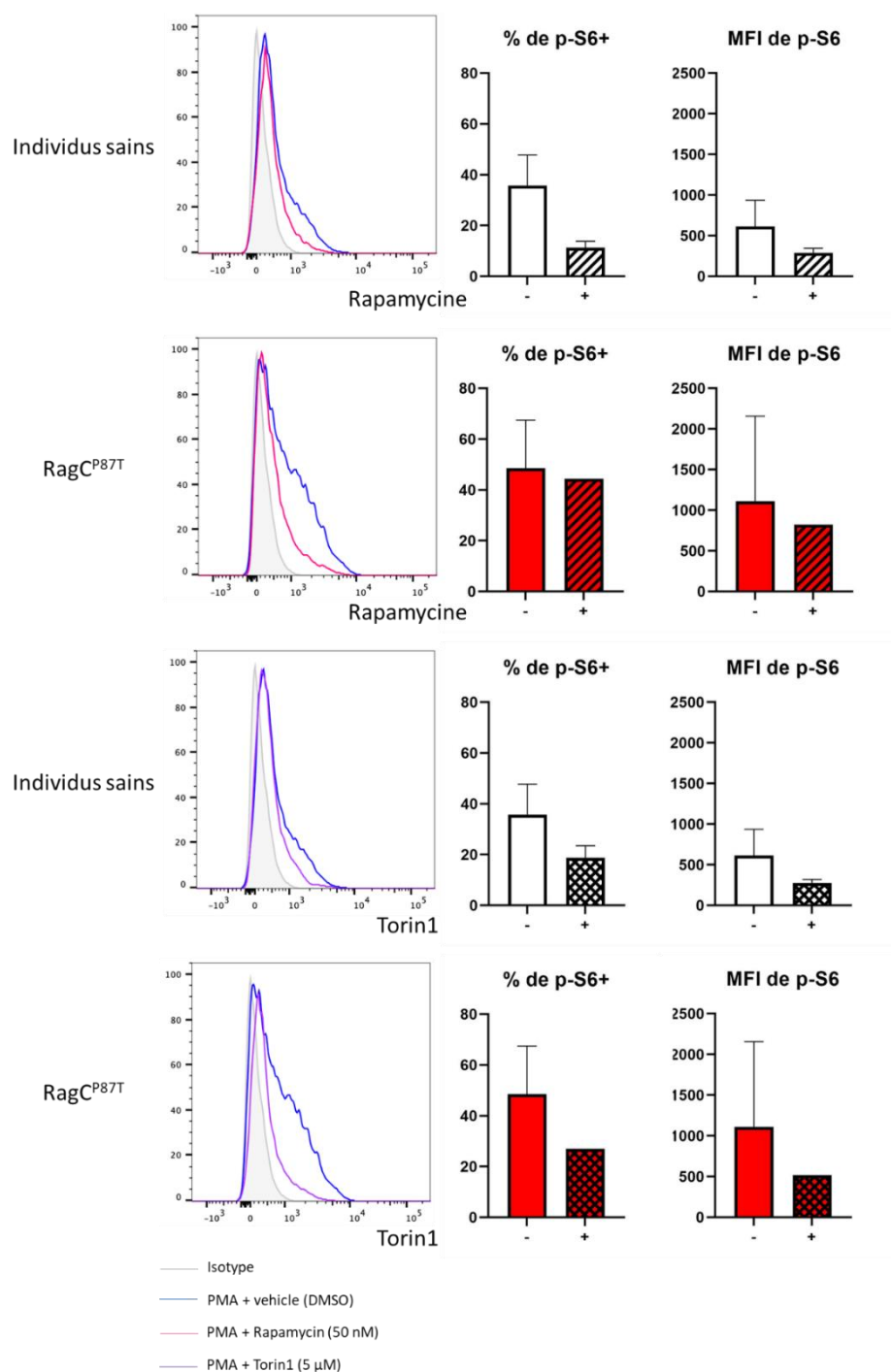
Afin de tester l'hypothèse de travail selon laquelle l'hyperactivation de mTORC1, dans les lymphoblastes B, induite par RagC^{P87T} est sensible aux inhibiteurs de mTOR, la rapamycine et Torin1 ont été administrés aux lymphoblastes B selon les mêmes conditions que pour les lymphoblastes T.

En conditions de stimulation par PMA, les lymphoblastes B d'individus sains traités par inhibiteurs de mTOR présentent une diminution de la phosphorylation de S6, prédominante sous traitement par Torin1. Cela permet de valider le modèle expérimental.

La Figure 32 montre que le traitement par inhibiteurs de mTOR permet de restaurer une activité de mTORC1 similaire dans les lymphoblastes B du patient porteur du variant RagCP87T et dans le groupe contrôle négatif. On observe comme attendu une diminution plus importante sous traitement par Torin1 que sous traitement par rapamycine.

Ces résultats confirment la sensibilité de l'hyperactivité de mTORC1 lié au variant RagC^{P87T} aux inhibiteurs de mTOR et la possibilité de nouvelles options thérapeutiques.

Figure 32. Inhibition de l'activité de la voie mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur du variant-candidat RagC^{P87T}



Histogramme de l'intensité de fluorescence de phospho-S6 détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes B immortalisés d'individus sains et du patient porteur du variant-candidat RagC^{P87T}. Les cellules sont traitées ou non par un inhibiteur de mTOR puis sevrées en acides aminés pendant une heure, et ensuite stimulées par PMA (20 ng/ml) pendant 30 minutes. MFI : médiane d'intensité de fluorescence ; PMA : *phorbol myristate acetate*. Comparaison des données réalisées en duplicats.

DISCUSSION

PRINCIPAUX RESULTATS

Les principaux résultats de ce travail sont les suivants :

- Sur le plan génétique, le tiers de la cohorte d'étude de patients atteints d'HAI portait un variant-candidat impliqué dans l'hyperactivité de mTORC1 ;
- Sur le plan clinique, les patients porteurs de variants-candidats étaient atteints de plus de maladies auto-immunes extra-hépatiques que les autres patients, présentant essentiellement des HAI de type 2, de survenue précoce, sous forme d'hépatite aiguë et avec un terrain auto-immun familial ;
- Sur le plan moléculaire, les substitutions hétérozygotes germinales identifiées affectaient les domaines d'activation de la protéine (RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}), d'interaction avec ses partenaires (LAMTOR1^{R147C}, LAMTOR3^{Y74C}, p85 α ^{E297K}), ou stabilisant la structure de la protéine (mTOR^{E285V}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V}) et l'analyse *in silico* approfondie pour chaque variant soutenait l'hypothèse qu'ils conduisent tous à une hyperactivité de mTORC1 ;
- Sur le plan immuno-phénotypique, les lymphocytes T régulateurs des patients porteurs de variants-candidats présentaient une expression diminuée de FoxP3, Helios et CTLA-4. Le profil cytokinique plasmatique pro-inflammatoire prédominait chez les patients atteints d'HAI en général et ceux portant des variants-candidats en particulier ;
- Sur le plan immunologique fonctionnel, les variants-candidats identifiés conduisaient à une hyperactivité basale de mTORC1 dans les lymphocytes T et B circulants, en rendant l'activité de la voie mTORC1 non seulement résistante au sevrage en acides aminés, mais aussi en majorant son activation en réponse aux stimuli dans les lymphoblastes ;
- Sur le plan des pistes thérapeutiques, le traitement par inhibiteurs de mTOR des lymphoblastes mutés permettait de ramener l'activité de mTORC1 au même niveau que dans les lymphoblastes sains.

PARTIE 1 : CLINIQUE

I. HAI de type 2 avec auto-immunité individuelle et familiale

a. Constitution d'une cohorte homogène

La cohorte d'étude a été constituée en obéissant strictement aux critères diagnostiques d'HAI selon les scores établis par les consensus internationaux (Alvarez, 1999 ; Hennes, 2008 ; Mieli-Vergani, 2018). Ainsi, les patients présentant des syndromes de chevauchement avec d'autres pathologies auto-immunes hépatiques (cirrhose biliaire primitive ou cholangite sclérosante primitive) ont été exclus, en l'absence de critères diagnostiques clairement définis (Boberg, 2011 ; Ferri, 2018). De même, ont été exclus les patients chez qui les diagnostics d'HAI étaient portés en l'absence d'auto-anticorps spécifiques (anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM-1, anti-LC-1) ou associés à une aplasie médullaire, ainsi que ceux chez qui le diagnostic d'hépatite à cellules géantes était évoqué (Beretta-Piccoli, 2018 ; Beer, 2021).

b. Similitudes de la cohorte avec la littérature

i. Auto-anticorps associés

Les auto-anticorps rapportés dans la première partie des résultats sont ceux retrouvés au cours des explorations de la prise en charge médicale des patients. Dans la littérature, peu de données sont disponibles en dehors d'études dédiées à l'association de l'HAI avec chaque auto-anticorps. Ainsi, en comparant la prévalence des différents auto-anticorps observée dans la cohorte et celle retrouvée dans la littérature, les patients de la cohorte d'étude ne présentent pas plus d'auto-anticorps circulants que ce qui est décrit, comme illustré dans la Figure 33.

ii. Poly-auto-immunité individuelle

Concernant les pathologies auto-immunes extra-hépatiques, la prévalence globale autour de 40% est similaire dans la cohorte d'étude et dans la littérature (Wong, 2017 ; Mack, 2020). A l'exception des cytopénies auto-immunes, la répartition des pathologies retrouvées correspond à ce qui est décrit, comme cela est illustré par la Figure 34 (Webb, 2018).

Figure 33. Poly-auto-immunité individuelle

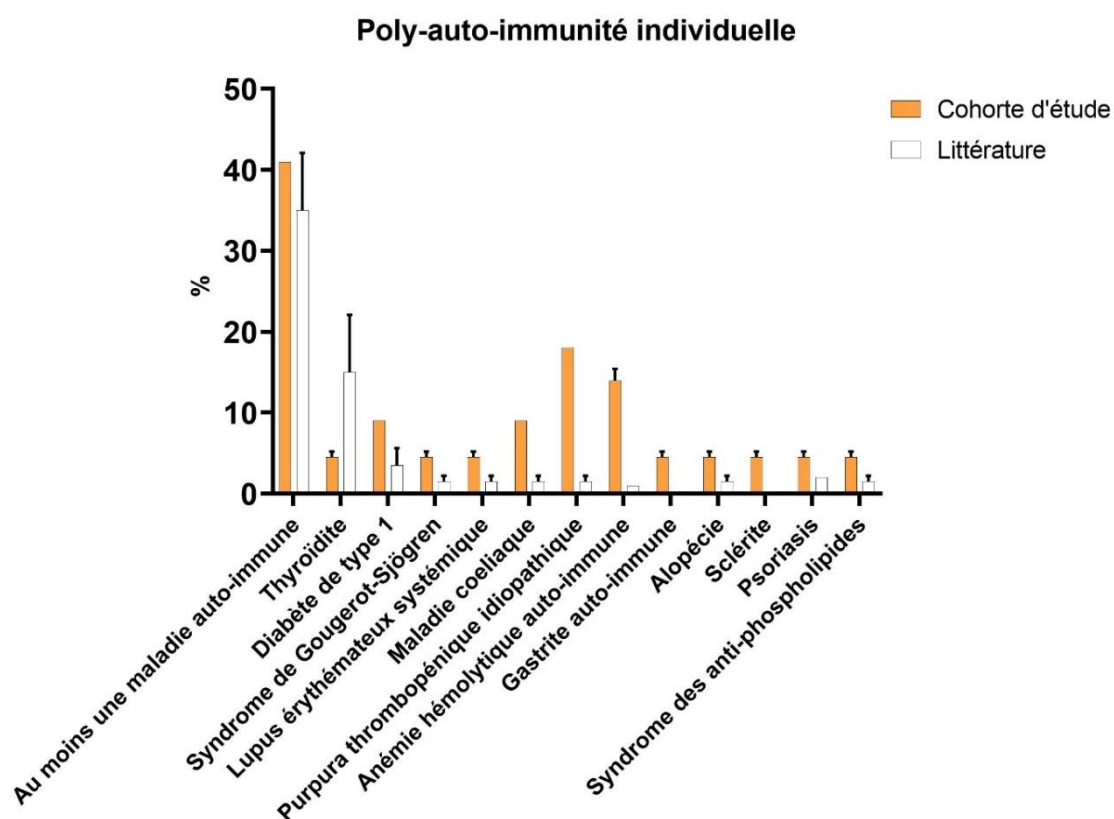
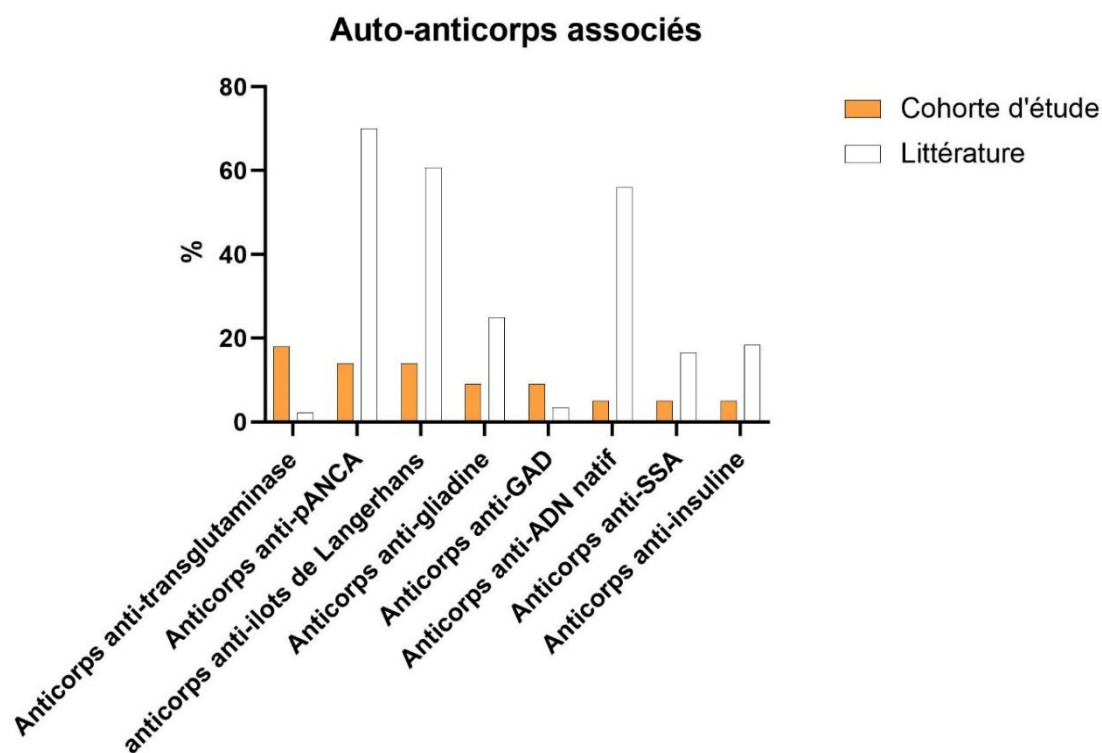


Figure 34. Auto-anticorps associés



iii. Réponse habituelle au traitement

Quel que soit le mode de présentation, le traitement de référence conduit 80 à 90% des patients à la rémission, dans la littérature comme dans la cohorte d'étude (Czaja, 2009 ; Manns, 2010). La fréquence des rechutes est similaire dans la cohorte d'étude par rapport à ce qui est décrit dans la littérature (Strassburg, 2011). Le sevrage permanent a été obtenu pour 9% des patients de la cohorte d'étude, légèrement en-dessous des taux publiés (10 à 20%) (van Gerven, 2013). Les molécules de seconde ligne utilisées dans la cohorte font partie de l'arsenal thérapeutique alternatif. De même, les taux de transplantation hépatique et de décès correspondent aux données retrouvées dans les publications (Mielì-Vergani, 2018). Ainsi, il ne semble pas que la cohorte d'étude soit constituée de patients particulièrement réfractaires au traitement ou susceptibles de rechuter.

c. Caractéristiques prédominantes de la cohorte d'étude

i. HAI de type 2

La cohorte d'étude comprend beaucoup plus de patients atteints d'HAI de type 2 que cela est décrit dans la littérature, et moins d'HAI de type 1 (Figure 33). De plus, parmi les patients atteints d'HAI de type 1, la prévalence des anticorps anti-muscle lisse est plus élevée que ce qui est retrouvé habituellement. Concernant les patients atteints d'HAI de type 2, les proportions d'anticorps anti-LKM-1 et anti-LC-1 correspondent à ce qui est observé dans les cohortes publiées (Terziroli Beretta-Piccoli, 2018 ; Sebode, 2018). La Figure 35 illustre ces comparaisons.

ii. Hépatite aiguë au diagnostic

Les publications présentent une prévalence de patients asymptomatiques plus importante dans la population adulte et atteints d'HAI de type 1 (Feld, 2005). De plus, si les présentations sous forme d'hépatite aiguë ou de défaillance hépatique sont rares, elles sont principalement retrouvées dans la population pédiatrique et chez les patients atteints d'HAI de type 2. La prévalence d'une présentation aiguë (définie par la présence d'un ictère clinique et biologique) est très significativement supérieure dans la cohorte d'étude par rapport à ce qui est retrouvé dans une cohorte récente ($p = 0,0009$), comme illustré dans la Figure 36 (Biewenga, 2020). En revanche, la prévalence de défaillance hépatique est similaire à ce qui est décrit dans la littérature.

Figure 35. Répartition des anticorps spécifiques d'HAI

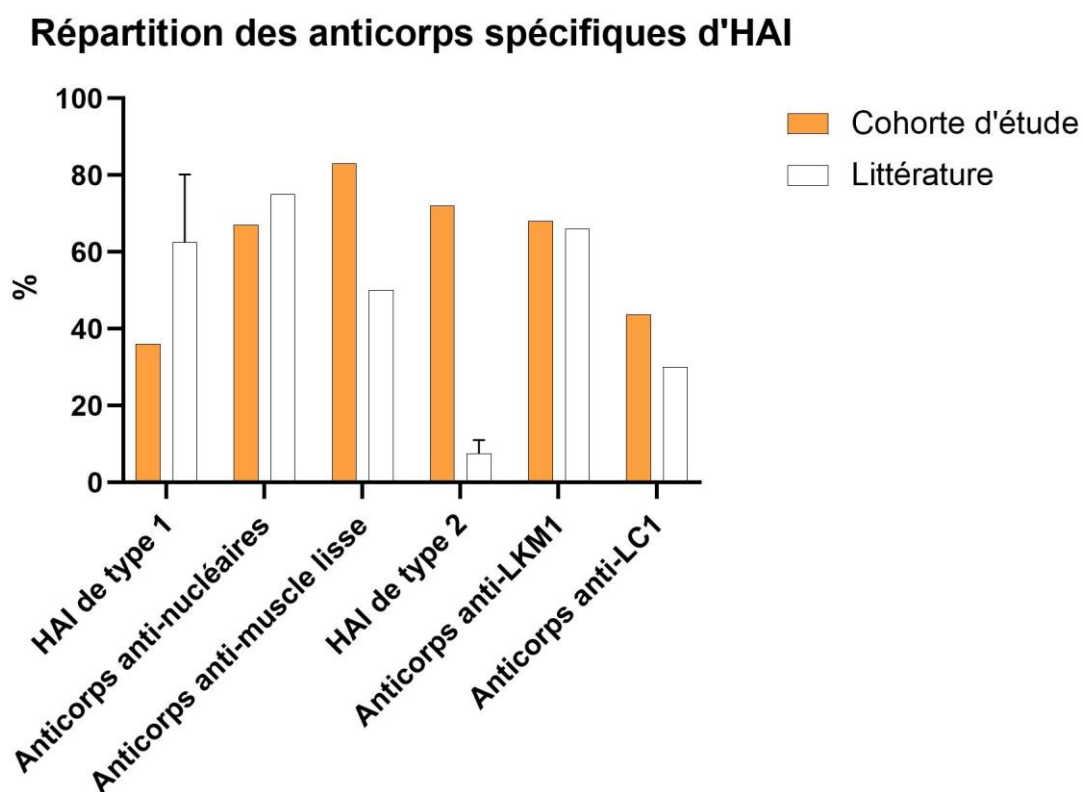
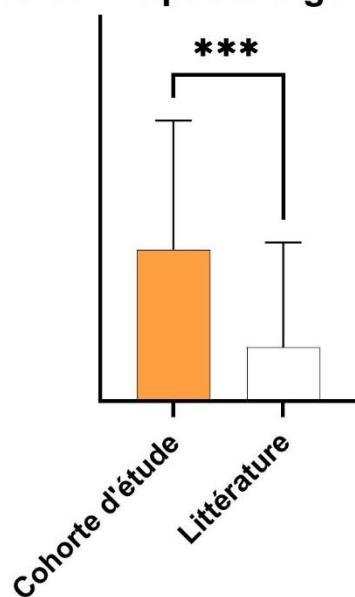


Figure 36. Prévalence de l'hépatite aigue au diagnostic

Prévalence de l'hépatite aigue au diagnostic



iii. Terrain auto-immun familial

Très peu de données sont disponibles dans la littérature concernant les antécédents familiaux de pathologies auto-immunes, en particulier concernant les atteintes extra-hépatiques. La prévalence retrouvée dans la cohorte d'étude est bien supérieure à celle de la population générale (59% vs 5%), or les grandes cohortes multicentriques ne retrouvent pas d'augmentation de prévalence par rapport à la population générale (Grønbaek, 2019). Dans la cohorte d'étude, la présence d'une HAI chez les apparentés est observée dans 2 familles sur 22 (9%) ; ce qui est supérieur à la prévalence retrouvée dans la littérature (Grønbaek, 2018). Une fratrie est particulièrement intéressante car parmi les 4 enfants, les 3 sœurs sont atteintes d'hépatite auto-immune de type 1, seul le plus jeune frère est à ce jour indemne. Ainsi, les antécédents familiaux de pathologies auto-immunes hépatiques et extra-hépatiques sont surreprésentés dans la cohorte d'étude par rapport à ce qui est décrit dans la littérature.

iv. Age de survenue précoce

Dans la littérature, l'HAI peut survenir chez les nourrissons de moins d'un an (plutôt HAI de type 2), majoritairement entre 10 et 18 ans, chez les jeunes adultes (plutôt HAI de type 2) et autour de 40 ans (plutôt HAI de type 1) (Mieli-Vergani, 2018). Dans la cohorte d'étude, l'âge de survenue est plus précoce que ce qui est décrit dans la littérature.

v. Prédominance féminine

L'HAI, comme la plupart des maladies auto-immunes, est une pathologie connue pour sa prédominance féminine, caractéristique majeure dans notre cohorte avec un ratio masculin/féminin de 1/10, supérieur au ratio habituel de 1/4 à 1/7 (Liberal, 2016).

II. La voie mTORC1 dans les maladies auto-immunes

a. mTORC1 ou le trait d'union entre HAI de type 1 et de type 2 ?

Historiquement, l'HAI de type 2 était connue pour être plus souvent associée à d'autres pathologies auto-immunes, et on s'attendrait à retrouver des variants particulièrement chez ces patients-là (Alvarez, 1999).

En effet, la cohorte d'étude présente une prédominance de patients atteints d'HAI de type 2 et les deux tiers des patients porteurs de variants-candidats présentent une HAI de type 2. Cependant, il reste un tiers des patients porteurs de variants-candidats qui sont atteints d'HAI de type 1. Ainsi, au sein de patients avec poly-auto-immunité individuelle et familiale à début pédiatrique, la présence de variants-candidats affectant la même voie que ce soit dans l'HAI de type 1 ou l'HAI de type 2 corrobore l'idée d'une physiopathologie commune. La classification entre HAI de type 1 et HAI de type 2 a déjà été débattue et de nombreuses hypothèses ont été soulevées. Certains auteurs proposent que l'HAI de type 2 corresponde à la forme précoce de la pathologie, tandis que l'HAI de type 1 couvre les formes à déclaration plus tardive (Mieli-Vergani, 2018).

b. mTORC1, HAI et maladie cœliaque

Il est intéressant de noter que les deux seuls patients présentant l'association d'HAI et de maladie cœliaque de la cohorte d'étude sont porteurs de variants-candidats.

L'association de ces deux pathologies est bien caractérisée dans la littérature. Une méta-analyse récente révèle que la prévalence de la maladie cœliaque est de 3,5% chez les patients atteints d'HAI, quand elle est autour de 1% dans la population générale (Haggard, 2021).

Sur le plan physiopathologique, la maladie cœliaque rejoint l'HAI sur certaines caractéristiques, notamment le type de réponse immunitaire T avec l'infiltration de lymphocytes T et l'activation des lymphocytes T CD8⁺. Le marquage de biopsies duodénales a révélé une activation constitutive et une expression plus importante de mTOR dans les cellules épithéliales chez les patients atteints de maladie cœliaque par rapport aux individus sains. Des marquages supplémentaires mettent en évidence une hyperactivité de mTORC1 par l'expression de la phosphorylation de Raptor et 4E-BP chez les patients atteints de maladie cœliaque (Sedda, 2020).

Ainsi, il serait intéressant de rechercher une hyperactivité de la voie mTORC1 chez les patients atteints de maladie cœliaque.

c. mTORC1, HAI et cytopénies auto-immunes

L'association d'une hépatite et de cytopénies est connue dans le syndrome hépatite-aplasie ; et l'anémie en particulier dans l'hépatite à cellules géantes (Beer, 2021).

Un cas d'HAI avec anémie hémolytique auto-immune déclenchée suite à une infection à VZV (Jain, 2016). L'association avec le purpura thrombopénique idiopathique a fait l'objet de plusieurs cas rapportés et sa prévalence était de 0,6 à 1,4% parmi les patients atteints d'HAI de la cohorte nationale japonaise (Abe, 2011 ; Takahashi, 2017).

L'association de l'HAI avec des cytopénies auto-immunes n'est pas classique dans la littérature et semble surreprésentée dans la cohorte d'étude. A l'inverse, les cytopénies auto-immunes sont fréquentes dans les syndromes de PI3Kδ activé (APDS), dans lesquels la voie mTORC1 est hyperactivée par des mutations de *PIK3CD*, *PIK3R1* ou *PTEN* (Nunes-Santos, 2019).

Ainsi, il serait intéressant de rechercher des variants-candidats de la voie mTORC1 en particulier dans l'association d'une HAI et d'une ou plusieurs cytopénies auto-immunes.

d. mTORC1, HAI et syndrome des anti-phospholipides

Trois éléments sont à souligner dans ce paragraphe : (i) la détection d'anticorps anti-phospholipides chez 70% d'une cohorte de patients atteints d'HAI a été décrite dans la littérature ; (ii) la cohorte d'étude comporte une patiente présentant un syndrome clinique des anti-phospholipides et (iii) une activation aberrante de la voie mTORC1 a été impliquée dans les lésions endothéliales vasculaires et rénales des patients atteints de syndrome des anti-phospholipides (Krawitt, 2006 ; Branger, 2007 ; Canaud, 2014).

Ces données plaident en faveur d'un substratum commun alliant l'hyperactivité anormale de mTORC1, la dysfonction immunitaire et les lésions qui en découlent.

e. Similitudes phénotypiques des patients porteurs de variants-candidats avec l'APDS

Les APDS sont définis par des mutations d'acteurs directs de la voie PI3K-Akt-mTOR et sont caractérisés par un déficit immunitaire qui se manifeste par des infections sévères, chroniques ou récurrentes, une lympho-prolifération bénigne, des pathologies auto-immunes, des troubles de la croissance, du neurodéveloppement et un risque accru de tumeurs malignes (Nunes-Santos, 2019). Si des HAI ont été décrites dans le phénotype des patients atteints d'APDS, aucun des patients de la cohorte d'étude n'a présenté de signes caractéristiques d'APDS (Elkaim, 2016). L'hépatomégalie et la splénomégalie présentées par les patients porteurs de variants-candidats sont très probablement attribuables à l'HAI.

Il est intéressant de noter que le patient A ($\text{RagC}^{\text{P87T}}$) présentait une candidose persistante depuis l'enfance, infection fongique classiquement observée dans l'APDS. En particulier, aucun patient de la famille F, qui porte pourtant le variant c.889G>A dans *PIK3R1*, n'a de signe caractéristique d'APDS-2.

Concernant les pathologies auto-immunes associées, il est intéressant de remarquer que l'on retrouve la même prévalence de cytopénies auto-immunes dans les cohortes de patients atteints d'APDS (30%) et dans la cohorte d'étude (27%). De plus, certains types d'atteintes observées dans l'APDS correspondent à celles affectant les patients de la cohorte d'étude : thyroïdite auto-immune, syndrome de Gougerot-Sjögren (Nunes-Santos, 2019).

III. Limites et biais

La cohorte d'étude n'est pas parfaitement représentative par rapport à la population cible. Elle correspond plutôt à la population de patients atteints d'HAI de type 2, de survenue précoce, avec un terrain auto-immun familial.

Ces différences peuvent être expliquées par le biais de sélection de la cohorte d'étude. En effet, nous avons sélectionné préférentiellement des patients présentant des pathologies auto-immunes familiales et/ou à début pédiatrique afin de maximiser les chances de trouver une origine génétique sous-tendant la physiopathologie.

De plus, le manque de matériel, en particulier génétique, n'a pas permis d'établir la ségrégation familiale des variants-candidats dans toutes les familles. En outre, certaines données manquantes concernant les apparentés pourraient biaiser les conclusions.

IV. Eléments déclencheurs supplémentaires ?

La petite taille de la cohorte d'étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative dans le nombre de pathologies auto-immunes associées chez les patients porteurs de variants-candidats comparé aux autres, mais ça n'en est pas moins la distinction majeure entre les deux groupes. Le rôle de l'hyperactivité de mTORC1 a été démontré dans de nombreuses pathologies auto-immunes, en particulier médiées par une réponse T. Les résultats obtenus ici abondent en ce sens, et il semble que l'hyperactivité de mTORC1 sous-tende un terrain de poly-auto-immunité, affectant les patients atteints de poly-auto-immunité individuelle et familiale.

Il serait intéressant de rechercher des variants-candidats de la voie mTORC1 dans une plus grande cohorte de patients, afin de déterminer s'ils peuvent être associés à des caractéristiques cliniques, telle que la poly-auto-immunité individuelle et familiale.

La présence des mutations de *LAMTOR1*, *LAMTOR3* et *TSC2* chez des apparentés asymptomatiques justifierait une recherche de facteurs génétiques ou épigénétiques supplémentaires qui pourraient favoriser l'effet pathogène de la mutation chez les patients et au contraire, atténuer ou supprimer cet effet chez les apparentés asymptomatiques.

Il serait également utile d'étudier quel élément déclencheur environnemental aurait pu moduler les conséquences des mutations en réalisant une description comparative des expositions auxquels ont été soumis les patients par rapport aux individus asymptomatiques.

PARTIE 2 : GENETIQUE

I. Première description d'une association entre HAI et variants de la voie mTORC1

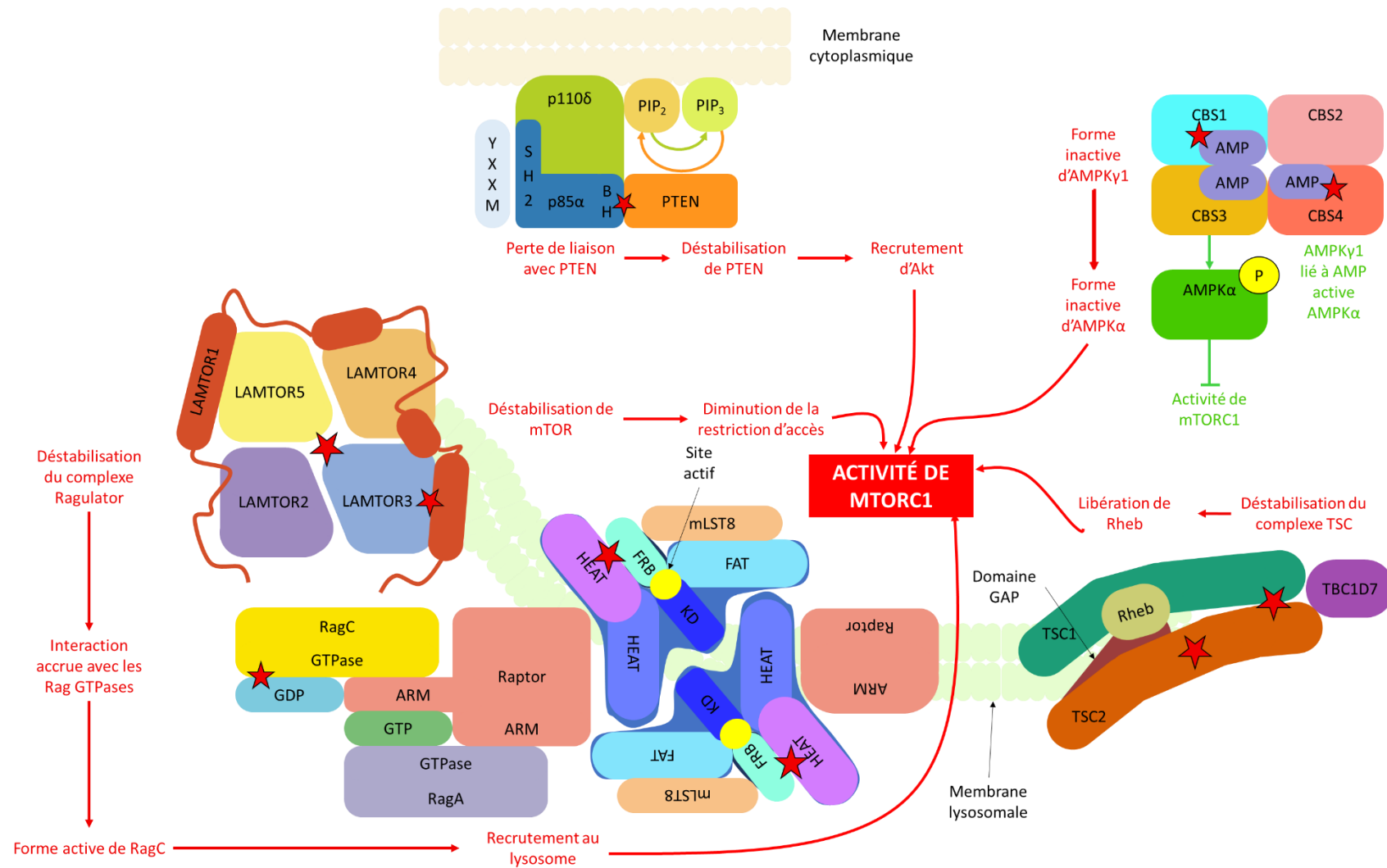
La voie mTORC1 étant un acteur central du métabolisme cellulaire, indispensable à la prolifération et à la différenciation cellulaire et inhibiteur de l'autophagie et de la biogénèse des lysosomes, elle est inévitablement impliquée dans les tumeurs et dans le système immunitaire. Ainsi, chaque gène-candidat joue un rôle d'oncogène (*RRAGC*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *MTOR*) ou de suppresseur de tumeur (*PRKAG1*, *PIK3R1*, *TSC2*) qui correspond à son action sur mTORC1. Les publications mettant en lumière une hyperactivité de mTORC1 dans les pathologies auto-immunes se multiplient (Jung, 2018).

Ce travail décrit pour la première fois l'association des substitutions hétérozygotes germinales de RagC^{P87T}, AMPK γ 1^{V65L/V317M}, LAMTOR1^{R147C}, LAMTOR3^{Y74C}, p85 α ^{E297K}, mTOR^{E285V}, TSC2^{I364V} et TSC2^{I610V} dans une pathologie auto-immune.

De plus, chaque variant-candidat affecte un résidu clé, soit dans les domaines d'activation de la protéine (RagC, AMPK γ 1), soit dans les domaines d'interaction avec leurs partenaires (LAMTOR1, LAMTOR3, p85 α), soit dans les domaines stabilisant la structure de la protéine (mTOR, TSC2).

Au total, l'analyse *in silico* approfondie pour chaque variant soutient l'hypothèse qu'ils conduisent tous à une hyperactivité de mTORC1. Les hypothèses fonctionnelles selon lesquelles les mutations identifiées activent mTORC1 sont résumées dans la Figure 37.

Figure 37. Synthèse des mutations de la voie mTORC1 identifiées dans la cohorte d'étude



La mutation gain-de-fonction autosomique dominante de RagC^{P87T} favoriserait la forme active de RagC chargé avec GDP, la rendant insensible au sevrage en acides aminés, conduisant au recrutement de mTORC1 à la membrane lysosomale et à son activation quel que soit les apports cellulaires. Les mutations gain-de-fonction à pénétrance incomplète de LAMTOR1^{R147C} et LAMTOR3^{Y74C} déstabiliseraient le complexe Ragulator, favorisant son interaction avec les Rag GTPases et l'activation de mTORC1 qui s'ensuit. La mutation gain-de-fonction de mTOR^{E285V} déstabiliserait la structure de mTOR, diminuant la restriction d'accès au site actif du domaine kinase, le rendant plus accessible à ses substrats et favorisant l'activité de mTORC1. Les mutations perte-de-fonction à pénétrance incomplète de TSC2^{I364V} et TSC^{I610V} déstabiliseraient le complexe TSC, au niveau de l'interaction entre TSC1 et TSC2 et de la structure intrinsèque de TSC2, libérant Rheb, favorisant l'activité de mTORC1. Les mutations perte-de-fonction autosomiques récessives d'AMPK γ 1^{V65L/V317M} empêcheraient la liaison à l'AMP des régions CBS 1 et CBS 4, maintenant AMPK γ 1 sous forme inactive, permettant la déphosphorylation d'AMPK α , conservant le complexe AMPK sous forme inactive, favorisant ainsi l'activité de mTORC1. La mutation de p85 α ^{E297K} abolirait une des interactions avec PTEN, déstabilisant la phosphatase lipidique, permettant à PIP₃ de recruter Akt et d'activer mTORC1.

AMP : adénosine monophosphate ; AMPK : AMP-dépendante protéine kinase ; ARM : α -solénoïde/armadillo ; CBS : cystathionine β -synthase ; FAT : domaine d'interaction avec FRAP, ATM et TRAPP ; FRB : FKBP12-rapamycin binding ; HEAT : *Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR* ; KD : kinase domain ; LAMTOR : *late endosomal/lysosomal adaptor MAPK and mTOR activator* ; mLst8 : *mammalian lethal with Sec13 protein 8* ; mTOR : *mammalian or mechanistic target of rapamycin* ; mTORC1 : mTOR complexe 1 ; PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate ; PIP₃ : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate ; PTEN : *Phosphatase and tensin homologue* ; Raptor : *regulatory protein associated with mTOR* ; Rheb : *Ras homolog enriched in brain* ; SH : *Src homology* ; TSC : *tuberous sclerosis complex*

II. Imputabilité des variants-candidats

a. Mutations hétérozygotes germinales faux-sens responsables d'auto-immunité

Les mutations retrouvées sont toutes germinales hétérozygotes faux-sens (aboutissant à une substitution d'acide aminé). La responsabilité de ce type de mutation dans la pathogénèse de pathologies auto-immunes est retrouvée dans un certain nombre de syndromes monogéniques auto-immuns et dans les APDS (Nunes-Santos, 2019).

Des substitutions de ce type ont été mises en cause dès l'identification de l'haplo-insuffisance en CTLA-4 (Kuehn, 2014). Dans une cohorte franco-belge de patients atteints de déficits en GATA2, syndrome associant une prédisposition à la leucémie, un déficit immunitaire et/ou un lymphoedème, la moitié portaient des substitutions hétérozygotes d'acide aminé (Donadieu, 2018). Des substitutions hétérozygotes de *STAT1* sont impliquées dans la candidose cutanéomuqueuse chronique due à une altération de l'immunité IL-17 (Liu, 2011). Des substitutions hétérozygotes gain-de-fonction ont été identifiées dans *PLCG2* comme responsables d'un syndrome associant une auto-inflammation, un déficit commun immun variable et une dysrégulation globale de l'immunité (Novice, 2020). Un autre syndrome de déficit immunitaire combiné a été associé à des substitutions hétérozygotes germinales de *IKZF1* avec un effet dominant-négatif (Boutboul, 2018). De la même manière, des substitutions hétérozygotes germinales perte-de-fonction de *CARD11* ont été retrouvées dans 4 familles de patients atteints de dermatite atopique sévère. *CARD11* appartient au complexe CBM, constitué de *CARD11-BCL10-MALT1*, qui intervient dans la signalisation du TCR et peut activer mTORC1. De ce fait, les auteurs ont étudié l'activation de mTORC1 chez ces patients et ont mis en évidence une diminution de la phosphorylation de S6. Cette donnée corrobore le rôle de mTORC1 dans la balance T_H1/T_H2 . Son activité favorise la différenciation en T_H1 , tandis que son inactivité favorise la différenciation en T_H2 , qui promeut une réponse allergique prédominante dans la dermatite atopique sévère (Ma, 2017).

Il est intéressant de noter que la plupart des mutations responsables d'APDS-1 sont causées par des substitutions hétérozygotes d'acide aminé (Lucas, 2014).

b. Rôle des gènes-candidats dans les cancers

i. Mutations somatiques

Chaque gène-candidat joue un rôle d'oncogène (*RRAGC*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *MTOR*) ou de suppresseur de tumeur (*PRKAG1*, *PIK3R1*, *TSC2*) selon son action sur mTORC1.

Ainsi, la littérature retrouve des centaines de mutations somatiques pour chacun des gènes-candidats dans différents cancers, dont la plupart sont des substitutions faux-sens (COSMIC). Le Tableau 13 résume le nombre de mutations somatiques par gène-candidat et leurs répartitions dans les différentes tumeurs malignes.

Il est intéressant de noter que certains variants-candidats retrouvés dans ce travail ont été décrits en tant que mutation somatique dans différents cancers. La mutation p.Arg147Cys retrouvée dans *LAMTOR1* a été décrite dans les carcinomes colo-rectaux (Giannakis, 2016). La délétion de l'acide glutamique en position 285 de mTOR a été retrouvée dans les cancers colorectaux (Liu, 2018). Le variant c.889G>A de *PIK3R1* a été décrit dans le carcinome mammaire à récepteurs hormonaux (Griffith, 2018). L'isoleucine en position 364 substituée pour la patiente G (*TSC2*^{I364V}) est échangée pour une phénylalanine dans les carcinomes mammaires avec différenciation neuro-endocrine (Marchiò, 2017).

En revanche, les mutations identifiées dans *PRKAG1* affectent des résidus non encore décrits. Les lymphomes folliculaires présentent un enrichissement spécifique en mutations somatiques de *RRAGC*, réunies dans le domaine GTPase de la protéine, en particulier autour des résidus 75 à 118 (Okosun, 2016). Ainsi, la mutation RagC^{P87T} est située dans le hotspot décrit dans la littérature.

Le mécanisme sous-tendant le risque tumoral de ces mutations somatiques semble reposer sur une hyperactivité de mTORC1. En effet, un gain-de-fonction de mTOR provoqué par des mutations somatiques de *mTOR* a été décrit dans différents cancers (Sato, 2010). Des mutations gain-de-fonction ponctuelles conduisant à des substitutions faux-sens dans les domaines HEAT, FAT et kinase de mTOR provoquaient une progression tumorale rapide (Murugan, 2013). Les mutations perte-de-fonction de *TSC2* sont fréquentes chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. Elles conduisent à une augmentation de l'activité de mTORC1 et rendent les tumeurs sensibles aux inhibiteurs de mTOR (Huynh, 2015).

Tableau 13. Mutations somatiques des gènes-candidats dans les cancers

	<i>RRAGC</i>	<i>PRKAG1</i>	<i>LAMTOR1</i>	<i>LAMTOR3</i>	<i>MTOR</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TSC2</i>
Total de mutations somatiques	258	340	108	172	2759	2034	2319
Glandes surrénales		+				+	+
Système nerveux autonome						+	+
Voies biliaires	+	+	+	+	+	+	+
Os	+	+			+	+	+
Seins	+	+	+	+	+	+	+
Système nerveux central	+	+	+	+	+	+	+
Col de l'utérus	+	+	+		+	+	+
Endomètre	+	+	+	+	+	+	
Œil					+		
Trompes de Fallope					+		
Voies génitales					+		
Système hématopoïétique et lymphoïde	+	+	+	+	+	+	+
Rein	+	+	+	+	+	+	+
Côlon	+	+	+	+	+	+	+
Foie	+	+			+	+	+
Poumon	+	+	+	+	+	+	+
Méninges					+	+	+
Œsophage	+	+	+	+	+	+	+
Ovaires	+	+	+	+	+	+	+
Pancréas	+	+	+	+	+	+	+
Parathyroïde					+	+	+
Pénis					+	+	
Péritoine					+		+
Tige pituitaire							+
Placenta							+
Plèvre	+	+				+	+
Prostate	+	+	+	+	+	+	+
Glandes salivaires					+	+	+
Peau	+	+	+	+	+	+	+
Intestin grêle					+	+	+
Tissus mous	+	+	+		+	+	+
Estomac	+	+	+	+	+	+	+
Testicules					+	+	+
Thymus							+
Thyroïde	+	+	+	+	+	+	+
Voies aérodigestives supérieures	+	+	+	+	+	+	+
Voies urinaires	+	+		+	+	+	+
Vulve					+		

ii. Polymorphismes

Au-delà des mutations somatiques, certains polymorphismes des gènes-candidats (*PRKAG1*, *LAMTOR3*, *PIK3R1*) ont été identifiés comme biomarqueur ou facteur de risque dans différents cancers.

Ainsi, une méta-analyse a démontré une association entre un polymorphisme de *PRKAG1* et un pronostic défavorable dans les cancers colorectaux métastatiques sous chimiothérapie (Tokunaga, 2019). Des polymorphismes de *LAMTOR3* ont été identifiés en association avec les cancers du sein et les cancers gastriques (De Araujo, 2013 ; Song, 2015). Les polymorphismes germinaux de *PIK3R1* font également l'objet d'études dans le domaine des cancers. En particulier, le variant p.Met326Ile augmente le risque de développement de cancer colorectal et est associée à un pronostic sombre dans les glioblastomes (Li, 2008 ; Otani, 2017).

iii. Expression dérégulée

Non seulement des mutations somatiques et des polymorphismes des gènes-candidats sont impliqués dans les cancers, mais une dérégulation de leur expression a également été documentée dans la littérature.

Dans les cancers du col de l'utérus, la surexpression de l'ARN antisens de *PRKAG1* était associée à un pronostic plus sombre pour les patients (Liu, 2019).

Øverbye *et al* ont montré que les protéines LAMTOR étaient distinctivement enrichies dans les échantillons de patients atteints de cancer de la prostate avec une très haute sensibilité, en faisant ainsi de potentiels biomarqueurs (Øverbye, 2015). LAMTOR3, aussi appelé MEK partner-1 (MP-1), intervient dans la voie MEK-ERK : elle les active en les phosphorylant. Ce mécanisme a été démontré comme nécessaire à la prolifération des cellules tumorales pancréatiques et dérégulé dans les tumeurs sporadiques des parathyroïdes (Jun, 2013 ; Arya, 2020).

La dérégulation de PI3Kδ est un événement fréquent dans les cancers. *PIK3R1* est l'isoforme dominant de la sous-unité régulatrice p85. Elle présente une fonction de suppression de tumeur, et les mutations qui l'affectent correspondent à des pertes de fonction (Vallejo-Diaz, 2019).

c. Rôle des gènes-candidats dans les pathologies immunitaires

i. Syndrome APDS-2

Le syndrome APDS-2 est provoqué par des mutations autosomales dominantes perte-de-fonction du gène-candidat *PIK3R1*. Les patients atteints de syndrome APDS-2 présentent sensiblement les mêmes caractéristiques cliniques que les patients atteints de syndrome APDS-1, causé par des mutations autosomales dominantes gain-de-fonction de *PIK3CD*, associant un déficit immunitaire, une lymphoprolifération, des manifestations auto-immunes, un retard de développement et éventuellement de croissance. Cela suggère que les mutations responsables provoquent une hyperactivation aberrante de PI3Kδ quel que soit le gène affecté (Thouenon, 2021).

La plupart des mutations responsables d'APDS-2 affectent les sites donneurs ou accepteurs d'épissage de l'exon 11, générant un produit d'épissage alternatif dans lequel l'exon 11 est supprimé, produisant une protéine raccourcie perdant une partie du domaine SH2 2. Une mutation faux-sens a été décrite chez un patient APDS-2, ainsi qu'une délétion de deux nucléotides (Moreno-Corona, 2021). Deux cas de patients portant une mutation homozygote de *PIK3R1* générant un codon stop prématuré entraînant la perte de p85α et une diminution majeure de l'expression de p110δ ont été rapporté. Ces patients présentent des pneumonies récidivantes associées à une agammaglobulinémie et une lymphopénie B sévère par blocage précoce du développement des lymphocytes B (Conley, 2012 ; Tang, 2018). Récemment, une mutation hétérozygote de *PIK3R1* dans la région responsable d'APDS-2 a été mise en cause dans le déficit immunitaire commun variable (de Valles-Ibanez, 2018).

Le variant-candidat c.889G>A de *PIK3R1* identifié dans ce travail est une mutation faux-sens qui ne correspond pas aux sites habituels mis en cause dans l'APDS-2. Cela suggère un mécanisme moléculaire différent, qui aboutit néanmoins à une hyperactivité de mTORC1, révélée par l'hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes T et B, retrouvée chez les patients de l'étude et dans les syndromes APDS, avec les manifestations auto-immunes comme phénotype commun.

ii. Sclérose tubéreuse de Bourneville et auto-immunité

Les mutations des gènes codant pour le complexe TSC sont connues pour provoquer la sclérose tubéreuse de Bourneville. Un patient atteint de sclérose tubéreuse de Bourneville développant un lupus érythémateux systémique fulminant a été décrit. De plus, toutes les sous-populations lymphocytaires de ce patient présentaient une activation majeure de mTORC1 (Singh, 2013).

Ces résultats corroborent les données de ce travail : au moins une pathologie auto-immune et une activation majeure de mTORC1 sont liées à une mutation de *TSC2*.

iii. Facteur de risque d'auto-immunité

Un polymorphisme de *LAMTOR3* a été identifié comme facteur de risque de développer un lupus érythémateux systémique. Une augmentation de la fonction de LAMTOR3 en tant que cible d'aval de la signalisation du BCR a été suggérée comme responsable des réactions altérées des lymphocytes B impliquées dans le lupus érythémateux systémique (Wilbe, 2015).

Cela soutient les résultats de ce travail impliquant LAMTOR3 dans la régulation de l'auto-immunité chez les patients atteints d'HAI.

iv. Modèle murin

Le gène-candidat *PRKAG1* code pour la sous-unité régulatrice du complexe AMPK. L'injection de Con A inhibe la phosphorylation du complexe AMPK dans le foie des souris, suggérant une inhibition de l'activation d'AMPK dans l'hépatite induite par la ConA (Desta, 2020).

Ce mécanisme renforce les données de ce travail démontrant le rôle de l'inhibition d'AMPK et donc de l'hyperactivité de mTORC1 dans l'HAI.

d. Rôle des gènes-candidats dans d'autres pathologies

A l'exception de *PRKAG1*, les autres gènes-candidats ont déjà été décrits comme responsables ou du moins impliqués dans diverses pathologies humaines.

i. RRAGC

1. Cardiomyopathie dilatée

Le séquençage complet de l'exome a révélé une mutation hétérozygote gain-de-fonction de *RRAGC* conduisant à une substitution faux-sens en position 75 chez deux patients atteints de cardiomyopathie dilatée (Long, 2016 ; Long, 2017). Les auteurs évoquent une convergence de la voie RAS-MAPK et de la voie Akt-mTORC1 qui expliquerait le rôle d'un gain-de-fonction de *RRAGC* dans la pathogénèse des cardiomyopathies dilatées (Long, 2016).

Les mutations identifiées par Long *et al* ont permis d'élucider, au moins partiellement, les mécanismes moléculaires en jeu dans le gain-de-fonction de RagC provoquant l'hyperactivité de mTORC1 : la substitution favorise la forme active de RagC et ainsi l'activité de mTORC1.

2. Maladie d'Alzheimer

Le niveau d'expression de RagC a été retrouvé comme significativement plus élevé dans les tissus cérébraux hippocampiques des patients atteints de pathologie d'Alzheimer comparé aux individus sains, indiquant un rôle de l'hyperactivité de mTORC1 dans cette pathologie (Sun, 2014).

3. Syndrome de Birt-Hogg-Dubé

Le syndrome de Birt-Hogg-Dubé est caractérisé par des tumeurs cutanées bénignes, des kystes pulmonaires et rénaux et un carcinome des cellules rénales. Il est causé par des mutations perte-de-fonction de la folliculine, inhibiteur de RagC, conduisant à l'hyperactivité de mTORC1 (Napolitano, 2020).

Ces données corréleront le niveaux d'expression de RagC avec l'activité de mTORC1, et apportent un argument supplémentaire au rôle majeur de RagC dans la régulation de l'activité de mTORC1 et à l'impact pathogénique délétère de mutations de *RRAGC*.

ii. LAMTOR1

Aucune mutation de *LAMTOR1* n'a été décrite comme responsable de pathologie humaine. Cependant, son implication a été retrouvée dans différents systèmes décrits succinctement ci-après.

1. Atteinte hépatique

La délétion spécifique de LAMTOR1 dans les macrophages a mis en évidence une résistance à l'obésité induite par un régime enrichi en graisses, à la stéatose lipidique et aux pathologies liées au métabolisme du glucose, avec des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires. Les marquages montraient une accumulation des monocytes, des macrophages et des cellules de Kupffer avec une réduction de leur tolérance aux lipides, dans les foies des souris. Ces résultats soulignent le rôle de LAMTOR1 dans les macrophages, et en particulier dans les cellules de Kupffer, interconnectant les voies métaboliques et immunitaires (Ying, 2021).

2. Atteinte pancréatique

La délétion de LAMTOR1 dans les cellules β du pancréas conduisait à une augmentation de la sécrétion d'insuline après stimulation par le glucose dans le modèle murin (Huang, 2020).

3. Atteinte digestive

L'étude de la fonction de LAMTOR1 dans l'épithélium intestinal a conduit Ito *et al* à générer un modèle murin dans lequel les cellules produisant la mucine protectrice étaient significativement réduites (Ito, 2020).

4. Atteinte cutanée

La délétion spécifique de LAMTOR1 dans les cellules épidermiques de souris conduisent à de graves défauts de la formation de la couche cornée avec un décès prématuré dans les 12 heures suivant la naissance par la perte de la fonction barrière de la peau. L'analyse au niveau cellulaire a montré que cette conséquence extrême est liée à un dysfonctionnement lysosomal majeur avec accumulation de lysosomes et d'autophagosomes immatures dans les cellules épidermiques (Soma-Nagae, 2013).

5. Atteinte neurologique

Au cours de l'étude de pathologies neurodéveloppementales, Sun *et al* ont mis en évidence le rôle de la régulation de LAMTOR1 avec l'activité subséquente de mTORC1 dans la plasticité synaptique, le développement des dendrites neuronales, dans les apprentissages et la mémoire (Sun, 2018).

iii. *LAMTOR3*: Amylose

Le complexe Ragulator, en particulier LAMTOR2, LAMTOR3 et LAMTOR4, joue un rôle majeur dans l'augmentation de la phagocytose de la microglie dans l'amylose par la régulation de l'activité lysosomale. La perte de fonction de Ragulator inhibe la digestion phagocytaire. Ma *et al* ont montré une augmentation de l'expression de LAMTOR3 et de l'activité du complexe Ragulator dans le modèle murin d'amylose (Ma, 2021).

Ces données renforcent le rôle crucial de Ragulator dans la régulation de l'activité lysosomale.

iv. *mTOR*

1. Syndrome de Smith-Kingsmore

Plusieurs mutations germinales hétérozygotes *de novo* ont été identifiées dans le gène *mTOR* dans le syndrome de Smith-Kingsmore, en particulier dans le domaine FAT. Des mutations somatiques de *mTOR* ont été détectées dans les dysplasies corticales focales de type II, elles aussi situées dans le domaine FAT et dans le domaine kinase de la protéine. L'étude fonctionnelle de ces mutations a montré une activation constitutive de mTOR (Murugan, 2019). Récemment, un phénotype chevauchants associant le syndrome de Smith-Kingsmore et syndrome des anti-phospholipides a été décrit (Rodríguez-García, 2019).

2. Atteintes neuro-psychiatriques

La voie mTORC1 a été impliquée dans la pathologie d'Alzheimer ; et il semble qu'une activité anormalement basse de mTORC1 puisse contribuer à la dépression clinique (Valvezan, 2019).

3. Syndrome métabolique

La voie mTORC1 est généralement peu active dans les tissus mammifères mais est capable de répondre immédiatement à l'apport de nutriments dans les tissus métaboliques primaires (comme le foie, le muscle et les tissus adipeux), probablement en réponse aux effets combinés de la signalisation par les nutriments des Rag GTPase et de la signalisation par l'insuline par Rheb. Dans des conditions de surcharge en nutriments et d'obésité, la voie mTOR devient active de façon plus chronique dans ces tissus et, par des mécanismes de rétrocontrôle inhibiteurs, pourrait contribuer au développement de la résistance à l'insuline, caractéristique du diabète de type 2 (Valvezan, 2019).

v. *PIK3R1*: Syndrome SHORT

Des mutations germinales de la partie C-terminale de *PIK3R1* ont été associées avec le syndrome SHORT, caractérisé par une petite taille, une hyperlaxité des articulations ou des hernies, une dépression oculaire, une anomalie de Rieger et des retards dans l'éruption dentaire. D'autres manifestations incluent la résistance à l'insuline avec une lipoatrophie et un faciès caractéristique. L'association d'un syndrome SHORT et d'une leucémie a été rapportée dans un cas clinique suggérant le rôle du domaine SH2 2 dans la prédisposition à la leucémie (Marzollo, 2020).

Contrairement au syndrome APDS, le syndrome SHORT présente une diminution de l'activité de la signalisation PI3Kδ (Moreno-Corona, 2021).

Ces données montrent que selon leur localisation et leurs conséquences moléculaires, les mutations de *PIK3R1* peuvent avoir des conséquences très différentes, allant du syndrome APDS associé à une augmentation de l'activité de la voie PI3K-Akt-mTOR au syndrome SHORT associé à une diminution de celle-ci.

vi. *TSC2*

1. Dysplasie corticale focale

L'analyse des bases moléculaires d'une cohorte de patients présentant une épilepsie réfractaire sévère pédiatrique révèlent des mutations perte-de-fonction germinales et somatiques de *TSC2* associées aux diagnostics de dysplasie corticale focale et d'hémimégalencéphalie (Baldassari, 2019).

2. Lymphangioléiomyomatose

La lymphangioléiomyomatose est une pathologie néoplasique évolutive rare caractérisée par des kystes diffus dans les poumons et des angiomyolipomes dans les reins. Elle est due à des mutations perte-de-fonction de *TSC1* ou *TSC2* par l'hyperactivation de la voie mTOR (Xu, 2020). Dans la lymphangioléiomyomatose, les lymphocytes T déficientes en *TSC2* surexprime PD-1, contrant ainsi l'immunité anti-tumorale (Liu, 2018).

3. Sclérose tubéreuse de Bourneville

La sclérose tubéreuse de Bourneville est une pathologie autosomique dominante causée par des mutations perte-de-fonction des gènes suppresseurs de tumeur *TSC1* ou *TSC2*. Les deux tiers des patients portent des mutations germinales *de novo*. Les mutations de *TSC2* ont été identifiées chez environ 70% des patients avec un diagnostic clinique de sclérose tubéreuse de Bourneville. Elles sont dispersées sur l'ensemble des régions codantes, à l'exception des exons 25 et 31, et sont pour la plupart des mutations faux-sens. La sclérose tubéreuse de Bourneville satisfait au modèle des « two-hit » des gènes suppresseurs de tumeur, avec une mutation germinale inactivant un allèle de *TSC2* et un événement somatique (souvent une perte d'hétérozygotie) inactivant l'autre allèle (Henske, 2016). En plus de tumeurs diffuses, jusqu'à 90% des patients atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville présentent une épilepsie, débutant généralement dans l'enfance, et l'expérience clinique montre que les inhibiteurs de mTOR peuvent réduire les crises dans cette population. De plus, ces patients présentent aussi divers troubles neuropsychiatriques, incluant des troubles du spectre autistique (Valvezan, 2019).

L'absence de hot-spot caractéristique pour les mutations de *TSC2* confirme la fragilité de la structure du complexe TSC, et soutient l'hypothèse retenue pour les variants p.Ile364Val et p.Ile610Val identifiés dans ce travail de déstabilisation du complexe TSC, libérant Rheb. De plus, le modèle « two-hit » pourrait expliquer les différences phénotypiques entre les patients de l'étude et les patients atteints de sclérose tubéreuse de Bourneville. En effet, le deuxième événement pourrait survenir uniquement dans certaines populations cellulaires de façon somatique.

e. Mécanismes putatifs d'hyperactivité de mTORC1

i. *RRAGC*

Les deux équipes précédemment citées se sont attachées à élucider le mécanisme d'action par lequel les mutations de *RRAGC* entraînent directement une hyperactivité de mTORC1. Okosun *et al* ont démontré que ces mutations rendent l'activité de mTORC1 insensible au sevrage en acides aminés, générant ainsi une hyperactivité de mTORC1 (Okosun, 2016). Long *et al* ont mis en évidence que la mutation Ser75Tyr de *RRAGC* entraînait une dissociation des interactions avec le ligand et augmentait le statut lié à GDP (Long, 2016). Or, quand RagC est chargé avec un GDP, et que RagA est chargé avec un GTP, l'hétérodimère interagit avec Raptor pour recruter mTORC1 à la membrane lysosomale (Tafur, 2020).

Ces données confirment l'hypothèse fonctionnelle retenue pour le variant-candidat p.Pro87Thr de RagC et renforcent l'hypothèse de causalité entre la mutation, le gain-de-fonction de RagC et l'hyperactivité de la voie mTORC1 observée dans les cellules du patient porteur de la mutation RagC^{P87T}.

ii. PRKAG1

PRKAG1 code pour la sous-unité AMPK γ 1 du complexe AMPK, qui comprend 4 domaines CBS, dont seuls les sites 1, 3 et 4 peuvent lier l'AMP et uniquement CBS-3 interagit avec la sous-unité α , interaction directement modulée par l'AMP et l'ATP. CBS 4 lie l'AMP avec une forte affinité et est peu prompt à l'échanger dans des conditions physiologiques. Néanmoins, des mutations dans CBS4 peuvent abolir la régulation par l'AMP, tandis que des mutations dans CBS1 conduisent à peu ou pas d'effet sur la régulation d'AMPK. Il est important de noter que les phosphates des nucléotides d'adénine lié à CBS 1, 3 et 4 lient de façon coordonnée un groupe d'acides aminés chargés et polarisés, de façon à ce que la liaison à un site affecte la liaison aux deux autres sites. Ainsi, la liaison de l'AMP à CBS4 stabilise la liaison à l'AMP des deux autres sites, et inversement (Yan, 2018).

Ces données renforcent l'hypothèse fonctionnelle retenue pour les variants-candidats p.Val65Leu et p.Val317Met de *PRKAG1* selon laquelle leur taille perturbe la liaison à l'AMP, empêchant l'activation du complexe AMPK en cas de stress énergétique. Ainsi, la perte-de-fonction d'AMPK γ 1 inhiberait l'inhibiteur AMPK de mTORC1, conduisant à une activité inadaptée et excessive de mTORC1 en condition de sevrage. Cette hyperactivité est retrouvée dans les résultats de ce travail, confortant l'hypothèse de causalité entre les mutations de *PRKAG1*, la perte-de-fonction d'AMPK et l'hyperactivité de mTORC1.

iii. LAMTOR1 et LAMTOR3

Le complexe Ragulator est formé de deux hétérodimères, l'un contenant LAMTOR2 et LAMTOR3 et l'autre LAMTOR4 et LAMTOR5, entourés par LAMTOR1. L'activation de mTORC1 par les acides aminés requiert une protéine LAMTOR1 parfaitement fonctionnelle (Yonehara, 2017). LAMTOR1 forme une plateforme où se rejoignent plusieurs voies de signalisation qui fonctionnent via les endosomes et les lysosomes.

L'importance de LAMTOR1 réside dans sa fonction d'assemblage des protéines du complexe Ragulator, de stabilisation de l'ancrage à la membrane lysosomale, de recrutement et de stabilisation des Rag GTPases par sa partie C-terminale. La stabilisation des Rag GTPases dépend notamment de l'interaction entre RagC et les composants LAMTOR1 et LAMTOR3 de Ragulator, par le domaine C-terminal de RagC sans contact avec sa région GTPase et le domaine N-terminal de LAMTOR1 (de Araujo, 2017). Les études structurales ont montré qu'il existait une souplesse physiologique du complexe, sans que cette caractéristique ait été reliée à une activation ou une inhibition de l'ancrage de Ragulator au lysosome ou de son interaction avec ses ligands (Su, 2017).

L'interaction entre LAMTOR1 et LAMTOR3 implique les résidus de 84 à 102 de LAMTOR1 et les résidus de 2 à 8, de 26 à 30 et de 116 à 121 de LAMTOR3 (de Araujo, 2017). Il est intéressant de remarquer que le variant p.Arg147Cys est situé dans une région particulièrement conservée des résidus 123 à 149 dans le domaine C-terminal de la protéine, région essentielle dans l'activation de mTORC1 par la voie des Rag GTPases (Su, 2017). En particulier, le résidu arginine en position 147 est directement impliqué dans la liaison avec LAMTOR3 (Yonehara, 2017). De plus la région 55 à 74 de LAMTOR3 est impliquée dans l'hétérodimérisation avec LAMTOR2 et forme une large surface exposée aux Rag GTPases (Su, 2017).

Ces données structurales soutiennent l'hypothèse fonctionnelle retenue pour les variants-candidats de *LAMTOR1* et *LAMTOR3* selon laquelle ces mutations pourraient conduire à un gain-de-fonction du complexe Ragulator, provoquant l'hyperactivité de mTORC1 observée dans les cellules des patients.

iv. MTOR

Le site actif de liaison aux substrats de mTOR forme une poche dans laquelle s'alignent 3 résidus aromatiques, cohérents avec les deux classes de substrats de mTORC1 : 4E-BP1 et S6K1. Ce site forme un V, avec du côté N-terminal le domaine FRB et du côté C-terminal le partenaire mLST8. L'accès du substrat au site actif du domaine kinase est ainsi restreint des deux côtés. Il est possible que le domaine FRB de mTOR interagisse avec les substrats pour le recruter au site actif. Des mutations ponctuelles conduisant à des substitutions d'acides aminés entraînent un gain-de-fonction de mTOR au sein du complexe mTORC1 en assouplissant la structure du site actif, favorisant ainsi le contact avec les substrats (Yang, 2013).

D'un côté du complexe mTORC1, on peut observer le site actif avec le domaine kinase de mTOR et la sous-unité mLST8. Sur la face opposée du complexe mTORC1, se situe le domaine de répétitions de HEAT de mTOR. Raptor se lie aux domaines de répétitions HEAT, qui sont avantageusement orientés vers l'environnement, évoquant un rôle prédominant dans la liaison aux régulateurs de mTOR. L'homodimérisation de mTOR retrouvée dans le complexe mTORC1 dépend du pont réalisé par les domaines de répétitions de HEAT d'une protéine avec les domaines kinases de l'autre protéine. Raptor est nécessaire à la formation du complexe mTORC1, en stabilisant les ponts formés par les domaines de répétitions de HEAT de mTOR. De plus, Raptor peut restreindre davantage l'accès au site actif (Aylett, 2016).

Ainsi, la moindre déstabilisation pourrait favoriser l'accès du site actif au substrat, et une seule mutation pourrait suffire compte tenu de la conformation en dimères de mTOR au sein de mTORC1. Ces informations renforcent l'hypothèse fonctionnelle selon laquelle la mutation p.Glu285Val de *mTOR* serait gain-de-fonction et conduirait à une hyperactivité de mTORC1, bien que celle-ci n'ait pu être mise en évidence par manque de matériel cellulaire.

v. *PIK3R1*

Les mutations de *PIK3R1* peuvent activer PI3K δ par des troncatures oncogéniques du domaine SH2 2 ; ou inhiber PI3K δ par des mutations dans le domaine SH2 1 (Dornan, 2020).

Le domaine Rho-GAP, aussi appelé BH, correspond à un segment conservé de 200 résidus, retrouvés dans un large groupe de protéines dont certaines ont une activité GAP caractérisée pour les membres de la sous-famille Rho, qui participent à l'organisation du cytosquelette et dans certaines voies de signalisation. Dans la protéine p85 α , ce domaine lie une protéine G, ce qui entraîne l'activation de p110 δ (Musacchio, 1996).

La sous-unité p85 α stabilise et stimule PTEN, cette phosphatase lipidique qui inhibe l'activation de la voie PI3K-Akt-mTORC1. L'étude structurale de la liaison entre PTEN et p85 α a mis en évidence les propriétés de liaison du domaine Rho-GAP de p85 α . Il est intéressant de remarquer que le résidu en position 297 intervient dans les contacts entre les PTEN et p85 α . L'acide glutamique forme un lien avec l'arginine en position 189 de PTEN (Marshall, 2018).

Les mutations de *PTEN* et de *PIK3R1* impliquées dans l'APDS-L et l'APDS-2, respectivement, sont autosomales dominantes négatives, ainsi que celles responsables de syndromes d'hypercroissance et de prolifération tumorale (Tsuji, 2016 ; Asano, 2018 ; Hillmann, 2019).

Ces données soutiennent l'hypothèse de travail selon laquelle la mutation identifiée p.Glu297Lys serait responsable d'une perte-de-fonction de *PTEN*, provoquant une hyperactivité de mTORC1, bien que celle-ci n'ait pu être mise en évidence par manque de matériel cellulaire.

vi. TSC2

Par son activité GAP pour Rheb, activateur direct de mTORC1, la convertissant de sa forme active liée au GTP à sa forme inactive liée au GDP, TSC2 est un inhibiteur de mTORC1. De nombreuses mutations faux-sens affectant tous les domaines de TSC2 peuvent entraîner une dissociation du complexe TSC, conduisant à une perte de sa fonction inhibitrice. La région N-terminale interagissant avec TSC1 est stabilisée par des interactions hydrophobes entre chaque hélice. Le domaine tubérine de TSC2 maintient la structure de la protéine et donc du complexe TSC entier (Sudarshan, 2019 ; Yang, 2021).

Ces informations structurelles renforcent l'hypothèse de travail selon laquelle les mutations p.Iso364Val et Iso610Val de *TSC2* seraient perte-de-fonction pour TSC2, conduisant à une hyperactivité de mTORC1 retrouvée dans les cellules des patientes atteintes.

III. Preuves expérimentales des mécanismes en jeu ?

Si l'analyse exhaustive de la littérature propose un rationnel solide à l'impact moléculaire des variants-candidats sur l'activité de la voie mTORC1, des études supplémentaires sont nécessaires pour faire la preuve expérimentale du mécanisme.

a. Analyses envisageables

Des analyses de cristallographie et/ou microscopie électronique permettraient de décrire les modifications structurales, en particulier pour mTOR et TSC2, où la déstabilisation de la structure semble être le mécanisme-clé du gain-de-fonction de l'un et de la perte-de-fonction de l'autre.

Des analyses de co-immunoprécipitation seraient intéressantes pour démontrer le gain d'interaction entre Ragulator et RagC dans les mutations de LAMTOR1 et LAMTOR3. Elles permettraient aussi de démontrer la perte d'interaction entre p85 α et PTEN.

Enfin, l'analyse spécifique de l'activation directe de RagC et AMPK γ 1 par les tests dédiés à chaque protéine permettrait d'établir si les variants-candidats conduisent à un gain-de-fonction (dans le cas de RagC) ou à une perte-de-fonction (dans le cas d'AMPK γ 1).

Ainsi, il serait possible d'étudier la charge de GDP de RagC, en analysant le ratio GTP-GDP et d'analyser la liaison d'AMPK γ 1 à l'AMP. Ces recherches pourraient être conduites dans les cellules primaires de chaque patient.

b. Modèles cellulaires

Des modèles cellulaires dédiés à chaque gène devraient servir à mettre en évidence le rôle pathogène des variants-candidats.

Ainsi, pour RagC, LAMTOR1 et LAMTOR3, des cellules surexprimant la forme mutée de RagC pourraient être utilisées. Il serait intéressant d'infecter des lymphoblastes avec des lentivirus portant le cDNA muté et de réaliser les expériences sur les lymphoblastes triés exprimant le cDNA muté.

L'hypothèse fonctionnelle pour AMPK γ 1 est très différente, de par la concomitance d'un variant sur chaque allèle, et par sa perte de fonction. Plusieurs approches sont envisageables : utiliser des cellules surexprimant chacune des formes mutées d'AMPK γ 1 ; compléter les cellules du patient avec une forme sauvage d'AMPK γ 1 ; supprimer l'expression d'AMPK γ 1 dans des cellules.

Concernant mTOR et TSC2, la taille des gènes permet difficilement de les intégrer dans un vecteur lentiviral pour infecter des lymphoblastes et étudier la stabilité des protéines. L'approche par CRISPR-Cas9 serait indiquée dans ces deux situations, afin de cibler chaque mutation ponctuelle et de modifier le nucléotide, générant ainsi des modèles cellulaires exploitables.

Par sa taille, le gène *PIK3R1* pourrait être étudié soit par l'infection de cellules par vecteur lentiviral ; soit par l'utilisation de la technique CRISPR-Cas9.

c. Types cellulaires

mTORC1 a des effets distincts selon les types cellulaires.

Dans un premier temps, il serait utile de déterminer son activité dans les cellules immunitaires, afin de mettre en évidence une éventuelle hyperactivité dans cette population cellulaire qui sous-tendrait l'apparition de l'auto-immunité.

Dans un second temps, il serait intéressant d'explorer l'effet des mutations dans les autres types cellulaires et en particulier dans les hépatocytes. Notamment, on pourrait observer l'expression des différents acteurs de la voie mTORC1 et son activité par le marquage en immunohistochimie ou en western-blot sur les protéines extraites des tissus digérés sur des biopsies hépatiques congelées.

PARTIE 3 : PROFIL IMMUNITAIRE

I. Anomalies pro-inflammatoires des patients atteints d'HAI portant des variants-candidats

a. Immuno-phénotypage lymphocytaire normal

La prédominance de lymphocytes T naïfs CD25⁺CD45RA⁺ chez les patients porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains pourrait être expliquée par la différence d'âge entre les deux groupes, d'autant que cette anomalie n'est pas rapportée dans la littérature. Il est également à noter que les patients étaient sous traitement tandis que les individus sains non.

De plus, contrairement aux patients atteints d'APDS, aucune lymphopénie B ni hypogammaglobulinémie n'est observée dans les patients porteurs de variants-candidats.

Ainsi, aucune différence n'a pu être mise en évidence sur le phénotypage global des lymphocytes circulants entre les patients et les individus sains.

b. Lymphocytes T régulateurs altérés

La proportion et les nombres absolus de T_{REG} sont dans les normes par rapport aux individus sains, mais ce résultat est à pondérer par le fait que tous les patients étaient sous traitement par corticoïdes et azathioprine au moment des prélèvements. Or, il a été rapporté que le traitement immunosuppresseur permettait de restaurer des nombres absolus et une proportion de T_{REG} proche des normes (Longhi, 2005).

Aucune étude publiée n'examine spécifiquement l'expression des marqueurs des T_{REG} dans les lymphocytes de patients atteints d'HAI. Il est possible que la restauration de nombre et de la fonction des Treg reste limitée et n'aboutisse pas à une expression normale de FoxP3, Helios, et en particulier de CTLA-4.

c. Profil cytokinique pro-inflammatoire

Les patients porteurs de variants-candidats présentaient des niveaux plus élevés de nombreuses cytokines pro-inflammatoires comparé aux autres patients atteints d'HAI et de façon significative comparé aux individus sains : IL-6, IL-17, IL-12, IFN γ et TNF α . Ces résultats sont particulièrement intéressants car ils confirment des données publiées précédemment.

En effet, l'élévation des taux plasmatiques d'IL-6, d'IL-17 et de TNF α observés chez les patients porteurs de variants-candidats est également retrouvée dans le modèle murin d'hépatite induite par l'injection de ConA (Tiegs, 1997 ; Yan 2012 ; Yüksel, 2014).

De plus, l'élévation des niveaux plasmatiques d'IL-17 et d'IFN γ sont également retrouvées dans des cohortes précédentes de patients atteints d'HAI (Ferri, 2010 ; Zhao, 2011).

Enfin, l'IL-12 est une cytokine pro-inflammatoire utilisée en adjuvant dans les premiers modèles murins d'HAI et est décrite pour induire l'activation de mTORC1 (Yüksel, 2014 ; Powell, 2012).

d. Auto-antigènes non discriminants

Parmi les inconnues de la physiopathologie de l'HAI, le ou les auto-antigènes initiaux déclenchant la réponse immunitaire des lymphocytes T dans l'HAI n'ont toujours pas été identifiés. Ainsi, l'identification du ou des principaux auto-antigène(s) dirigeant l'auto-immunité cellulaire T dans l'HAI reste un sujet de recherche. En effet, en dehors des cibles antigéniques des auto-anticorps dont on sait qu'il ne sont pas les éléments déclenchants de l'HAI et qu'elles ne sont pas spécifiques de la pathologie, les cibles antigéniques des lymphocytes T auto-réactives n'ont pas encore été décrites (Sebode, 2018).

Ainsi, il semblait intéressant d'analyser les auto-anticorps plasmatiques circulants et de comparer les données entre individus sains, patients porteurs de variants-candidats et les autres patients atteints d'HAI. L'objectif était d'identifier des biomarqueurs entre les différents groupes. De plus, des analyses complémentaires ont été réalisées, comparant les patients selon le type d'HAI, selon la réponse au traitement, selon la présence d'une cirrhose ou non, selon la poly-auto-immunité individuelle. Aucun des 128 auto-antigènes recherchés n'a permis de différencier les groupes de patients sur quelque critère que ce soit dans la limite de la petite taille de la cohorte étudiée.

II. Hyperactivité de mTORC1 et réponse pro-inflammatoire

a. Rag GTPase et les monocytes

Les LPS inhibent puissamment la folliculine, protéine GAP inhibitrice de RagC, dans les macrophages, et inhibant l'inhibiteur, activent la voie mTORC1. Les souris déficientes en folliculine présentent des caractéristiques de syndromes histiocytaires comme la maladie d'Erdheim-Chester, avec une activation chronique des macrophages, une infiltration histiocytaire et une dissociation tissulaire (Li, 2019).

La perte d'inhibition de RagC conduit à une activation de la voie mTORC1 et à une activation des macrophages, ce qui conforte les résultats pro-inflammatoires obtenus dans ce travail.

b. AMPK et les cytokines

L'activation d'AMPK inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-1 β ; et active la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10. Son rôle dans de nombreuses autres voies de signalisation pourrait également être impliqué dans la régulation de l'inflammation (Noor, 2020 ; Desta, 2020).

L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires chez la patiente portant les mutations de *PRKAG1*, associée à ces données, conforte l'hypothèse de travail selon laquelle ces mutations conduisent à une perte d'activation d'AMPK.

c. Ragulator et les phagocytes

LAMTOR1 est capable de contrôler les réponses immunitaires innées en régulant la phosphorylation et la translocation du facteur de transcription TFEB, régulateur majeur de la biogénèse du lysosome et de l'autophagosome, mécanisme majeur dans la phagocytose (Hayama, 2018). Il est essentiel à la polarisation anti-inflammatoire des macrophages et à la migration leucocytaire par ses interactions avec le cytosquelette (Kimura, 2016 ; Nakatani, 2021). Il a été montré que le complexe Ragulator intervient dans le recrutement des lysosomes à la périphérie cellulaire, processus impliqué dans la signalisation des interférons de type 1 (Miyake, 2019).

Par ailleurs, Evavold *et al* ont identifié le complexe Ragulator comme partenaire nécessaire à la pyroptose, mécanisme d'attaque des macrophages en provoquant la cytolyse par la formation de pores membranaires (Evavold, 2021).

Ces informations soutiennent le rôle pro-inflammatoire du complexe Ragulator. Ainsi, le profil cytokinique pro-inflammatoire retrouvé chez les patientes portant les mutations de *LAMTOR1* et *LAMTOR3* conforte l'hypothèse de travail selon laquelle ces mutations seraient gain-de-fonction.

d. TSC et les cytokines

La régulation de mTOR par le complexe TSC joue un rôle majeur dans les réponses immunitaires innées. La délétion de *TSC2* conduit à une activation constitutive de la voie mTOR et renforce la production de cytokines pro-inflammatoires comme MCP-1 (Weichhart, 2008).

Ces données renforcent l'hypothèse de travail selon laquelle les mutations de *TSC2* seraient perte-de-fonction et responsables du profil cytokinique pro-inflammatoire retrouvé chez les patientes atteintes.

III. Limites des analyses immuno-phénotypiques

Le manque de matériel cellulaire a limité les possibilités d'études immuno-phénotypiques.

Non seulement il n'a pas été possible de réaliser les analyses précédentes pour chaque patient porteur de variant-candidat, mais il n'a pas non plus été possible d'étudier la fonction des T_{REG} des patients avec HAI ni des patients porteurs de variants-candidats.

a. Immuno-phénotypage détaillé par cytométrie de masse

Un phénotypage plus détaillé par cytométrie de masse, permettant de détecter de nombreux marqueurs de surface cellulaire et intra-cellulaires, des populations et sous-populations immunitaires circulantes chez les patients porteurs de variants-candidats comparés aux patients sans variants identifiés et aux individus sains permettraient de mettre en évidence d'éventuelles différences de petites sous-populations de cellules immunitaires. Ensuite, l'activité de mTORC1 pourrait être étudiée dans les populations cellulaires qui se trouvent différenciellement représentées dans les différents groupes.

b. Analyse approfondie des lymphocytes T régulateurs

Il serait intéressant d'approfondir l'analyse des T_{REG} dans les patients atteints d'HAI en général et chez ceux portant des variants-candidats de la voie mTORC1 en particulier. Plusieurs approches sont envisageables : une étude longitudinale, avec des prélèvements au diagnostic avant l'instauration du traitement, des prélèvements en cours de rémission sous traitement, puis lors d'éventuelles rechutes ; une étude transversale comparant des groupes de patients porteurs de variants-candidats aux autres.

c. Comparaison avec d'autres maladies auto-immunes

Concernant les cytokines et les auto-antigènes, le laboratoire a adressé de nombreux prélèvements de différentes cohortes de patients atteints de diverses pathologies auto-immunes, telles que l'ALPS, le déficit en CTLA-4 ou en LRBA, le gain de fonction de STAT3. Il serait intéressant de comparer les données des différents groupes, ce qui présenterait l'avantage d'augmenter les quantités de résultats et ainsi de pouvoir éventuellement distinguer des différences significatives.

De même, la répétition des dosages de cytokines et de la recherche d'auto-antigènes plasmatiques dans une cohorte plus large de patients atteints d'HAI permettrait potentiellement de dégager des biomarqueurs selon la présence ou non de variants-candidats, le type d'HAI, la sévérité de la présentation, la réponse au traitement, la poly-auto-immunité ou encore la présence d'une cirrhose.

IV. Signature spécifique de l'hyperactivité de mTORC1 dans l'auto-immunité ?

Le séquençage de l'ARN en cellule unique dans les cellules mononucléées circulantes sanguines permettraient de mettre en évidence des différences transcriptomiques dans les sous-populations cellulaires, notamment en rapport avec la voie mTORC1 et le développement de l'auto-immunité. Ainsi, il serait possible de dégager de nouveaux marqueurs, voire une signature transcriptomique spécifique, pour distinguer les différents groupes de patients et d'apporter de nouveaux éléments de réponse au développement de l'auto-immunité et à son lien avec l'hyperactivité de mTORC1.

En effet, le séquençage de l'ARN en cellule unique permet d'analyser des combinaisons cellulaires complexes à un niveau cellulaire et moléculaire, et devient qualifié pour analyser les réactions immunitaires dans de nombreuses pathologies (Cao, 2020).

Cette méthode présente les avantages suivants : (i) isolation en cellule unique en micro-gouttelettes par micro-fluidique à partir d'un échantillon cellulaire sans tri préalable qui introduirait des erreurs et pourrait altérer les résultats ; (ii) séquençage à très haut débit à partir de faibles signaux d'ARN messager dans chaque cellule unique et (iii) appariement de chaque cellule avec les séquences d'ARN messager associées. On comprend qu'elle génère de grandes quantités de données dont l'analyse est le plus grand défi (Cao, 2020).

Cependant, le séquençage de l'ARN en cellule unique permet de (i) rechercher des sous-types cellulaires rares, indétectables par d'autres techniques ; (ii) redéfinir les marqueurs cellulaires ; (iii) découvrir de nouvelles relations évolutives entre les cellules ; (iv) révéler la composition et le rôle de cellules immunitaires innées et adaptatives dans les processus tumoraux ; et (v) identifier de nouvelles cibles diagnostiques et thérapeutiques (Cao, 2020).

La possibilité d'explorer l'inconnu est une caractéristique majeure du séquençage de l'ARN en cellule unique et pourrait apporter des éléments de compréhension encore insoupçonnés (Cao, 2020).

PARTIE 4 : ETUDES FONCTIONNELLES

I. Mise en cause directe de variants de la voie mTORC1 dans une réponse immunitaire anormale

a. Hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes circulants

Comme dans les APDS, les variants-candidats entraînent l'hyperactivité de mTOR mise en évidence par l'hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes circulants des patients porteurs de mutations, particulièrement dans les lymphocytes B, comparé aux autres patients et aux individus sains. Il est intéressant de remarquer que cette augmentation de la phosphorylation de S6 est du même ordre que celle retrouvée chez la patiente atteinte d'APDS-2 étudiée dans le même temps.

Ainsi, la détection d'une hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes circulants pourrait être un marqueur de l'hyperactivité de mTORC1 potentiellement médiée par un variant-candidat dans l'un de ses partenaires.

b. Activité de mTORC1 résistante au sevrage

Le sevrage en acides aminés devrait supprimer ou du moins réduire l'activité de mTORC1, évaluée par la phosphorylation de S6. Cela est observé dans les cellules des individus sains et des patients atteints d'HAI sans variant-candidat identifié. Cependant, dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats, cette activité persiste à un niveau significativement plus élevé que dans les deux autres groupes. Ces résultats suggèrent que les variants-candidats rendent l'activité de mTORC1 insensible, au moins partiellement, au sevrage en acides aminés. Cela peut signifier que la voie est active en permanence, et que le sevrage ne permet pas d'éteindre l'hyperactivité de mTORC1. Cela confirme que les mutations sont gain de fonction sur l'activation de la voie mTORC1, soit par gain-de-fonction d'activateurs, soit par perte-de-fonction d'inhibiteurs.

Il est intéressant de noter que la différence de phosphorylation dans les lymphoblastes T n'est pas significative entre les patients porteurs ou non de variants-candidats, contrairement à la différence dans les lymphocytes circulants. Ainsi, si l'observation de l'activité de mTORC1 après sevrage dans les lymphoblastes T a permis d'affirmer sa résistance au moins partielle au sevrage en acides aminés, il semble plus raisonnable d'un point de vue technique (plus facile et rapide à exécuter), plus pertinent d'un point de vue analytique (différence plus significative) et plus physiologique (*ex vivo* non stimulés plutôt que stimulation non physiologique) de dépister l'hyperphosphorylation de S6 dans les lymphocytes circulants plutôt que dans les lymphoblastes T.

c. Activité de mTORC1 excessive en réponse aux stimuli

Différents stimuli ont été utilisés pour réactiver la voie mTORC1 après sevrage en acides aminés. La stimulation par IL-2 n'a pas permis de mettre en évidence de différence d'activation de mTORC1 entre les différents groupes. Ainsi, ce stimulus n'entraîne pas de réponse métabolique majorée de la part des cellules mutées.

La stimulation par OKT-3 permet, elle, de dégager une différence significative de phosphorylation de S6 dans les lymphoblastes T entre les patients porteurs ou non de variants-candidats. L'OKT-3 active la signalisation par le TCR par un signal puissant, et avec elle les voies métaboliques en aval telles qu'AMPK et mTORC1 (Tamas, 2006).

De la même façon que les lymphoblastes T, les lymphoblastes B immortalisés par l'EBV portant la mutation de RagC montrent une activité de mTORC1 résistante au sevrage en acides aminés. La stimulation des lymphoblastes B par PMA induit une activation de mTORC1 mise en évidence par la phosphorylation de S6K, et est médiée par l'activation d'Akt (Liu, 2017).

II. Impact fonctionnel de l'hyperactivité de mTORC1 dans les lymphocytes

a. Lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ déficientes en LAMTOR1 présentent une diminution marquée dans leur prolifération, la production d'IL-2, l'activité de mTORC1 et leur polarisation en T_H17.

Dans la pathologie du greffon contre l'hôte survenant après transplantation de cellules-souches hématopoïétiques, des mutations somatiques de mTOR ont été identifiées dans les lymphocytes T CD4⁺. L'étude fonctionnelle de ces mutations a démontré un effet gain-de-fonction de mTORC1 conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire et une diminution de l'apoptose (Kim, 2020).

La stimulation du TCR dans les lymphocytes T CD8⁺ régule la capacité des Rag GTPases à recruter mTORC1 aux lysosomes ; l'asymétrie qui s'ensuit dépend de la translocation de mTOR médiée par RagC (Pollizzi, 2016).

Dans les patients atteints de lupus érythémateux systémique, mTORC1 est activé. Son rôle majeur dans la différenciation et la fonction des lignées cellulaires T anormales dans le lupus érythémateux systémique est cohérent avec ses conséquences sur la modulation du développement des lymphocytes T. Ainsi, la phosphorylation de S6 a été identifiée comme biomarqueur pour la prédiction de poussées dans le lupus érythémateux systémique (Perl, 2016).

Dans le rhumatisme psoriasique, une augmentation de l'activité de mTORC1 est retrouvée dans les lymphocytes T, et l'augmentation de la phosphorylation de mTOR et de S6K a été décrite dans les biopsies cutanées de lésions psoriasiques (Perl, 2016).

Ces données de la littérature confortent les résultats obtenus dans ce travail, démontrant une hyperactivité de mTORC1 dans les patients atteints d'HAI et portant des variants-candidats activateur de la cascade de signalisation.

b. Lymphocytes T_{REG}

Si elles survivent aussi longtemps que les lymphocytes T_{REG} sauvages, les lymphocytes T_{REG} déficientes en LAMTOR1 présentent une perte notable de leur fonction suppressive et de l'expression de leur molécules spécifiques comme CTLA-4 (Hosokawa, 2017). Kälén *et al* ont démontré que l'inhibition de Ragulator conduisait à l'inhibition de mTORC1 et entraînait directement une augmentation de l'induction des lymphocytes T_{REG} FoxP3⁺ (Kälén, 2017).

Dans le modèle murin de délétion de mTOR dans les lymphocytes T_{REG}, les souris développent spontanément une auto-immunité sévère et systémique. Ainsi, l'expression de mTOR dans les T_{REG} est cruciale pour leur différenciation en T_{REG} effectrices et leur migration dans les tissus non-lymphoïdes. De plus, les T_{REG} déficientes en mTOR ont une stabilité réduite (Vallion, 2020).

c. Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont particulièrement sensibles aux fluctuations de nutriments par la voie de signalisation des Rag GTPases, et 15% des lymphomes folliculaires portent des mutations activatrices de RRAGC. Ortega-Molina *et al* ont récemment montré dans un modèle murin que l'inhibition même modérée de la signalisation dépendante des nutriments est efficace dans les cellules B pathologiques (Ortega-Molina, 2021).

Cela concorde avec les résultats exposés dans ce travail : l'hyperactivité de mTORC1, reflétée par l'hyperphosphorylation de S6, est plus évidente dans les lymphocytes B, qu'ils soient circulants (partie 4, I) ou immortalisés par l'EBV (partie 4, III). Dans ces derniers, en outre, le traitement par inhibiteurs de mTOR, s'il abaisse l'activité de mTORC1, ne parvient pas à restaurer un taux de phosphorylation similaire à celui des contrôles sains.

III. Limites des analyses réalisées

La limite la plus importante de ces analyses reste la disponibilité du matériel cellulaire. L'hyperactivité de la voie mTORC1, que ce soit dans les lymphocytes circulants ou dans les lymphoblastes après sevrage et après stimulation, n'a pas pu être établie pour chaque patient porteur de variant-candidat. En particulier, elle n'a pas pu être déterminée pour les patients porteurs des variants de *LAMTOR1*, *MTOR* et *PIK3R1*. Cependant, la prise en compte globale du groupe de patients porteurs de variants-candidats pour lesquels du matériel cellulaire était disponible a permis de mettre en évidence des différences significatives, soutenant ainsi l'hypothèse de travail de gain-de-fonction de l'activité de mTORC1 pour tous les variants-candidats identifiés.

De plus, les cellules utilisées étaient congelées. Il serait intéressant de répéter les expériences sur des prélèvements frais.

Par ailleurs, en raison du peu de cellules disponibles, il n'a pas été possible de déterminer spécifiquement l'activité de mTORC1 selon les sous-populations lymphocytaires.

IV. Etudes approfondies des conséquences de l'hyperactivité de mTORC1 ?

a. Etudes de prolifération

mTORC1 entraîne la prolifération cellulaire. Pourtant, aucune anomalie de prolifération des cellules immunitaires n'a été décrite dans la littérature. L'analyse de la prolifération des lymphoblastes T par différentes concentrations d'OKT-3 à différentes durées pourrait apporter de nouveaux éléments de discussion sur les conséquences de l'hyperactivité de mTORC1 dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats par rapport aux autres patients et aux individus sains.

b. Etudes d'apoptose

Afin d'étayer l'hyperactivité de mTORC1 dans les cellules des patients porteurs de variants-candidats, il serait intéressant d'analyser l'apoptose des cellules B et T afin de détecter une potentielle augmentation correspondant aux résultats obtenus dans l'APDS-1 (Nunes-Santos, 2019).

c. Etudes de cytotoxicité

Afin d'étayer l'hyperactivité de mTORC1 dans les cellules des patients porteurs de variants-candidats, il serait intéressant d'analyser la cytotoxicité des NK par une étude de dégranulation après tri cellulaire afin de retrouver un éventuel défaut similaire à ce qui est observé dans l'APDS-1 (Nunes-Santos, 2019).

d. Etude longitudinale de l'activité de mTORC1

L'activité de mTORC1 déclenchée par divers stimuli reste circonscrite dans le temps : la durée de cette activité pourrait être déterminée dans les cellules immunitaires en observant la phosphorylation de S6 à différents temps après sevrage en acides aminés et re-stimulation. Ces résultats pourraient être comparés entre les patients porteurs de variants-candidats et les autres patients.

e. Etudes de l'effet d'autres stimuli et d'autres cellules immunitaires

D'autre part, l'étude de l'effet d'autres stimuli immunitaires sur l'activité de mTORC1 dans les lymphocytes et dans d'autres cellules du système immunitaire inné et adaptatif apporterait des éléments de compréhension des mécanismes en jeu.

PARTIE 5 : PISTES THERAPEUTIQUES

I. Restauration d'une activité normale de mTORC1 après traitement par inhibiteurs

Le traitement par inhibiteurs de mTOR des lymphoblastes des patients porteurs de variants-candidats permet de restaurer une activité normale de mTORC1, en condition de sevrage et après stimulation.

Le traitement par rapamycine permet de réduire l'activité de mTORC1 dans les lymphoblastes T et B des patients porteurs de variants-candidats, la ramenant au même niveau que celle des lymphoblastes d'individus sains. De plus, le traitement par Torin1, bloquant à la fois mTORC1 et mTORC2, renforce cet effet inhibiteur.

Ainsi, les résultats de ce travail montrent que des molécules présentes sur le marché pourraient être testées pour une meilleure efficacité dans l'HAI, en particulier chez les patients porteurs de variants-candidats ou du moins d'une hyperactivité anormale de mTORC1. Ce dernier paramètre est dépistable facilement dans les cellules mononucléées circulantes sanguines à partir d'un prélèvement sanguin, comme cela a été montré plus tôt dans les résultats et la discussion.

II. Inhibiteurs spécifiques d'acteurs de la voie mTORC1

A l'image des inhibiteurs de PI3K développés dans les syndromes d'hypercroissance permettant une médecine de précision avec un traitement ciblant spécifiquement la molécule responsable, il serait intéressant de générer des inhibiteurs plus spécifiques des différents acteurs de la voie mTORC1. Cela permettrait d'éviter les effets secondaires généraux des molécules disponibles actuellement et d'échapper aux inconvénients du traitement de référence.

Dans les syndromes d'hypercroissance liés à des mutations de *PIK3CA*, le miransertib, un inhibiteur allostérique d'Akt a démontré une activité antiproliférative (Canaud, 2021).

A ce jour, 4 inhibiteurs de PI3K ont été autorisés dans le traitement des tumeurs malignes lymphoblastiques B : idelalisib, capanlisib, duvelisib et umbralisib. Idelalisib est un inhibiteur hautement sélectif de PI3K δ , copanlisib est un inhibiteur de toutes les classe I des PI3K avec une activité prédominante contre les isoformes PI3K δ et PI3K α , duvelisib (IPI-145) est un inhibiteur de PI3K δ et PI3K γ et umbralisib est un inhibiteur de PI3K δ . Le principal problème de ces inhibiteurs spécifiques de PI3K, en particulier duvelisib, concerne la tolérance plutôt que l'efficacité. En effet, la toxicité peut aller du simple rash cutané à une toxicité fatale, nécessitant une prise en charge strictement contrôlée de ces molécules (Shah, 2021). Un autres inhibiteur spécifique est autorisé dans une autre indication : l'alpelisib dans les cancers du sein, inhibiteur de PI3K α (Roskoski, 2021).

Dans les myélomes multiples, de nouvelles molécules ont récemment vu le jour, notamment un inhibiteur spécifique de p70-S6K1 PF-4708671. Il est intéressant de remarquer que l'activité de mTORC1, reflétée par la phosphorylation de p70-S6K1 et de sa cible S6, est réduite au cours du traitement par dexaméthasone (corticoïde) dans les myélomes multiples. Ainsi, Spaan et al ont montré que l'inhibiteur spécifique de p70-S6K1 permet de renforcer l'apoptose induites des cellules myélomateuses (Spaan, 2021).

Etant donné le rôle central de mTOR dans le métabolisme cellulaire, de multiples inhibiteurs spécifiques sont actuellement à l'étude dans des domaines extrêmement variés. Ces recherches en cours ouvrent de larges perspectives thérapeutiques en médecine personnalisée.

III. Limites des résultats obtenus

a. Un unique type cellulaire testé

Les molécules inhibitrices testées dans ce travail sont des molécules connues de longue date, sans effet spécifique, ayant au contraire un effet global sur le complexe mTORC1 (pour la rapamycine) et mTORC2 (pour Torin1), quel que soit le type cellulaire ou l'origine de son activation.

En effet, mTORC1 est un complexe ubiquitaire dont les fonctions peuvent varier selon le type cellulaire dans lequel il se trouve. Les résultats exposés dans ce travail montrent l'effet des inhibiteurs de mTOR sur mTORC1 spécifiquement dans les lymphoblastes T et B. Ce modèle a pour inconvénient de n'être pas complètement physiologique, mais pour avantage de sélectionner une population cellulaire qui sera observée. Ainsi, s'il est possible d'affirmer que le traitement par inhibiteurs généralistes de mTOR conduit à un abaissement voire une normalisation de l'activité de mTORC1 dans les lymphoblastes de patients porteurs de variants-candidats, il n'est pas possible de généraliser cette conclusion aux autres types cellulaires.

De plus, les expériences décrites ici sont réalisées *in vitro*, ne prenant pas en compte tous les paramètres en jeu lors du traitement *in vivo*.

b. Inhibiteurs « classiques » de mTOR

Comme évoqué dans l'introduction, le traitement par inhibiteurs de mTOR reste marginal dans l'HAI. La rapamycine (Sirolimus) ou ses analogues (Everolimus, Temsirolimus) ne sont utilisés qu'en dernier recours en cas d'HAI réfractaire aux traitements de première intention (corticoïdes, azathioprine, mycophénolate mofétil). S'ils sont généralement efficaces, permettant d'obtenir une rémission de la pathologie, leur tolérance est médiocre. Les effets secondaires des inhibiteurs classiques de mTOR conduisent souvent les patients ou les cliniciens à interrompre le traitement. Cependant, le traitement de référence n'est pas non plus idéal : essentiellement pris au long cours, grevé d'effets secondaires qui s'aggravent au fil du temps, ne permettant pas une guérison et n'empêchant pas les rechutes sous traitement ou aux tentatives de sevrage (Vergani, 2021).

Les signaux activateurs ou inhibiteurs de mTORC1 sont multiples et empruntent des voies variées impliquant une multitude d'acteurs (qui ne sont pas tous détaillés dans ce travail). Ainsi, il serait possible que l'impact de l'hyperactivité de mTORC1 sur la réponse immunitaire dépende d'une (ou plusieurs) voie(s) particulière(s) et que l'inhibition spécifique d'un régulateur-clé de cette voie suffirait à restaurer une réponse normale. Cette perspective de cible thérapeutique précise permettrait de dépasser les effets indésirables de l'immunosuppression aspécifique des traitements actuels.

Les résultats de ce travail démontrent que des mutations faux-sens ponctuelles hétérozygotes conduisant à une substitution de résidus au sein de la protéine peuvent être anormalement activatrices de mTORC1, dans un contexte de réponse immunitaire anormale avec apparition de pathologies auto-immunes. A l'inverse, il serait intéressant de cibler ces partenaires protéiques et/ou ces résidus en particulier ; dans différents types cellulaires, de façon spécifique, afin de déterminer quelle cible serait la plus pertinente en terme d'efficacité de restauration d'une réponse immunitaire normale et de tolérance avec un effet restreint au strict nécessaire.

IV. Un nouveau modèle pour comprendre et traiter l'HAI ?

Pour aller plus loin dans l'élucidation de la physiopathologie des HAI, en particulier en cas d'hyperactivité de mTORC1 prouvée sous-jacente, un nouveau modèle pourrait être proposé, utilisant de nouvelles technologies de pointe : la dérivation fonctionnelle en hépatocytes à partir de cellules-souches pluripotentes induites de patients porteurs de variants-candidats, en collaboration avec la plateforme IPS de l'institut Imagine.

a. Les cellules souches pluripotentes induites

Utilisant une infection par le virus Sendaï, il est possible de reprogrammer génétiquement les cellules mononucléées circulantes sanguines en cellules-souches pluripotentes induites, dites iPS (*induced pluripotent stem cells*). Ces cellules sont caractérisées par les critères suivants : l'auto-renouvellement illimité ; l'expression de marqueurs de pluripotence ; la capacité de différenciation fonctionnelle vers toutes les lignées spécialisées, sous l'influence d'inducteurs spécifiques pour chaque lignée (Germain, 2009).

Les iPS sont utilisées pour comprendre les pathologies. De nombreuses lignées de cellules iPS ont été constituées, particulièrement pour les pathologies rares, mais aussi pour des pathologies plus fréquentes. Certaines de ces lignées sont, en France, mises à disposition pour la recherche par l'infrastructure d'ingénierie des cellules souches pluripotentes et cellules différenciées (INGESTEM) (Guilhot, 2020).

b. La génération d'hépatocytes dérivés de cellules iPS

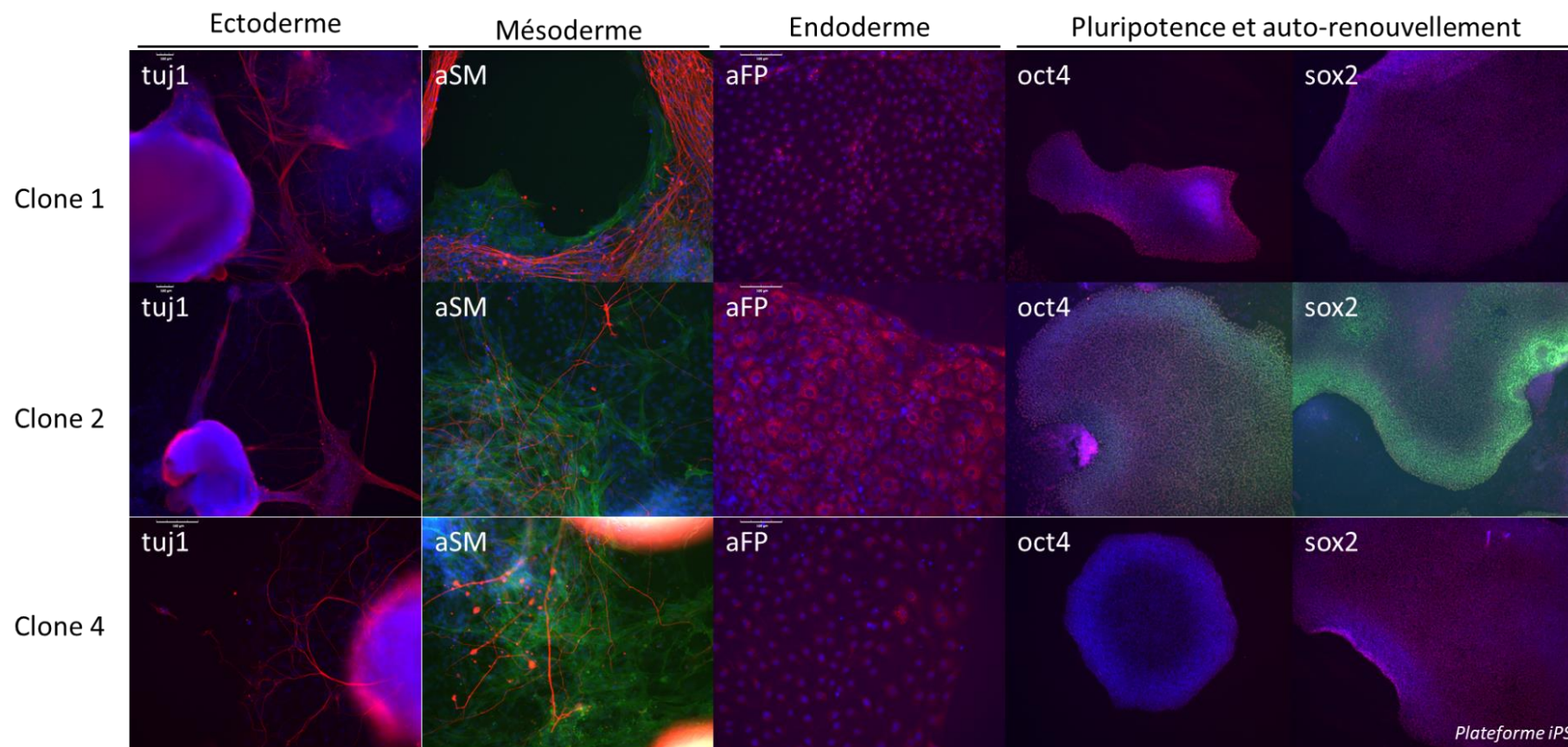
Ainsi, il est possible de reprogrammer des cellules mononucléées circulantes sanguines de patients porteurs de variants-candidats en cellules souches pluripotentes induites. Ensuite, il est possible de générer des cellules hépatocytaires à partir de ces cellules iPS. Les techniques de dérivation fonctionnelle s'améliorent constamment, et il est maintenant possible de générer des cellules hépatocytaires homogènes, voire même des organoïdes hépatiques en trois dimensions (Deguchi, 2020 ; Goulart, 2019).

c. Co-culture des hépatocytes dérivés d'iPS avec des cellules mononucléées circulantes sanguines

Concernant la compréhension du rôle de l'hyperactivité de mTORC1 dans l'apparition de l'auto-immunité ciblant les hépatocytes, l'intérêt des cellules hépatocytaires dérivées d'iPS serait de pouvoir être mises en co-culture avec des cellules immunitaires et d'observer par différents moyens et à différents temps, les réactions de chaque acteur. La co-culture et la description des interactions entre cellules dérivées d'iPS et cellules immunitaires n'est pas une pratique courante dans la littérature. Dans le but de réaliser une greffe de cellules pigmentaires épithéliales dérivées d'iPS, une équipe japonaise a pu mettre au point un protocole qui leur a permis d'observer les effets de la co-culture de cellules pigmentaires épithéliales dérivées d'iPS et des cellules immunitaires. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence différentes conséquences qui seront utiles dans la progression vers la greffe de cellules dérivées d'iPS (Sugita, 2016 ; Sugita, 2020).

Dans cette optique, une lignée d'iPS a été générée en collaboration avec la plateforme iPS de l'institut Imagine à partir des cellules sanguines de la patiente B. La Figure 38 présente les caractéristiques de cette lignée cellulaire.

Figure 38. Lignée iPS issue des cellules sanguines porteuses des variants de PRKAG1



Marquage en immunofluorescence des marqueurs caractéristiques des iPS confirmant la différenciation dans les trois feuillets : ectoderme (*tuj1*), mésoderme (*aSM*) et endoderme (*aFP*) et les capacités de pluripotence (*oct4*) et d'auto-renouvellement (*sox2*) des 3 clones générés à partir des cellules sanguines de la patiente B.

REFERENCES

- Abe M, Mashiba T, Zeniya M, et al; Autoimmune Hepatitis Study Group-Subgroup of the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group in Japan. Present status of autoimmune hepatitis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol*. 2011 Sep;46(9):1136-41.
- Agmon-Levin N, Ram M, Barzilai O et al. Prevalence of hepatitis C serum antibody in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2009;32:261–266.
- Akbarpour M, Goudy KS, Cantore A, 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 May 27;7(289):289ra81.
- Akbay B, Shmakova A, Vassetzky Y, Dokudovskaya S. Modulation of mTORC1 Signaling Pathway by HIV-1. *Cells*. 2020 Apr 28;9(5):1090.
- Al Baroudi S, Collaco JM, McGrath-Morrox S. An 18-year-old woman with pulmonary nodules found to have cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 deficiency. *BMJ Case Rep*. 2019 Dec 8;12(12):e231600.
- Al-Hamoudi WK. Severe autoimmune hepatitis triggered by varicella zoster infection. *World J Gastroenterol*. 2009 Feb 28;15(8):1004-6.
- Alsayez MAL, Elbeah SM, El-Desoky MM, et al. Polymorphism in Macrophage Migration Inhibitory Factor -173GC in Pediatric Patients with Autoimmune Hepatitis. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2020 Jan;23(1):63-71.
- Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929–938.
- Agel BA, Machicao V, Rosser B, et al. Efficacy of tacrolimus in the treatment of steroid refractory autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:805-809
- Arenz M, Büschenfelde KHM, Löhner HF. Limited T cell receptor V β -chain repertoire of liver-infiltrating T cells in autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1998;28:70-77.
- Arya AK, Singh P, Saikia UN, et al. Dysregulated mitogen-activated protein kinase pathway mediated cell cycle disruption in sporadic parathyroid tumors. *J Endocrinol Invest*. 2020 Feb;43(2):247-253
- Atzori L, Poli G, Perra A. Hepatic stellate cell: A star cell in the liver. *Int J Biochem Cell Biol*. Aug-Sep 2009;41(8-9):1639-42.
- Asano T, Okada S, Tsumura M, et al. Enhanced AKT Phosphorylation of Circulating B Cells in Patients With Activated PI3K δ Syndrome. *Front Immunol*. 2018 Apr 5;9:568.
- Aylett CH, Sauer E, Imseng S, et al. Architecture of human mTOR complex 1. *Science*. 2016 Jan 1;351(6268):48-52.
- Bacchetta R, Barzaghi F, Roncarolo MG. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2018 Apr;1417(1):5-22.

- Baldassari S, Ribierre T, Marsan E, et al. Dissecting the genetic basis of focal cortical dysplasia: a large cohort study. *Acta Neuropathol.* 2019 Dec;138(6):885-900.
- Barbhaiya M, Costenbader KH. Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2014;23:588–595
- Bartholomaeus WN, Shellam GR, Allan JE, Reed WD, Joske RA. Autoantibodies to liver-specific lipoprotein following hepatitis induced by mouse cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol.* 1983 Apr;52(1):89-97.
- Bedoya SK, Lam B, Lau K, et al. Th17 cells in immunity and autoimmunity. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:986789.
- Beer A, Dienes HP. Autoimmune hepatitis-is histology conclusive? *Ann Transl Med.* 2021 Apr;9(8):733.
- Benjamin D, Colombi M, Moroni C, et al. Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Oct 31;10(11):868-80.
- Benseler V, Warren A, Vo M, et al. Hepatocyte entry leads to degradation of autoreactive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:16735-16740.
- Biewenga M, Inderson A, Tushuizen ME, et al. Early Predictors of Short-Term Prognosis in Acute and Acute Severe Autoimmune Hepatitis. *Liver Transpl.* 2020 Dec;26(12):1573-1581.
- Bittencourt PL, Farias AQ, Porta G, et al. Frequency of concurrent autoimmune disorders in patients with autoimmune hepatitis: effect of age, gender, and genetic background. *J Clin Gastroenterol.* 2008 Mar;42(3):300-5.
- Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J et al. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand. J. Gastroenterol.* 1998;33, 99–103.
- Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, et al. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol.* 2011 Feb;54(2):374-85.
- Bogdanos DP, Gao B, Gershwin ME. Liver immunology. *Compr Physiol.* 2013 April ; 3(2): 567–598.
- Bohn G, Allroth A, Brandes G, et al. A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nat Med.* 2007 Jan;13(1):38-45.
- Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S33-40.
- Bonnardel J, T'Jonck W, Gaublomme D, et al. Stellate Cells, Hepatocytes, and Endothelial Cells Imprint the Kupffer Cell Identity on Monocytes Colonizing the Liver Macrophage Niche. *Immunity.* 2019 Oct 15;51(4):638-654.e9.
- Boutboul D, Kuehn HS, Van de Wyngaert Z, et al. Dominant-negative IKZF1 mutations cause a T, B, and myeloid cell combined immunodeficiency. *J Clin Invest.* 2018 Jul 2;128(7):3071-3087.
- Branger S, Schleinitz N, Veit V, et al. Étude de l'association hépatite auto-immune et antiphospholipides. *Rev Med Interne.* 2007 Apr;28(4):218-24.

- Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, et al. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:257-90
- Brunet FM. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*. London: Cambridge University Press, 1959.
- Bruserud O, Oftedal BE, Wolff AB, et al. AIRE-mutations and autoimmune disease. *Curr Opin Immunol*. 2016 Dec;43:8-15.
- Büschénfelde KH, Kössling FK, Miescher PA. Experimental chronic active hepatitis in rabbits following immunization with human liver proteins. *Clin Exp Immunol*. 1972 May;11(1):99-108.
- Callery MP, Kamei T, Flye MW. The effect of portacaval shunt on delayed-hypersensitivity responses following antigen feeding. *J Surg Res*. 1989 Apr;46(4):391-4.
- Calne RY, Sells RA, Pena JR, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. *Nature*. 1969 Aug 2;223(5205):472-6.
- Canaud G, Hammill AM, Adams D, et al. A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular manifestations. *Orphanet J Rare Dis*. 2021 Jul 8;16(1):306.
- Cao Y, Qiu Y, Tu G, Yang C. Single-cell RNA Sequencing in Immunology. *Curr Genomics*. 2020 Dec;21(8):564-575.
- Chaouali M, Carvalho A, Tezeghdenti A, et al. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 gene polymorphisms and susceptibility to type 1 autoimmune hepatitis in the Tunisian population. *Genes Dis*. 2017 Dec 30;5(3):256-262.
- Chaouali M, Fernandes V, Ghazouani E, et al. Association of STAT4, TGF β 1, SH2B3 and PTPN22 polymorphisms with autoimmune hepatitis. *Exp Mol Pathol*. 2018 Dec;105(3):279-284.
- Chatrath H, Allen L, Boyer TD. Use of sirolimus in the treatment of refractory autoimmune hepatitis. *Am J Med*. 2014;127(11):1128-1131
- Chen CH, Kuo LM, Chang Y, et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. *Hepatology*. 2006 Nov;44(5):1171-81.
- Chen S, Zhao W, Tan W, et al. Association of TBX21 promoter polymorphisms with type 1 autoimmune hepatitis in a Chinese population. *Hum Immunol*. 2011 Jan;72(1):69-73.
- Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decision. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:325-338.
- Christen U, Hintermann E. Autoantibodies in Autoimmune Hepatitis: Can Epitopes Tell Us about the Etiology of the Disease? *Front Immunol*. 2018 Feb 16;9:163.
- Conley ME, Dobbs AK, Quintana AM, et al. Agammaglobulinemia and absent B lineage cells in a patient lacking the p85 α subunit of PI3K. *J Exp Med*. 2012 Mar 12;209(3):463-70.
- Cresswell P, Howard JC. Antigen recognition. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):71-4

- Crinier A, Narni-Mancinelli E, Ugolini S, et al. SnapShot: Natural Killer Cells. *Cell*. 2020 Mar 19;180(6):1280-1280.e1.
- Crispe IN, Mehal WZ. Strange brew: T cells in the liver. *Immunol Today*. 1996 Nov;17(11):522-5
- Crispe IN, Giannandrea M, Klein I, et al. Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev*. 2006 Oct;213:101-18.
- Crotty S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol*. 2011;29:621-63.
- Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, et al. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens in autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1994 Jul;107(1):200-7.
- Czaja AJ, Cassani F, Cataleta M, et al. Frequency and significance of antibodies to actin in type 1 autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1996;24:1068-1073.
- Czaja AJ & Donaldson PT. Genetic susceptibilities for immune expression and liver cell injury in autoimmune hepatitis. *Immunol. Rev*. 2000;174, 250–259.
- Czaja AJ. Treatment of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis*. 2002 Nov;22(4):365-78.
- Czaja AJ. Drug-induced autoimmune-like hepatitis. *Dig Dis Sci* 2011;56:958–976
- Czaja AJ. Diagnosis, pathogenesis, and treatment of autoimmune hepatitis after liver transplantation. *Dig Dis Sci*. 2012 Sep;57(9):2248-66.
- Czaja AJ. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis: Current Status and Future Directions. *Gut Liver*. 2016 Mar;10(2):177-203.
- Czaja AJ. Global Disparities and Their Implications in the Occurrence and Outcome of Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis Sci*. 2017 Sep;62(9):2277-2292.
- Danielsson Borssén Å, Marschall HU, Bergquist A, et al. Epidemiology and causes of death in a Swedish cohort of patients with autoimmune hepatitis. *Scand. J. Gastroenterol*. 2017;52, 1022–1028.
- De Araujo ME, Erhart G, Buck K, et al. Polymorphisms in the gene regions of the adaptor complex LAMTOR2/LAMTOR3 and their association with breast cancer risk. *PLoS One*. 2013;8(1):e53768.
- de Araujo MEG, Naschberger A, Fűrnröhr BG, et al. Crystal structure of the human lysosomal mTORC1 scaffold complex and its impact on signaling. *Science*. 2017 Oct 20;358(6361):377-381.
- De Boer YS, van Gerven NM, Zwiers A, et al. Genome-wide association study identifies variants associated with autoimmune hepatitis type 1. *Gastroenterology* 2014;147, 443–452.e5
- De Boer YS, van Nieuwkerk CMJ, Witte BI, et al. Assessment of the histopathological key features in autoimmune hepatitis. *Histopathology*. 2015 Feb;66(3):351-62.
- de Valles-Ibáñez G, Esteve-Solé A, Piquer M, et al. Evaluating the Genetics of Common Variable Immunodeficiency: Monogenetic Model and Beyond. *Front Immunol*. 2018 May 14;9:636.
- Debray D, Maggiore G, Giradet JP, et al. Efficacy of cyclosporin A in children with type 2 autoimmune hepatitis. *J Pediatr* 1999;135:111-114

- Deguchi S, Takayama K, Mizuguchi H. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells for Cellular Medicine. *Biol Pharm Bull.* 2020;43(4):608-615.
- Desta YT, Wu M, Bai L, et al. Mitochondrial-targeted ubiquinone alleviates concanavalin A-induced hepatitis via immune modulation. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul;84:106518.
- 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 Jul 11;12(7):e0181107.
- Docq M, Julien B. Cellules cancéreuses, cellules étoilées et rigidité du milieu extracellulaire - Le cercle vicieux du développement des métastases hépatiques [Cancer cell, stellate cells and stiffness: the vicious circle of hepatic metastasis]. *Med Sci (Paris).* 2020 Feb;36(2):176-179.
- Donadieu J, Lamant M, Fieschi C, et al; French GATA2 study group. Natural history of GATA2 deficiency in a survey of 79 French and Belgian patients. *Haematologica.* 2018 Aug;103(8):1278-1287.
- Donaldson PT. Genetics in autoimmune hepatitis. *Semin. Liver Dis.* 2002;22, 353–364.
- Doman GL, Stariha JTB, Rathinaswamy MK, et al. Defining How Oncogenic and Developmental Mutations of PIK3R1 Alter the Regulation of Class IA Phosphoinositide 3-Kinases. *Structure.* 2020 Feb 4;28(2):145-156.e5.
- Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Mar;1804(3):433-9.
- Duclaux-Loras R, Charbit-Henrion F, Neven B, et al. Clinical Heterogeneity of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A French Multicenter Retrospective Study. *Clin Transl Gastroenterol.* 2018 Oct; 9(10): 201.
- Dufour JF, Zimmermann M, Reichen J. Severe autoimmune hepatitis in patients with previous spontaneous recovery of a flare. *J Hepatol.* 2002 Dec;37(6):748-52.
- EASL:European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Autoimmune hepatitis. *J. Hepatol.* 2015;63:971–1004.
- ElTanbouly MA, Noelle RJ. Rethinking peripheral T cell tolerance: checkpoints across a T cell's journey. *Nat Rev Immunol.* 2021 Apr;21(4):257-267.
- Elkaim E, Neven B, Bruneau J, et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):210-218.e9.
- Evavold CL, Hafner-Bratkovič I, Devant P, et al. Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Regulator-Rag-mTORC1 pathway. *Cell.* 2021 Jul 14:S0092-8674(21)00796-0.
- Fainboim L, Cañero Velasco MC, Marcos CY, et al. Protracted, but not acute, hepatitis A virus infection is strongly associated with HLA-DRB*1301, a marker for pediatric autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2001;33, 1512–1517.

- Feld JJ, Dinh H, Arenovich T, et al. Autoimmune hepatitis: effect of symptoms and cirrhosis on natural history and outcome. *Hepatology* 2005;42:53-62.
- 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
- Ferri PM, Simões E Silva AC, Torres KCL, et al. Autoimmune Hepatitis and Autoimmune Hepatitis Overlap With Sclerosing Cholangitis: Immunophenotype Markers in Children and Adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018 Feb;66(2):204-211.
- Ficht X, Iannacone M. Immune surveillance of the liver by T cells. *Sci Immunol.* 2020 Sep 4;5(51):eaba2351.
- Floreani A, Leung PSC, Gershwin ME. Environmental Basis of Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016 Jun;50(3):287-300.
- Floreani A, De Martin S, Secchi MF, et al. Extrahepatic autoimmunity in autoimmune liver disease. *Eur J Intern Med.* 2019 Jan;59:1-7.
- Frauwirth KA, Riley JL, Harris MH, et al. The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity.* 2002 Jun;16(6):769-77.
- Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009 Dec 21;206(13):3015-29.
- Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:140–156.
- Garelli S, Dalla Costa M, Sabbadin C, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: an Italian survey on 158 patients. *J Endocrinol Invest.* 2021 May 18.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010 Feb 5;327(5966):656-61
- Germain D. Les cellules souches pluripotentes induites [Induced pluripotent stem cells (iPS cells)]. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Nov-Dec;57(7-8):555-9.
- Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ et al. Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* 2005;42:1194–1202
- Getts DR, Chastain EM, Terry RL, et al. Virus infection, antiviral immunity, and autoimmunity. *Immunol Rev* 2013;255:197–209
- Giannakis M, Mu XJ, Shukla SA, et al. Genomic Correlates of Immune-Cell Infiltrates in Colorectal Carcinoma [published correction appears in *Cell Rep.* 2016 Oct 18;17 (4):1206]. *Cell Rep.* 2016;15(4):857-865.
- Gough SCL, Walker LSK, Sansom DM. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2005 Apr;204:102-15.

- Goulart E, de Caires-Junior LC, Telles-Silva KA, et al. 3D bioprinting of liver spheroids derived from human induced pluripotent stem cells sustain liver function and viability in vitro. *Biofabrication*. 2019 Nov 27;12(1):015010.
- Griffith OL, Spies NC, Anurag M, et al. The prognostic effects of somatic mutations in ER-positive breast cancer. *Nat Commun*. 2018 Sep 4;9(1):3476.
- Grønbæk L, Vilstrup H, Jepsen P. Autoimmune hepatitis in Denmark: incidence, prevalence, prognosis, and causes of death. A nationwide registry-based cohort study. *J. Hepatol*. 2014;60, 612–617.
- Grønbæk L, Vilstrup H, Pedersen L, et al. Family occurrence of autoimmune hepatitis: A Danish nationwide registry-based cohort study. *J Hepatol*. 2018 Oct;69(4):873-877.
- Grønbæk L, Vilstrup H, Pedersen L, et al. Extrahepatic autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis and their relatives: A Danish nationwide cohort study. *Liver Int*. 2019 Jan;39(1):205-214.
- Gugenheim J, Samuel D, Reynes M, et al. Liver transplantation across ABO blood group barriers. *Lancet*. 1990 Sep 1;336(8714):519-23.
- Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2006;1:23-61.
- Guidotti LG, Inverso D, Sironi L, et al. Immunosurveillance of the liver by intravascular effector CD8(+) T cells. *Cell*. 2015 Apr 23;161(3):486-500.
- Guilhot F. Cellules humaines à usage thérapeutique : état de la question [Human cells for therapeutics purpose: State of the art]. *Bull Acad Natl Med*. 2020 Oct;204(8):866-876.
- Hagel S, Bruns T, Herrmann A, et al. Autoimmune hepatitis in an HIV-infected patient: an intriguing association. *Int J STD & AIDS*. 2012;23(6):448–450.
- Haggard L, Glimberg I, Lebowitz, et al. High prevalence of celiac disease in autoimmune hepatitis: systematic review and meta-analysis. *Liver Int*. 2021 Jul 5.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):251-62.
- Hayama Y, Kimura T, Takeda Y, et al. Lysosomal Protein Lamtor1 Controls Innate Immune Responses via Nuclear Translocation of Transcription Factor EB. *J Immunol*. 2018 Jun 1;200(11):3790-3800.
- Hennes EM, Zeniya M, Czaja Albert J, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169–176.
- Henske EP, Jóźwiak S, Kingswood JC, et al. Tuberous sclerosis complex. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 May 26;2:16035.
- Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver – from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016;13:88-110.
- Higuchi T, Oka S, Furukawa H, et al. Association of a single nucleotide polymorphism upstream of ICOS with Japanese autoimmune hepatitis type 1. *J Hum Genet*. 2017 Apr;62(4):481-484.

- Hilzenrat N, Zilberman D, Klein T, et al. Autoimmune hepatitis in a genetically susceptible patient: is it triggered by acute viral hepatitis A? *Dig Dis Sci.* 1999 Oct;44(10):1950-2.
- Hillmann P, Fabbro D. PI3K/mTOR Pathway Inhibition: Opportunities in Oncology and Rare Genetic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 18;20(22):5792.
- Hintermann E, Ehser J, Bayer M, Pfeilschifter JM, Christen U. Mechanism of autoimmune hepatic fibrogenesis induced by an adenovirus encoding the human liver autoantigen cytochrome P450 2D6. *J Autoimmun.* 2013 Aug;44:49-60.
- Hiraide A, Imazeki F, Yokosuka O, et al. Fas polymorphisms influence susceptibility to autoimmune hepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2005 Jun;100(6):1322-9.
- Homborg JC, Abuaf N, Bernard O et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of “autoimmune” hepatitis. *Hepatology* 1987;7, 1333–1339.
- Hosokawa T, Kimura T, Nada S, et al. Lamtor1 Is Critically Required for CD4+ T Cell Proliferation and Regulatory T Cell Suppressive Function. *J Immunol.* 2017 Sep 15;199(6):2008-2019.
- Huang Q, Gong Q, Wen T, et al. Loss of LAMTOR1 in pancreatic β -cells increases glucose-stimulated insulin secretion in mice. *Int J Mol Med.* 2020 Jan;45(1):23-32.
- Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J.* 2018 Aug;285(16):2944-2971.
- Huynh H, Hao HX, Chan SL, et al. Loss of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) Is Frequent in Hepatocellular Carcinoma and Predicts Response to mTORC1 Inhibitor Everolimus. *Mol Cancer Ther.* 2015 May;14(5):1224-35.
- Ito T, Hanabuchi S, Wang YH, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 2008 Jun;28(6):870-80.
- Ito S, Nada S, Yamazaki D, et al. p18/Lamtor1-mTORC1 Signaling Controls Development of Mucin-producing Goblet Cells in the Intestine. *Cell Struct Funct.* 2020;45(2):93-105.
- Iwatsuki S, Iwaki Y, Kano T, et al. Successful Liver Transplantation From Crossmatch-Positive Donors. *Transplant Proc.* 1981 Mar; 13(1 Pt 1): 286–288.
- Jain D, Singh H, Singh G, et al. Autoimmune Hepatitis with Autoimmune Haemolytic Anemia Triggered by Varicella - a Rare Presentation. *Maedica (Bucur).* 2016 Dec;11(4):349-351.
- Jiménez-Rivera C, Ling SC, Ahmed N. Incidence and Characteristics of Autoimmune Hepatitis. *Pediatrics.* 2015 Nov;136(5):e1237-48.
- Jin HT, Ahmed R, Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2011;350:17-37.
- Johnson GD, Holborow EJ, Glynn LE. Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. *Lancet* 1965;2, 878–879

- Jun S, Lee S, Kim HC, et al. PAF-mediated MAPK signaling hyperactivation via LAMTOR3 induces pancreatic tumorigenesis. *Cell Rep*. 2013 Oct 31;5(2):314-22.
- Jung S, Gámez-Díaz L, Proietti M, Grimbacher B. "Immune TOR-opathies," a Novel Disease Entity in Clinical Immunology. *Front Immunol*. 2018 May 9;9:966.
- Kälin S, Becker M, Ott VB, et al. A Stat6/Pten Axis Links Regulatory T Cells with Adipose Tissue Function. *Cell Metab*. 2017 Sep 5;26(3):475-492.e7.
- Kamada N, Brons G, Davies HS. Fully allogeneic liver grafting in rats induces a state of systemic nonreactivity to donor transplantation antigens. *Transplantation*. 1980 May;29(5):429-31.
- Kim D, Park G, Huuhtanen J, et al. Somatic mTOR mutation in clonally expanded T lymphocytes associated with chronic graft versus host disease. *Nat Commun*. 2020 May 7;11(1):2246.
- Kimura T, Nada S, Takegahara N, et al. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat Commun*. 2016 Oct 12;7:13130.
- Kirk AP, Jain S, Pocock S et al. Late results of the Royal Free Hospital prospective controlled trial of prednisolone therapy in hepatitis B surface antigen negative chronic active hepatitis. *Gut* 1980;21, 78–83.
- Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, et al. Infections and autoimmunity—friends or foes? *Trends Immunol* 2009;30:409–414
- Komurasaki R, Imaoka S, Tada N, et al. LKM-1 sera from autoimmune hepatitis patients that recognize ERp57, carboxylesterase 1 and CYP2D6. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2010;25(1):84-92.
- Krawitt EL. Sudden jaundice with isolated atypical perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Ann Intern Med* 1999;131:796-796
- Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med*. 2006 Jan 5;354(1):54-66.
- Kuehn HS, Ouyang W, Lo B, et al. Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science*. 2014 Sep 26;345(6204):1623-1627.
- Kuriki J, Murakami H, Kakumu S, et al. Experimental autoimmune hepatitis in mice after immunization with syngeneic liver proteins together with the polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. *Gastroenterology*. 1983 Mar;84(3):596-603.
- Kurowski J, Melin-Aldana H, Bass L, et al. Sirolimus as rescue therapy in pediatric autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2014;58(1):e4-e6
- 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;116:643-649
- Lenzi M, Ballardini G, Fusconi M, et al. Type 2 autoimmune hepatitis and hepatitis C virus infection *Lancet*, 1990;335:258-259
- Leprévier G, Rotblat B. How does mTOR sense glucose starvation? AMPK is the usual suspect. *Cell Death Discov*. 2020 Apr 22;6:27.

- Li L, Plummer SJ, Thompson CL, et al. Association between phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit p85alpha Met326Ile genetic polymorphism and colon cancer risk. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):633-7.
- Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*. 2014 Mar 4;19(3):373-9.
- Li P, He K, Li J, et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Mol Immunol*. 2017 May;85:222-229
- Li J, Wada S, Weaver LK, et al. Myeloid Folliculin balances mTOR activation to maintain innate immunity homeostasis. *JCI Insight*. 2019 Mar 7;5(6):e126939.
- Liang M, Liwen Z, Yun Z, et al. The Imbalance between Foxp3 + Tregs and Th1/Th17/Th22 Cells in Patients with Newly Diagnosed Autoimmune Hepatitis. *J Immunol Res*. 2018 Jun 27;2018:3753081.
- Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, et al. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Dec;25(6):653-64.
- Liberal R, Krawitt EL, Vierling JM, et al. Cutting edge issues in autoimmune hepatitis. *J Autoimmun*. 2016 Dec;75:6-19.
- Lin R, Zhou L, Zhang J, et al. Abnormal intestinal permeability and microbiota in patients with autoimmune hepatitis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(5): 5153–5160.
- Little AM, Parham P. Polymorphism and evolution of HLA class I and II genes and molecules. *Rev Immunogenet*. 1999;1(1):105-23.
- Liu L, Okada S, Kong XF, et al. Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *J Exp Med*. 2011 Aug 1;208(8):1635-48.
- Liu Q, Kang SA, Thoreen CC, et al. Development of ATP-competitive mTOR inhibitors. *Methods Mol Biol*. 2012;821:447-60.
- Liu M, Clarke CJ, Salama MF, et al. Co-ordinated activation of classical and novel PKC isoforms is required for PMA-induced mTORC1 activation. *PLoS One*. 2017 Sep 19;12(9):e0184818.
- Liu HJ, Lizotte PH, Du H, et al. TSC2-deficient tumors have evidence of T cell exhaustion and respond to anti-PD-1/anti-CTLA-4 immunotherapy. *JCI Insight*. 2018 Apr 19;3(8):e98674.
- Liu Z, Yang C, Li X, et al. The landscape of somatic mutation in sporadic Chinese colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018 Jun 8;9(44):27412-27422.
- Liu Z, Wu M, Shi H, et al. DDN-AS1-miR-15a/16-TCF3 feedback loop regulates tumor progression in cervical cancer. *J Cell Biochem*. 2019 Jun;120(6):10228-10238.
- Lohse AW, Sebode M, Jørgensen MH, et al; European Reference Network on Hepatological Diseases (ERN RARE-LIVER); International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG). Second-line and third-line therapy for autoimmune hepatitis: A position statement from the European Reference Network on Hepatological Diseases and the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol*. 2020 Dec;73(6):1496-1506.

- Long PA, Zimmermann MT, Kim M, et al. De novo RRAGC mutation activates mTORC1 signaling in syndromic fetal dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 2016; 135(8):909-917.
- Long PA, Evans JM, Olson TM. Diagnostic Yield of Whole Exome Sequencing in Pediatric Dilated Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Dev Dis*. 2017 Aug 8;4(3):11.
- Longhi MS, Ma Y, Bogdanos DP, et al. Impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells in autoimmune liver diseaseJ. *Hepatology*. 2004;41:31-37
- Longhi MS, Ma Y, Mitry RR, et al. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitisJ. *Autoimmun*. 2005;25:63-71
- Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Regulatory T cells in autoimmune hepatitis: an updated overview. *J Autoimmun*. 2021 May;119:102619
- Lu LL, Suscovich TJ, Fortune SM, et al. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. *Nat Rev Immunol*. 2018 Jan;18(1):46-61.
- Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2014 Jan;15(1):88-97.
- Lucey MR, Vierling JM. Clinical presentation and natural history of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2014 Feb 10;3(1):9-11.
- Ma CA, Stinson JR, Zhang Y, et al. Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nat Genet*. 2017 Aug;49(8):1192-1201.
- Ma C, Hunt JB, Selenica MB, et al. Arginase 1 Insufficiency Precipitates Amyloid-β Deposition and Hastens Behavioral Impairment in a Mouse Model of Amyloidosis. *Front Immunol*. 2021 Jan 14;11:582998.
- Ma Y, Su H, Yuksel M, et al. Human Leukocyte Antigen Profile Predicts Severity of Autoimmune Liver Disease in Children of European Ancestry. *Hepatology*. 2021 May 10.
- Mack CL, Adams D, Assis DN. Diagnosis and Management of Autoimmune Hepatitis in Adults and Children: 2019 Practice Guidance and Guidelines From the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2020 Aug;72(2):671-722.
- Mackay IR, Weiden S, Hasker J. Autoimmune hepatitis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965 Jun 30;124(2):767-80.
- Mackay IR. Historical reflections on autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 7;14(21):3292-300.
- Malek TR, The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J Leukoc Biol*. 2003 Dec;74(6):961-5.
- Manns M, Gerken G, Kyriatsoulis A et al. Characterisation of a new subgroup of autoimmune chronic active hepatitis by autoantibodies against a soluble liver antigen. *Lancet* 1987;1, 292–294

- Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;51, 2193–2213
- Marchiò C, Geyer FC, Ng CK, et al. The genetic landscape of breast carcinomas with neuroendocrine differentiation. *J Pathol.* 2017 Feb;241(3):405-419.
- Marshall JDS, Mellor P, Ruan X, et al. Insight into the PTEN - p85 α interaction and lipid binding properties of the p85 α BH domain. *Oncotarget.* 2018 Dec 11;9(97):36975-36992.
- Marzollo A, Maestrini G, La Starza R, et al. A novel germline variant in PIK3R1 results in SHORT syndrome associated with TAL/LMO T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol.* 2020 Dec;95(12):E335-E338.
- Matsuno K, Nomiya H, Yoneyama H, et al. Kupffer cell-mediated recruitment of dendritic cells to the liver crucial for a host defense. *Dev Immunol.* 2002 Sep;9(3):143-9.
- Meloni A, Willcox N, Meager A, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: an extensive longitudinal study in Sardinian patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr;97(4):1114-24.
- Migita K, Nakamura M, Abiru S, et al. Association of STAT4 polymorphisms with susceptibility to type-1 autoimmune hepatitis in the Japanese population. *PLoS One.* 2013 Aug 22;8(8):e71382.
- Mehal WZ, Juedes AE, Crispe IN. Selective retention of activated CD8+ T cells by the normal liver. *J Immunol.* 1999 Sep 15;163(6):3202-10.
- METAVIR. Intraobserver and interobserver variations in liver biopsy interpretation in patients with chronic hepatitis C. The French METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology.* 1994 Jul;20(1 Pt 1):15-20.
- Mieli-Vergani G, Vergani D. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011 Jun;8(6):320-9.
- Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Apr 12;4:18017.
- Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, et al. Diagnosis and management of pediatric autoimmune liver disease: ESPGHAN hepatology committee position statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018;66:345-360.
- Miller SA, Dykes DD et Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
- Miyake Y, Iwasaki Y, Terada R, et al. Clinical features of Japanese type 1 autoimmune hepatitis patients with zone III necrosis. *Hepatol Res* 2007;37:801-805.
- Miyake K, Saitoh SI, Sato R, et al. Endolysosomal compartments as platforms for orchestrating innate immune and metabolic sensors. *J Leukoc Biol.* 2019 Oct;106(4):853-862.
- Moreno-Corona N, Chentout L, Poggi L, et al. Two Monogenetic Disorders, Activated PI3-Kinase- δ Syndrome 2 and Smith-Magenis Syndrome, in One Patient: Case Report and a Literature Review of Neurodevelopmental Impact in Primary Immunodeficiencies Associated With Disturbed PI3K Signaling. *Front Pediatr.* 2021 Jun 24;9:688022.

- Muratori L, Muratori P, Lanzoni G, et al. Application of the 2010 American Association for the study of liver diseases criteria of remission to a cohort of Italian patients with autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2010;52, 1857
- Murugan AK, Alzahrani A, Xing M. Mutations in critical domains confer the human mTOR gene strong tumorigenicity. *J Biol Chem*. 2013 Mar 1;288(9):6511-21.
- Murugan AK. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Semin Cancer Biol*. 2019 Dec;59:92-111.
- Murphy K, Weaver C. Janeway's Immunobiology. 9th edition. 2018.
- Musacchio A, Cantley LC, Harrison SC. Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14373-8.
- Nakatani T, Tsujimoto K, Park J, et al The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II. *Nat Commun*. 2021 Jun 7;12(1):3333.
- Napolitano G, Di Malta C, Esposito A, et al. A substrate-specific mTORC1 pathway underlies Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Nature*. 2020 Sep;585(7826):597-602.
- Nemazee D, Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nat Rev Immunol*. 2017 May;17(5):281-294.
- Ngu JH, Gearry RB, Frampton CM, et al. Autoimmune hepatitis: the role of environmental risk factors: a population-based study. *Hepatol Int*. 2013 Jul;7(3):869-75.
- Noor HB, Mou NA, Salem L, et al. Anti-inflammatory Property of AMP-activated Protein Kinase. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2020;19(1):2-41.
- Nouri-Aria KT, Hegarty JE, Alexander GJ, et al. Effect of corticosteroids on suppressor-cell activity in "autoimmune" and viral chronic active hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 1982;307:1301-1304
- Novice T, Kariminia A, Del Bel KL, et al. A Germline Mutation in the C2 Domain of PLCγ2 Associated with Gain-of-Function Expands the Phenotype for PLCG2-Related Diseases. *J Clin Immunol*. 2020 Feb;40(2):267-276.
- Nunes-Santos CJ, Uzel G, Rosenzweig SD. PI3K pathway defects leading to immunodeficiency and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019 May;143(5):1676-1687.
- Oda JMM, Hirata BKK, Guembarovski RL, et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *J Genet*. 2013 Apr;92(1):163-71.
- Oka S, Higuchi T, Furukawa H, et al. Association of a single nucleotide polymorphism in TNIP1 with type-1 autoimmune hepatitis in the Japanese population. *J Hum Genet*. 2018 Jun;63(6):739-744.
- Okosun J, Wolfson RL, Wang J, et al. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. *Nat Genet*. 2016 Feb;48(2):183-8.
- Oliveira LC, Porta G, Marin MLC, et al. Autoimmune hepatitis, HLA and extended haplotypes. *Autoimmun. Rev*. 2011;10, 189–193.

- Oliveira LC, Goldberg AC, Marin MLC et al. Autoimmune Hepatitis in Brazilian Children: IgE and Genetic Polymorphisms in Associated Genes. *J Immunol Res*. 2015;2015:679813.
- Oo YH, Shetty S, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *Dig Dis*. 2010;28(1):31-44.
- Orlando G, Soker S, Wood K. Operational tolerance after liver transplantation. *J Hepatol*. 2009 Jun;50(6):1247-57.
- Ortega-Molina A, Lebrero-Fernández C, Sanz A, et al. Inhibition of Rag GTPase signaling in mice suppresses B cell responses and lymphomagenesis with minimal detrimental trade-offs. *Cell Rep*. 2021 Jul 13;36(2):109372
- Otani Y, Ishida J, Kurozumi K, et al. PIK3R1Met326Ile germline mutation correlates with cysteine-rich protein 61 expression and poor prognosis in glioblastoma. *Sci Rep*. 2017 Aug 7;7(1):7391.
- Øverbye A, Skotland T, Koehler CJ, et al. Identification of prostate cancer biomarkers in urinary exosomes. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):30357-76.
- Paavola CD, Hemmerich S, Grunberger D, et al. Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. *J Biol Chem*. 1998 Dec 11;273(50):33157-65
- Peiseler M, Sebode M, Franke B, et al. FOXP3+ regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency. *J Hepatol* 2012;57:125-132
- Pensati L, Costanzo A, Ianni A, et al. Fas/Apo1 mutations and autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with type 2 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1997 Oct;113(4):1384-9.
- Perdigoto R, Carpenter HA, Czaja AJ. Frequency and significance of chronic ulcerative colitis in severe corticosteroid-treated autoimmune hepatitis. *J Hepatol*, 1992;14:325-331
- Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Mar;12(3):169-82.
- Pollizzi KN, Sun IH, Patel CH, et al. Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2016 Jun;17(6):704-11.
- Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, et al. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:39-68.
- Prandota J, Stolarczyk J. Autoimmune hepatitis associated with the odour of fish food proteins: a causal relationship or just a mere association? *Allergol Immunopathol (Madr)*. Nov-Dec 2002;30(6):331-7.
- Puustinen P, Keldsbo A, Corcelle-Termeau E, et al. DNA-dependent protein kinase regulates lysosomal AMP-dependent protein kinase activation and autophagy. *Autophagy*. 2020 Oct;16(10):1871-1888.
- Qian S, Demetris AJ, Murase N, et al. Murine Liver Allograft Transplantation: Tolerance and Donor Cell Chimerism. *Hepatology*. 1994 Apr; 19(4): 916–924.

- Qin B, Li J, Liang Y, et al. The association between Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, Fas, tumour necrosis factor- α gene polymorphisms and autoimmune hepatitis: a meta-analysis. *Dig Liver Dis*. 2014 Jun;46(6):541-8.
- Racanelli V, Rehermann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology*. 2006 Feb;43(2 Suppl 1):S54-62
- Rao RR, Li Q, Odunsi K, et al. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity*. 2010 Jan 29;32(1):67-78.
- Ramos HC, Reyes J, Abu-Elmagd K, et al. WEANING OF IMMUNOSUPPRESSION IN LONG-TERM LIVER TRANSPLANT RECIPIENTS. *Transplantation*. 1995 Jan 27; 59(2): 212–217.
- Rebollo Bernardez J, Cifuentes Mimoso C, Pinar Moreno A, et al. Deflazacort for long-term maintenance of remission in type I autoimmune hepatitis. *Rev Esp Enferm Dig* 1999;91:630-638
- Rieux-Laucat F, Magérus A, Neven B. The Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome with Defective FAS or FAS-Ligand Functions. *J Clin Immunol*. 2018 Jul;38(5):558-568.
- Robertson DA, Zhang SL, Guy EC, Et al. Persistent measles virus genome in autoimmune chronic active hepatitis. *Lancet*. 1987 Jul 4;2(8549):9-11.
- Rodríguez-García ME, Cotrina-Vinagre FJ, Bellusci M, et al. A novel de novo MTOR gain-of-function variant in a patient with Smith-Kingsmore syndrome and Antiphospholipid syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2019 Sep;27(9):1369-1378.
- Rogala KB, Gu X, Kedir JF, et al. Structural basis for the docking of mTORC1 on the lysosomal surface. *Science*. 2019 Oct 25;366(6464):468-475.
- Rogart JN, Iyer A, Robert M, et al. Type I autoimmune hepatitis presenting with acute liver failure in the setting of wild mushroom ingestion. *J Clin Gastroenterol*. 2008 Jul;42(6):662-6.
- Rojas M, Restrepo-Jiménez P, Monsalve DM, et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2018 Dec;95:100-123.
- Romani N, Kämpgen E, Koch F, et al. Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines. *Int Rev Immunol*. 1990;6(2-3):151-61.
- Rose N, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today*. 1993 Sep;14(9):426-30.
- Roskoski R Jr. Properties of FDA-approved small molecule phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors prescribed for the treatment of malignancies. *Pharmacol Res*. 2021 Jun;168:105579.
- Rossjohn J, Gras S, Miles JJ, et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu Rev Immunol*. 2015;33:169-200.
- Rouvière H, Delmas A. Anatomie humaine descriptive, topographique et fonctionnelle. 11^e édition révisée et augmentée. Tome II – Tronc. 1978.

- Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, et al. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2014 May;10(5):593-619
- Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, et al. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008 May 30;133(5):775-87.
- Santana MA, Esquivel-Guadarrama F. Cell biology of T cell activation and differentiation. *Int Rev Cytol*. 2006;250:217-74.
- Sato T, Nakashima A, Guo L, et al. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010 May 6;29(18):2746-52.
- Sebode M, Weiler-Normann C, Liwinski T, et al. Autoantibodies in Autoimmune Liver Disease-Clinical and Diagnostic Relevance. *Front Immunol*. 2018 Mar 27;9:609.
- Sedda S, Dinallo V, Marafini I, et al. mTOR sustains inflammatory response in celiac disease. *Sci Rep*. 2020 Jul 1;10(1):10798.
- Selmi C, Generali E, Gershmi ME. Rheumatic manifestations in autoimmune liver disease. *Rheum Dis Clin North Am*, 2018;44:65-87
- Sewell AK. Why must T cells be cross-reactive? *Nat Rev Immunol*. 2012 Sep;12(9):669-77.
- Shah A, Barrientos JC. Oral PI3K- δ,γ Inhibitor for the Management of People with Chronic Lymphocytic Leukemia and Small Lymphocytic Lymphoma: A Narrative Review on Duvelisib. *Onco Targets Ther*. 2021 Mar 25;14:2109-2119.
- Singh N, Birkenbach M, Caza T, et al. Tuberous sclerosis and fulminant lupus in a young woman. *J Clin Rheumatol*. 2013 Apr;19(3):134-7.
- Soma-Nagae T, Nada S, Kitagawa M, et al. The lysosomal signaling anchor p18/LAMTOR1 controls epidermal development by regulating lysosome-mediated catabolic processes. *J Cell Sci*. 2013 Aug 15;126(Pt 16):3575-84.
- Song P, Wang W, Tao G, et al. A miR-29c binding site genetic variant in the 3'-untranslated region of LAMTOR3 gene is associated with gastric cancer risk. *Biomed Pharmacother*. 2015 Feb;69:70-5.
- Sørensen KK, Simon-Santamaria J, McCuskey RS, Smedsrød B. Liver Sinusoidal Endothelial Cells. *Compr Physiol*. 2015 Sep 20;5(4):1751-74.
- Spaan I, Timmerman LM, Kimman T, et al. Direct P70S6K1 inhibition to replace dexamethasone in synergistic combination with MCL-1 inhibition in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2021 Jun 22;5(12):2593-2607.
- Stanfield RL, Wilson IA. Antibody Structure. *Microbiol Spectr*. 2014 Apr;2(2)
- Stechemesser E, Klein R. & Berg PA. Characterization and clinical relevance of liver-pancreas antibodies in autoimmune hepatitis. *Hepatology* 1993;18, 1–9
- Strassburg CP, Manns MP. Therapy of autoimmune hepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011 Dec;25(6):673-87.

- Su MY, Morris KL, Kim DJ, et al. Hybrid Structure of the RagA/C-Ragulator mTORC1 Activation Complex. *Mol Cell*. 2017 Dec 7;68(5):835-846.e3.
- Sudarshan S, Kumar M, Kaur P, et al. Decoding of novel missense TSC2 gene variants using in-silico methods. *BMC Med Genet*. 2019 Oct 26;20(1):164.
- Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, et al. Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. *Stem Cell Reports*. 2016 Oct 11;7(4):619-634.
- Sugita S, Futatsugi Y, Ishida M, et al. Retinal Pigment Epithelial Cells Derived from Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Suppress or Activate T Cells via Costimulatory Signals. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 5;21(18):6507.
- Sun J, Liu Y, Jia Y, et al. UBE3A-mediated p18/LAMTOR1 ubiquitination and degradation regulate mTORC1 activity and synaptic plasticity. *Elife*. 2018 Jul 18;7:e37993.
- Tabak F, Ozdemir F, Tabak O, et al. Autoimmune hepatitis induced by the prolonged hepatitis A virus infection. *Ann Hepatol*. Apr-Jun 2008;7(2):177-9.
- Tafur L, Kefauver J, Loewith R. Structural Insights into TOR Signaling. *Genes (Basel)*. 2020 Aug 4;11(8):885.
- Takaba H, Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus. *Trends Immunol*. 2017 Nov;38(11):805-816.
- Takahashi A, Arinaga-Hino T, Ohira H, et al; Autoimmune Hepatitis Study Group-Subgroup of the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group in Japan. Autoimmune hepatitis in Japan: trends in a nationwide survey. *J Gastroenterol*. 2017 May;52(5):631-640.
- Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, et al. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5498-503.
- Tamas P, Hawkey SA, Clarke RG, et al. Regulation of the energy sensor AMP-activated protein kinase by antigen receptor and Ca²⁺ in T lymphocytes. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1665-70.
- Tanaka S, Baba Y. B Cell Receptor Signaling. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1254:23-36.
- Tang P, Upton JEM, Barton-Forbes MA, et al. Autosomal Recessive Agammaglobulinemia Due to a Homozygous Mutation in PIK3R1. *J Clin Immunol*. 2018 Jan;38(1):88-95.
- 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
- Tiegs G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastroenterol Belg*. 1997 Apr-Jun;60(2):176-9.
- Tiniakos DG, et al. Role of Histopathology in Autoimmune Hepatitis. *Dig Dis*. 2015;33 Suppl 2:53-64.
- Tenca A, Färkkilä M, Jalanko H, et al. Environmental Risk Factors of Pediatric-Onset Primary Sclerosing Cholangitis and Autoimmune Hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 Mar;62(3):437-42.

- Terziroli Beretta-Piccoli B, Invernizzi P, Gershwin ME, et al. Skin manifestations associated with autoimmune liver diseases: a systematic review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017;53:394-412
- Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *Eur J Intern Med*. 2018 Feb;48:35-43.
- Teufel A, Weinmann A, Kahaly GJ, et al. Concurrent autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis. *J Clin Gastroenterol*. 2010 Mar;44(3):208-13.
- Theofilopoulos AN, Kono DH, Baccala R. The Multiple Pathways to Autoimmunity. *Nat Immunol*. 2017 Jun 20; 18(7): 716–724.
- Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):324-37.
- Thomson H, Li X, Sundquist K, et al. Familial associations between autoimmune hepatitis and primary biliary cholangitis and other autoimmune diseases. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0240794.
- Thouenon R, Moreno-Corona N, Poggi L, et al. Activated PI3Kinase Delta Syndrome-A Multifaceted Disease. *Front Pediatr*. 2021 Jun 25;9:652405.
- Tokunaga R, Cao S, Naseem M, et al. AMPK variant, a candidate of novel predictor for chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis using TRIBE, MAVERICC and FIRE3. *Int J Cancer*. 2019 Oct 15;145(8):2082-2090.
- Toyoda-Akui M, Yokomori H, Kaneko F, et al. Association of an overlap syndrome of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis with cytomegalovirus infection. *Int J Gen Med* 2011;4:397–402.
- Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase δ syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10.
- Turner MS, Kane LP, Morel PA. Dominant role of antigen dose in CD4+Foxp3+ regulatory T cell induction and expansion. *J Immunol*. 2009 Oct 15;183(8):4895-903.
- Vallejo-Díaz J, Chagoyen M, Olazabal-Morán M, et al. The Opposing Roles of PIK3R1/p85 α and PIK3R2/p85 β in Cancer. *Trends Cancer*. 2019 Apr;5(4):233-244
- Vallion R, Divoux J, Glauzy S, et al. Regulatory T Cell Stability and Migration Are Dependent on mTOR. *J Immunol*. 2020 Oct 1;205(7):1799-1809.
- Valvezan AJ, Manning BD. Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. *Nat Metab*. 2019 Mar;1(3):321-333.
- Vandenbroeck K. Cytokine gene polymorphisms and human autoimmune disease in the era of genome-wide association studies. *J Interferon Cytokine Res*. 2012 Apr;32(4):139-51.
- Vanderlugt CJ, Miller SD. Epitope spreading. *Curr Opin Immunol* 1996;8:831–836

- van Gerven NM, Verwer BJ, Witte BI, et al. Relapse is almost universal after withdrawal of immunosuppressive medication in patients with autoimmune hepatitis in remission. *J Hepatol*. 2013 Jan;58(1):141-7.
- Van Gerven NMF, Verwer BJ, Witte BI, et al. Epidemiology and clinical characteristics of autoimmune hepatitis in the Netherlands. *Scand J Gastroenterol*. 2014 Oct;49(10):1245-54.
- Van Thiel DH, Wright H, Carroll P, et al. Tacrolimus: a potential new treatment for autoimmune chronic active hepatitis: results of an open-label preliminary trial. *Am J Gastroenterol* 1995;90:771-776
- Venselaar H, Te Beek TAH, Kuipers RKP, et al. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010;11:548.
- Vento S, Guella L, Mirandola F, et al. Epstein-Barr virus as a trigger for autoimmune hepatitis in susceptible individuals. *Lancet*. 1995 Sep 2;346(8975):608-9.
- Vento S, Cainelli F, Renzini C, et al. Autoimmune hepatitis type 2 induced by HCV and persisting after viral clearance. *Lancet*. 1997 Nov 1;350(9087):1298-9.
- Vento S, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmun Rev* 2004;3:61–69.
- Vergani D, Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G. A reasoned approach to the treatment of autoimmune hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2021 Jun 21:S1590-8658(21)00307-8.
- Verthelyi D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. *Int Immunopharmacol* 2001;1:983–993
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, et al. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*. 2012 Jan 13;90(1):7-24.
- Vogel A, Heinrich E, Bahr MJ, et al. Long-term outcome of liver transplantation for autoimmune hepatitis. *Clin Transplant*. 2004 Feb;18(1):62-9.
- Waldenstrom J. Liver, blood proteins and food proteins [German]. *Dtsch. Z. Verdau. Stoffwechselkr*. 1952;12, 113–121.
- Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2541-50.
- Wang R, Green DR. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat Immunol*. 2012 Oct;13(10):907-15.
- Wang L, Wang FS, Gershwin ME. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. *J Intern Med*. 2015 Oct;278(4):369-95.
- Wang H, Liu Y, Wang D, et al. The Upstream Pathway of mTOR-Mediated Autophagy in Liver Diseases. *Cells*. 2019 Dec 9;8(12):1597.
- Wang Y, Liu J, Burrows PD, et al. B Cell Development and Maturation. *Adv Exp Med Biol*. 2020;1254:1-22.

- Webb GJ, Hirschfield GM. Using GWAS to identify genetic predisposition in hepatic autoimmunity. *J Autoimmun*. 2016 Jan;66:25-39.
- Webb G, Chen YY, Li KK. Single-gene association between GATA-2 and autoimmune hepatitis: A novel genetic insight highlighting immunologic pathways to disease. *J Hepatol*. 2016 May;64(5):1190-1193.
- Webb GJ, Hirschfield GM, Krawitt EL, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Autoimmune Hepatitis. *Annu Rev Pathol*. 2018 Jan 24;13:247-292.
- Wei Y, Li Y, Yan L, et al. Alterations of gut microbiome in autoimmune hepatitis. *Gut*. 2020 Mar;69(3):569-577.
- Weichhart T, Costantino G, Poglitsch M, et al. The TSC-mTOR signaling pathway regulates the innate inflammatory response. *Immunity*. 2008 Oct 17;29(4):565-77.
- Wilbe M, Kozyrev SV, Farias FH, et al. Multiple Changes of Gene Expression and Function Reveal Genomic and Phenotypic Complexity in SLE-like Disease. *PLoS Genet*. 2015 Jun 9;11(6):e1005248.
- Wong GW, Yeong T, Lawrence D, et al. Concurrent extrahepatic autoimmunity in autoimmune hepatitis: implications for diagnosis, clinical course and long-term outcomes. *Liver Int*. 2017 Mar;37(3):449-457.
- Wofford JA, Wieman HL, Jacobs SR, et al. IL-7 promotes Glut1 trafficking and glucose uptake via STAT5-mediated activation of Akt to support T-cell survival. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2101-11.
- Xiao X, Chang C. Diagnosis and classification of drug-induced autoimmunity (DIA). *J Autoimmun*. 2014;48-49:66-72.
- Xu KF, Xu W, Liu S, et al. Lymphangiomyomatosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020 Apr;41(2):256-268.
- Yan S, Wang L, Liu N, et al. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol*. 2012 Apr;90(4):421-8.
- Yan Y, Zhou XE, Xu HE, et al. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 9;19(11):3534.
- Yang K, Neale G, Green DR, et al. The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function. *Nat Immunol*. 2011 Jul 17;12(9):888-97.
- Yang H, Rudge DG, Koos JD, et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. 2013 May 9;497(7448):217-23.
- Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, et al. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 2013;45:217-226
- Yang H, Yu Z, Chen X, et al. Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. *Nat Commun*. 2021 Jan 12;12(1):339.
- Ying L, Zhang M, Ma X, et al. Macrophage LAMTOR1 Deficiency Prevents Dietary Obesity and Insulin Resistance Through Inflammation-Induced Energy Expenditure. *Front Cell Dev Biol*. 2021 May 20;9:672032.

- Yonehara R, Nada S, Nakai T, et al. Structural basis for the assembly of the Ragulator-Rag GTPase complex. *Nat Commun*. 2017 Nov 20;8(1):1625.
- Yousefi A, Mahmoudi E, Bidoki A, et al. IL4 gene polymorphisms in Iranian patients with autoimmune hepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;10(5):659-63.
- Yousefi A, Mahmodi E, Noveiry BB, et al. Autoimmune hepatitis association with single nucleotide polymorphism of interleukin-2, but not interferon-gamma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2018 Apr;42(2):134-138.
- Yousefi A, Najafi M, Motamed F, et al. Association of Interleukin-6 and Interleukin-1 Family Gene Polymorphisms in Autoimmune Hepatitis. *Ann Hepatol*. 2018 Oct 16;17(6):1021-1025.
- Yousefi A, Bidoki AZ, Shafioyoun A, et al. Association of IL-10 and TGF-beta cytokine gene polymorphisms with autoimmune hepatitis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2019 Feb;43(1):45-50.
- Yu S, Nakafusa Y, Flye MW. Portal vein administration of donor cells promotes peripheral allospecific hyporesponsiveness and graft tolerance. *Surgery*. 1994 Aug;116(2):229-34; discussion 234-5.
- Yuan F, Zhang W, Mu D, et al. Kupffer cells in immune activation and tolerance toward HBV/HCV infection. *Adv Clin Exp Med*. 2017 Jul;26(4):739-745.
- Yüksel M, Laukens D, Heindryckx F, et al. Hepatitis mouse models: from acute-to-chronic autoimmune hepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2014 Oct;95(5):309-20.
- Ytting H, Larsen FS. Everolimus treatment for patients with autoimmune hepatitis and poor response to standard therapy and drug alternatives in use. *Scand J Gastroenterol*. 2015;50(8):1025-1031
- Zanger UM, Hauri HP, Loeper J, et al. Antibodies against human cytochrome P-450db1 in autoimmune hepatitis type II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(21):8256-60.
- Zeng H, Yang K, Cloer C, et al. mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature*. 2013 Jul 25;499(7459):485-90.
- Zhang P, Lu Q. Genetic and epigenetic influences on the loss of tolerance in autoimmunity. *Cell Mol Immunol*. 2018 Jun;15(6):575-585.
- 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 Apr 19;6(4):e18909.
- Zheng Y, Collins SL, Lutz MA, et al. A role for mammalian target of rapamycin in regulating T cell activation versus anergy. *J Immunol*. 2007 Feb 15;178(4):2163-70.
- Zheng M, Tian Z. Liver-Mediated Adaptive Immune Tolerance. *Front Immunol* 2019;10:2525.
- Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2007 Mar;81(3):584-92

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Système immunitaire inné et adaptatif	16
Figure 2. Développement des lymphocytes.....	23
Figure 3. Mécanismes de la tolérance immunitaire.....	27
Figure 4. Hépatite auto-immune : Répartition et prédisposition dans le monde.....	38
Figure 5. Modèle proposé de la physiopathologie de l'hépatite auto-immune.....	47
Figure 6. Caractéristiques histologiques de l'hépatite auto-immune	61
Figure 7. Interactions entre le foie et les agents extérieurs.....	75
Figure 8. Interactions entre le foie et le système immunitaire	82
Figure 9. Structure de mTORC1	95
Figure 10. La voie de signalisation mTORC1	100
Figure 11. mTORC1 dans les réponses immunitaires	108
Figure 12. Validation de la présence des variants-candidats par la méthode de séquençage de type Sanger.....	147
Figure 13. Ségrégation familiale des variants-candidats	148
Figure 14. Position des variants-candidats sur chaque protéine	149
Figure 15. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de l'activateur RagC ^{P87T}	151
Figure 16. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur AMPK γ 1 ^{V65L/V317M}	153
Figure 17. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de l'activateur Ragulator par LAMTOR1 ^{R147C} et LAMTOR3 ^{Y74C}	155
Figure 18. Hypothèse fonctionnelle : gain-de-fonction de la kinase mTOR ^{E285V}	157
Figure 19. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur p85 α ^{E297K}	159
Figure 20. Hypothèse fonctionnelle : perte-de-fonction de l'inhibiteur TSC2 ^{I364V} et TSC2 ^{I610V}	161
Figure 21. Proportion des différentes populations de lymphocytes T.....	163
Figure 22. Marqueurs intra-cellulaires associés à la fonction des T régulateurs	165
Figure 23. Dosage plasmatique des cytokines	167
Figure 24. Détection d'auto-antigènes plasmatiques.....	169
Figure 25. Techniques, conditions et types cellulaires utilisés pour l'étude de l'activité de mTORC1.....	171
Figure 26. Activation excessive de la voie mTORC1 dans les cellules mononucléées circulantes sanguines des patients porteurs de variants-candidats	173

Figure 27. Activation excessive de la voie mTORC1 en condition de sevrage en acides aminés dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats	176
Figure 28. Activation identique de la voie mTORC1 après stimulation par IL-2 dans les lymphoblastes T porteurs de variants-candidats par rapport aux individus sains.....	178
Figure 29. Activation excessive de la voie mTORC1 après stimulation par OKT-3 dans les lymphoblastes T des patients porteurs de variants-candidats	180
Figure 30. Inhibition de l'activation excessive de la voie mTORC1 par les inhibiteurs de mTOR dans les lymphoblastes T porteurs de variants-candidats stimulés par OKT-3.....	182
Figure 31. Activation excessive de la voie mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur du variant-candidat RagC ^{P87T}	185
Figure 32. Inhibition de l'activité de la voie mTORC1 dans les lymphoblastes B immortalisés du patient porteur du variant-candidat RagC ^{P87T}	187
Figure 33. Poly-auto-immunité individuelle.....	190
Figure 34. Auto-anticorps associés	190
Figure 35. Répartition des anticorps spécifiques d'HAI	192
Figure 36. Prévalence de l'hépatite aigue au diagnostic.....	192
Figure 37. Synthèse des mutations de la voie mTORC1 identifiées dans la cohorte d'étude	200
Figure 38. Lignée iPS issue des cellules sanguines porteuses des variants de PRKAG1	239

ANNEXES

ANNEXE 1 : LISTES DE GENES RESPONSABLES DE DEFICITS IMMUNITAIRES PRIMITIFS

A. Liste actualisée des gènes responsables de déficits immunitaires primitifs

<i>ACD</i>	<i>CD8A</i>	<i>GIMAP6</i>	<i>LCK</i>	<i>POLE2</i>	<i>STAT4</i>
<i>ACP5</i>	<i>CDC42</i>	<i>GIN51</i>	<i>LIG1</i>	<i>POMP</i>	<i>STAT5B</i>
<i>ACTB</i>	<i>CDC47</i>	<i>HAVCR2</i>	<i>LIG4</i>	<i>PRF1</i>	<i>STIM1</i>
<i>ACTN1</i>	<i>CDH17</i>	<i>HAX1</i>	<i>LIPA</i>	<i>PRKCD</i>	<i>STING1</i>
<i>ADA</i>	<i>CEBPE</i>	<i>HELLS</i>	<i>LPIN2</i>	<i>PRKDC</i>	<i>STK4</i>
<i>ADA2</i>	<i>CFB</i>	<i>NCKAP1L</i>	<i>LRBA</i>	<i>PSMB10</i>	<i>STN1</i>
<i>ADAM17</i>	<i>CFD</i>	<i>HYOU1</i>	<i>LYST</i>	<i>PSMB2</i>	<i>STX11</i>
<i>ADAR</i>	<i>CFH</i>	<i>ICOS</i>	<i>MAGT1</i>	<i>PSMB8</i>	<i>STXBP2</i>
<i>AICDA</i>	<i>CFHR1</i>	<i>ICOSLG</i>	<i>MALT1</i>	<i>PSMG2</i>	<i>STXBP3</i>
<i>AIRE</i>	<i>CFI</i>	<i>IFIH1</i>	<i>MAN2B2</i>	<i>PSTPIP1</i>	<i>TALDO1</i>
<i>AK2</i>	<i>CFP</i>	<i>IFNAR1</i>	<i>MAP3K14</i>	<i>PTCRA</i>	<i>TAP1</i>
<i>ALPI</i>	<i>CHD7</i>	<i>IFNAR2</i>	<i>MAPK8</i>	<i>PTEN</i>	<i>TAP2</i>
<i>AP3B1</i>	<i>CHUK</i>	<i>IFNG</i>	<i>MASP1</i>	<i>PTPRC</i>	<i>TAPBP</i>
<i>AP3D1</i>	<i>CIB1</i>	<i>IFNGR1</i>	<i>MASP2</i>	<i>RAB27A</i>	<i>TAZ</i>
<i>APOL1</i>	<i>CITTA</i>	<i>IFNGR2</i>	<i>MBL2</i>	<i>RAC1</i>	<i>TBK1</i>
<i>ARHGEF1</i>	<i>SH3KBP1</i>	<i>IGHM</i>	<i>MCM4</i>	<i>RAC2</i>	<i>TBX1</i>
<i>ARPC1B</i>	<i>CLPB</i>	<i>IGKC</i>	<i>MEFV</i>	<i>RAG1</i>	<i>TBX21</i>
<i>ATM</i>	<i>COLEC11</i>	<i>IGLL1</i>	<i>MRTFA</i>	<i>RAG2</i>	<i>TCF3</i>
<i>B2M</i>	<i>COPA</i>	<i>IKBKB</i>	<i>MOGS</i>	<i>RASGRP1</i>	<i>TCN2</i>
<i>BACH2</i>	<i>CORO1A</i>	<i>IKBKG</i>	<i>MPO</i>	<i>RBCK1</i>	<i>TERC</i>
<i>BCL10</i>	<i>CR2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MR1</i>	<i>RC3H1</i>	<i>TERT</i>
<i>BCL11B</i>	<i>CSF2RA</i>	<i>IKZF3</i>	<i>MRE11</i>	<i>KPNA2</i>	<i>TET2</i>
<i>BLM</i>	<i>CSF2RB</i>	<i>IL10</i>	<i>MRTFA</i>	<i>REL</i>	<i>TFRC</i>
<i>BLNK</i>	<i>CSF3R</i>	<i>IL10RA</i>	<i>MS4A1</i>	<i>RELA</i>	<i>TGFB1</i>
<i>BLOC1S6</i>	<i>CTC1</i>	<i>IL10RB</i>	<i>MSH6</i>	<i>RELB</i>	<i>TGFBR1</i>
<i>BTK</i>	<i>CTLA4</i>	<i>IL12B</i>	<i>MSN</i>	<i>RFX5</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>C1QA</i>	<i>CTNBL1</i>	<i>IL12RB1</i>	<i>MTHFD1</i>	<i>RFXANK</i>	<i>THBD</i>
<i>C1QB</i>	<i>CTPS1</i>	<i>IL12RB2</i>	<i>MVK</i>	<i>RFXAP</i>	<i>TICAM1</i>
<i>C1QC</i>	<i>CTSC</i>	<i>IL17A</i>	<i>MYD88</i>	<i>RHOH</i>	<i>TIFA</i>

<i>C1R</i>	<i>CXCR2</i>	<i>IL17F</i>	<i>MYSM1</i>	<i>RIPK1</i>	<i>HAVCR2</i>
<i>C1S</i>	<i>CXCR4</i>	<i>IL17RA</i>	<i>NBAS</i>	<i>CARMIL2</i>	<i>TINF2</i>
<i>C2</i>	<i>CYBA</i>	<i>IL17RC</i>	<i>NBN</i>	<i>RMRP</i>	<i>TLR3</i>
<i>C3</i>	<i>CYBB</i>	<i>IL18</i>	<i>NCF1</i>	<i>RNASEH2A</i>	<i>TMC6</i>
<i>C4A</i>	<i>CYBC1</i>	<i>IL18BP</i>	<i>NCF2</i>	<i>RNASEH2B</i>	<i>TMC8</i>
<i>C4B</i>	<i>DACT1</i>	<i>IL1RN</i>	<i>NCF4</i>	<i>RNASEH2C</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>C5</i>	<i>DBR1</i>	<i>IL21</i>	<i>NCKAP1L</i>	<i>RNASEL</i>	<i>TNFRSF13B</i>
<i>C6</i>	<i>DCLRE1B</i>	<i>IL21R</i>	<i>NFAT5</i>	<i>RNF168</i>	<i>TNFRSF13C</i>
<i>C7</i>	<i>DCLRE1C</i>	<i>IL23R</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>RNF31</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>C8A</i>	<i>DEF6</i>	<i>IL2RA</i>	<i>NFKB1</i>	<i>RNU4ATAC</i>	<i>TNFRSF4</i>
<i>C8B</i>	<i>DGAT1</i>	<i>IL2RB</i>	<i>NFKB2</i>	<i>RORC</i>	<i>TNFRSF9</i>
<i>C8G</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>IL2RG</i>	<i>NFKBLA</i>	<i>RIPK1</i>	<i>TNFSF12</i>
<i>C9</i>	<i>DKC1</i>	<i>IL36RN</i>	<i>NFKBID</i>	<i>RPSA</i>	<i>TNFSF13</i>
<i>CACNA1F</i>	<i>DNAJC21</i>	<i>IL6R</i>	<i>NHEJ1</i>	<i>RTEL1</i>	<i>TOM1</i>
<i>CARD11</i>	<i>DNASE1L3</i>	<i>IL6ST</i>	<i>NHP2</i>	<i>SAMD9</i>	<i>TOP2B</i>
<i>CARD14</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>IL7</i>	<i>NLRC4</i>	<i>SAMD9L</i>	<i>TPP2</i>
<i>CARD8</i>	<i>DOCK11</i>	<i>IL7R</i>	<i>NLRP1</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>TRAC</i>
<i>CARD9</i>	<i>DOCK2</i>	<i>INO80</i>	<i>NLRP12</i>	<i>SBDS</i>	<i>TRAF3</i>
<i>CARMIL2</i>	<i>DOCK8</i>	<i>IRAK1</i>	<i>NLRP2</i>	<i>SEC61A1</i>	<i>TRAF3IP2</i>
<i>CASP10</i>	<i>DSG1</i>	<i>IRAK4</i>	<i>NLRP3</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>TREX1</i>
<i>CASP8</i>	<i>ELANE</i>	<i>IRF1</i>	<i>NOD2</i>	<i>SERPING1</i>	<i>TRIM22</i>
<i>CCBE1</i>	<i>EOMES</i>	<i>IRF2BP2</i>	<i>NOP10</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TRNT1</i>
<i>TNFSF9</i>	<i>EPG5</i>	<i>IRF3</i>	<i>NOS2</i>	<i>SH3BP2</i>	<i>TTC37</i>
<i>FCGR3A</i>	<i>ERBIN</i>	<i>IRF4</i>	<i>NRAS</i>	<i>SH3KBP1</i>	<i>TTC7A</i>
<i>CD19</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>IRF7</i>	<i>NSMCE3</i>	<i>SHARPIN</i>	<i>TYK2</i>
<i>CD244</i>	<i>EXTL3</i>	<i>IRF8</i>	<i>OAS1</i>	<i>SKIV2L</i>	<i>UNC119</i>
<i>CD247</i>	<i>FAAP24</i>	<i>IRF9</i>	<i>ORAI1</i>	<i>SLC11A1</i>	<i>UNC13D</i>
<i>CD27</i>	<i>FADD</i>	<i>ISG15</i>	<i>OTULIN</i>	<i>SLC29A3</i>	<i>UNC93B1</i>
<i>CD28</i>	<i>FAS</i>	<i>ITCH</i>	<i>PARN</i>	<i>SLC35C1</i>	<i>UNG</i>
<i>CD3D</i>	<i>FASLG</i>	<i>ITGAX</i>	<i>PAX1</i>	<i>SLC39A7</i>	<i>USB1</i>
<i>CD3E</i>	<i>FCHO1</i>	<i>ITGB2</i>	<i>PAX5</i>	<i>SLC46A1</i>	<i>USP18</i>
<i>CD3G</i>	<i>FCN3</i>	<i>ITK</i>	<i>PCNA</i>	<i>SLC7A7</i>	<i>VPS13B</i>
<i>CD4</i>	<i>FERMT1</i>	<i>ITPKB</i>	<i>PGM3</i>	<i>SMARCA11</i>	<i>VPS45</i>
<i>CD40</i>	<i>FERMT3</i>	<i>JAGN1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SNORA31</i>	<i>WAS</i>
<i>CD40LG</i>	<i>FNIP1</i>	<i>JAK1</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>SOC31</i>	<i>WASF2</i>
<i>CD46</i>	<i>FOXP1</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>SP110</i>	<i>WIPF1</i>
<i>CD48</i>	<i>FOXP3</i>	<i>JAK3</i>	<i>PLCG2</i>	<i>SPI1</i>	<i>WDR1</i>
<i>CD55</i>	<i>FPR1</i>	<i>MAPK8</i>	<i>PMS2</i>	<i>SPINK5</i>	<i>XLAP</i>
<i>CD59</i>	<i>G6PC3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PNP</i>	<i>SPPL2A</i>	<i>XRCC4</i>
<i>CD70</i>	<i>G6PD</i>	<i>KMT2A</i>	<i>POLA1</i>	<i>SRP54</i>	<i>ZAP70</i>

<i>CD79A</i>	<i>GATA2</i>	<i>KMT2D</i>	<i>POLD1</i>	<i>STAT1</i>	<i>ZBTB24</i>
<i>CD79B</i>	<i>GFI1</i>	<i>KRAS</i>	<i>POLD2</i>	<i>STAT2</i>	<i>ZNF341</i>
<i>CD81</i>	<i>GIMAP5</i>	<i>LAT</i>	<i>POLE</i>	<i>STAT3</i>	

B. Liste actualisée des gènes responsables de déficits immunitaires primitifs AL-PID

<i>FAS</i>	<i>SETBP1</i>	<i>STXBP2</i>	<i>IL2RA</i>	<i>SOCS1</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKBKA</i>
<i>FASLG</i>	<i>ASXL1</i>	<i>MYO5A</i>	<i>IL2RB</i>	<i>SOCS2</i>	<i>IKZF2</i>	<i>IKBKB</i>
<i>FADD</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>RAB27A</i>	<i>JAK1</i>	<i>SOCS3</i>	<i>IKZF3</i>	<i>IKBKG</i>
<i>CASP10</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>JAK2</i>	<i>SOCS5</i>	<i>IKZF4</i>	<i>NFKBLA</i>
<i>CASP8</i>	<i>CTLA4</i>	<i>XLAP</i>	<i>JAK3</i>	<i>PLAS3</i>	<i>AIRE</i>	<i>NFKBIB</i>
<i>NRAS</i>	<i>LRBA</i>	<i>WAS</i>	<i>STAT1</i>	<i>NFATC1</i>	<i>FOXP3</i>	<i>REL</i>
<i>KRAS</i>	<i>NBEAL2</i>	<i>RAG1</i>	<i>STAT2</i>	<i>NFATC2</i>	<i>ADA2</i>	<i>RELA</i>
<i>HRAS</i>	<i>PRF1</i>	<i>RAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>NFATC3</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>RELB</i>
<i>PTPN11</i>	<i>UNC13D</i>	<i>TPP2</i>	<i>STAT5B</i>	<i>NFATC4</i>	<i>SHARPIN</i>	<i>NFKB1</i>
<i>CBL</i>	<i>STX11</i>	<i>CARD11</i>	<i>STAT6</i>	<i>NFAT5</i>		<i>NFKB2</i>

ANNEXE 2 : AMORCES POUR SEQUENÇAGE DE TYPE SANGER

Gène	Exon	Forward (3' -> 5')	Reverse (3' -> 5')
<i>RRAGC</i>	2	GAG-CCT-GAG-GTA-GGC- ATT-CA	GAG-ATG-CAG-TTG-CAG- AGT-GC
<i>PRKAG1</i>	3	CTG-CAG-GTG-GGT-GAA- ATC-CT	GGA-GAC-AAG-CTT-CAG- GCA-GT
<i>PRKAG1</i>	8	AGC-CTT-GAG-AGT-GGG- GTT-TG	TGC-CCT-TCT-ATC-TGG- GAG-CT
<i>LAMTOR1</i>	5	AGG-GTA-TGG-CAG-AGG- GTT-CA	TCA-TCC-AGA-CCC-TGG- TCA-CA
<i>LAMTOR3</i>	5	GGG-CTG-TAA-ATC-TCT- CTA-CCA-T	TTC-AGT-TGT-CAT-TTT- TGT-GCC-T
<i>mTOR</i>	7	AGT-TGC-GTT-TCG-GGA- TTA-GG	GGA-AAG-GGC-CTC-TCA- CCA-C
<i>PIK3R1</i>	7	AGA-TTC-TCA-GCA-GCC- AGG-TAA-G	AGT-TCC-CTG-TAC-CCT- TCA-ACA-TT
<i>TSC2</i>	11	GCC-CCT-GAT-AAA-CGT- GTG-GT	TGC-CAG-AAC-CGT-GTT- CTC-TG
<i>TSC2</i>	17	GCT-GTC-TTA-GGA-CTG- CGT-TT	AGG-TAT-CCC-CGT-CTC- GGC

LAMTOR: Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator; mTOR: mechanistic target of rapamycin; PIK3R1: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1; PRKAG1: protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1; RRAGC: Ras-related GTP-binding protein C; TSC2: Tuberous Sclerosis Complex 2.

ANNEXE 3 : LISTE DES 128 AUTO-ANTIGENES RECHERCHES

DANS LE PLASMA

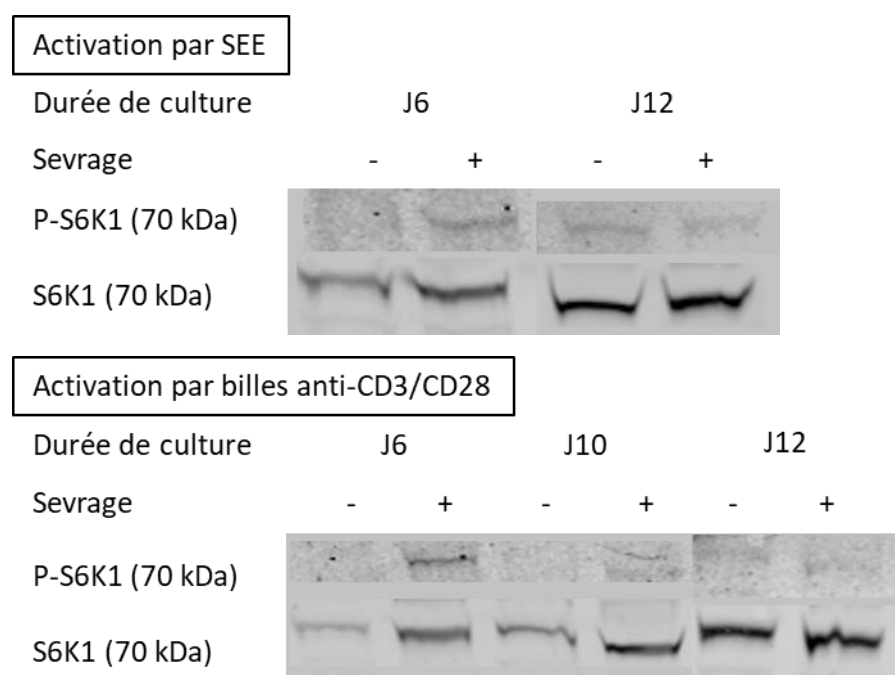
Catégorie	Cible antigénique	Pathologie associée
Antigènes nucléaires	ADN double-brin, ADN génomique, ADN simple-brin	LES
	Nucléosome, chromatine	LES
	<i>Core histone</i> , histones (H1, H2A, H2B, H3, H4)	LES
	Scl-70, ADN topoisomérase I	Sclérodémie systémique
	Centromères : CENP-A, CENP-B	Sclérodémie systémique
	PCNA, Ku (P70/P80)	LES
	Mi-2 (composant du nucléosome), TIF1/TRIM33, MDA5/IFIH1	Dermatomyosite
	SP100	CBP
	ARN simple-brin	LES
	Antigènes du syndrome de Gougerot-Sjögren (Ro/SSA, 52 kDa, Ro/SSA, 60 kDa, La/SSB)	SGS
	Antigène Smith : Sm, Sm/RNP, SmD, SmD1, SmD2, SmD3	LES
	U1-snRNP 68/70, U1-snRNP A, B/B' et C	Connectivites
	Exosome nucléaire : PM/Scl-75 et PM/Scl 100	Sclérodémie systémique
	Nucléoline (C23)	
	Phosphoprotéines ribosomales : P0, P1, P2	
	Histidyl-tRNA synthétase (Jo-1), thréonyl-tRNA synthétase (PL-7), alanyl-tRNA synthétase (PL-12)	Dermatomyosite
	SRP54	
	POLB	
Protéines membranaires et cytoplasmiques	ANCA : MPO, PR3 et BPI	
	LKM-1, LC-1	HAI de type 2
	Cytochrome C	LES
	M2, antigène mitochondrial	CBP
	TTG	Pathologie cœliaque
	Beta2-microglobuline	LES, PR
	Protéoglycanes : aggrécane, alpha-fodrine, chondroïtine sulfate C, décorine-bovin, héparane sulfate, HSPG, protéoglycane	

Catégorie	Cible antigénique	Pathologie associée
	Récepteur muscarinique Myosine Vimentine	Myasthénie
Antigènes associés à la membrane nucléaire	gp210, Nup 62	
Protéines de la matrice cellulaire	Collagènes (I, II, III, IV, V, VI) Fibrinogène (IV, S) Fibronectine, vitronectine	Sclérodermie systémique
Phospholipides	Beta2-GP1, cardiolipine, GP2	SAPL
Protéines spécifiques du glomérule	MBG Alpha-actinine, laminine, amyloïde, élastine, matrigel AGTR	Pathologie de Goodpasture
Protéines spécifiques de la thyroïde	Thyroglobuline, thyroperoxydase	Thyroïdite d'Hashimoto
Protéines spécifiques du tube digestif	Gliadine, peptides de gliadine déaminée	Pathologie coeliaque
Protéines spécifiques du système nerveux central	AQP4, protéine basique de la myéline, sphingomyéline	
Protéines microbiennes	Lipopolysaccharides, EBNA1	
Protéines d'agents externes	Entactine EDTA, matrigel	
Protéines circulantes	Complément : C1q, C3, C3a, C4, C5, C6, C7, C8, C9 Facteurs de la coagulation : prothrombine, héparine Facteurs intrinsèques : B, D, H, I, P Facteur intrinsèque Protéines de l'inflammation : CRP, TNF-alpha Albumine glyquée humaine Hémocyanine, peroxiredoxine 1 Insuline DAMP : S100	Pathologie de Biermer Diabète

ANNEXE 4 : MISE AU POINT DES ETUDES PHYSIOLOGIQUES

DE LA VOIE mTORC1

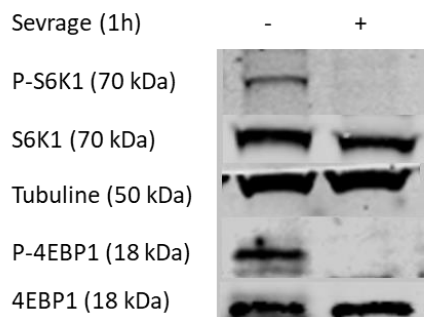
A. Activité de la voie mTORC1 dans différentes stimulations et durées de culture de lymphoblastes T



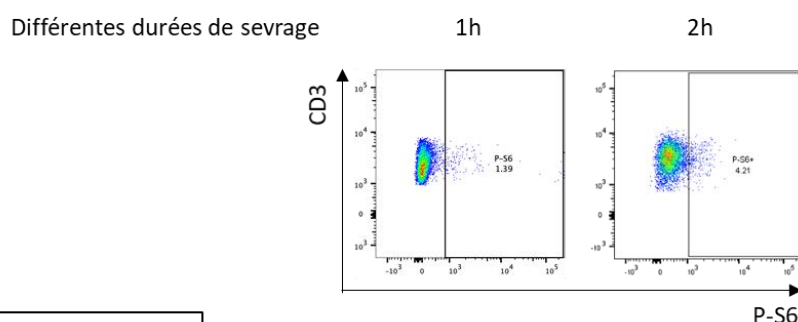
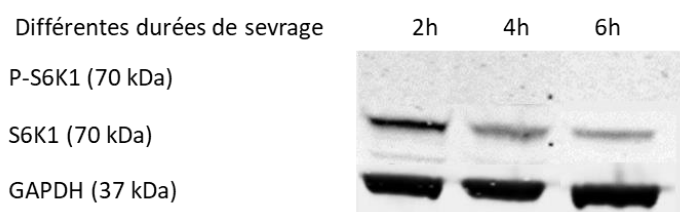
Expression des formes phosphorylées et non phosphorylées de S6K1 détectées par Western-Blot dans le lysat cellulaire total des lymphoblastes T générés soit par activation par superantigène (SEE) soit par billes anti-CD3/CD28 et à différents temps de culture, sevrées (incubation sans acides aminés) ou non (milieu avec facteurs de croissance).

B. Inhibition de la voie mTORC1 avec différentes durées de sevrage dans différentes lignées cellulaires

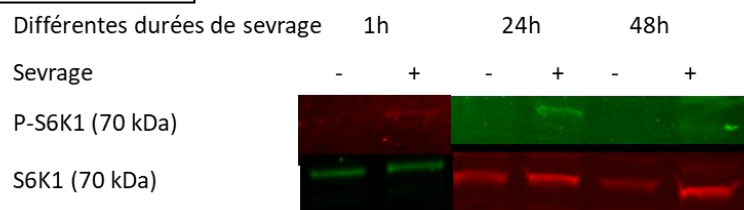
HEK293T



Lymphoblastes T

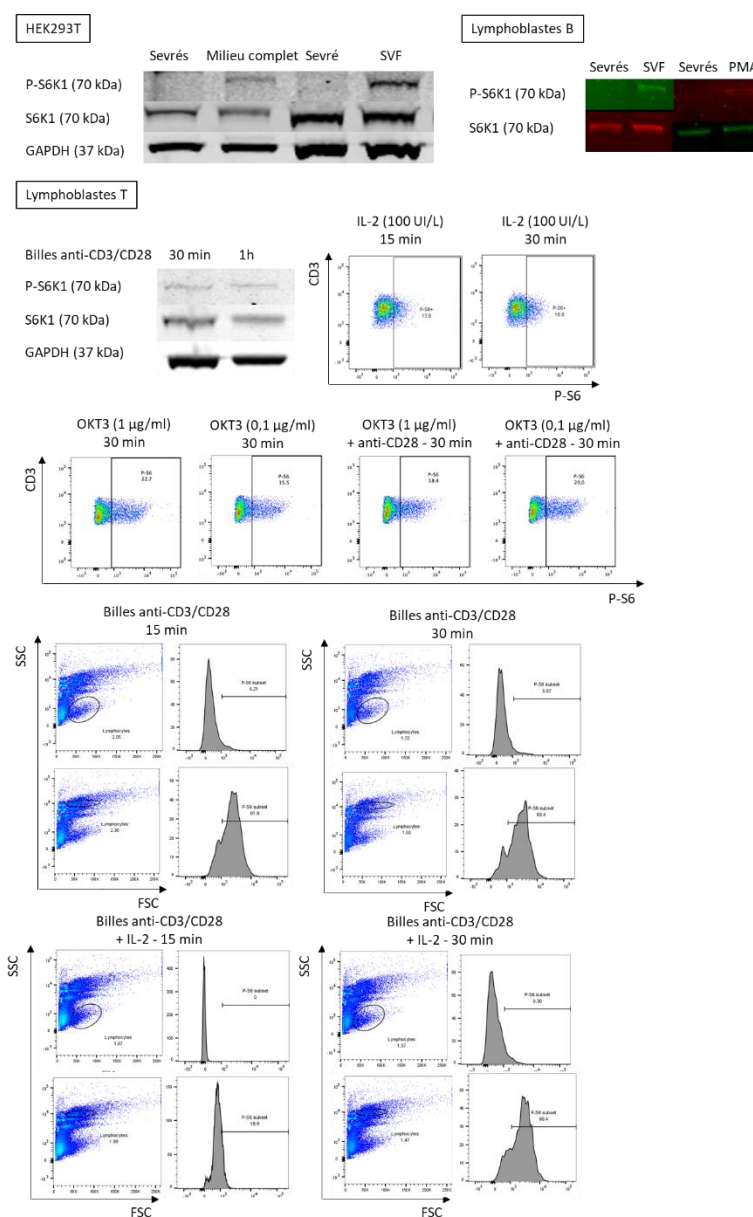


Lymphoblastes B



L'expression des formes phosphorylées ou non de S6K1 est détectée par Western-Blot dans différents types de cellules prolifératives : HEK293T (cellules épithéliales) et lymphoblastes T et B, sevrées (incubation en milieu sans acides aminés, à différents temps) et non sevrées (milieu complet avec facteurs de croissance, cellules en cours de prolifération). L'expression des formes phosphorylées ou non de 4E-BP1 est détectée par Western-Blot dans les HEK293T. La tubuline et le GAPDH servent de témoin de charge. L'expression de la forme phosphorylée de S6 est détectée par cytométrie en flux dans les lymphoblastes T sevrés à différents temps : diagramme de points montrant la proportion de cellules exprimant phospho-S6 parmi les cellules CD3⁺.

C. Stimulation de la voie mTORC1 avec différents *stimuli* et différentes durées de stimulation dans différentes lignées cellulaires



L'expression des formes phosphorylées ou non de S6K1 est détectée par Western-Blot dans différents types de cellules prolifératives : HEK293T (cellules épithéliales) et lymphoblastes T et B, en condition de sevrage et de stimulation par facteurs de croissance (SVF, sérum de veau fœtal), PMA (lymphoblastes B), IL-2 et billes anti-CD3/CD28 (lymphoblastes T). GAPDH sert de témoin de charge. L'expression de phospho-S6 est détectée par cytométrie en flux. Les diagrammes de points présentés montrent les cellules exprimant phospho-S6 parmi les cellules CD3⁺. Après stimulation par IL-2 et OKT-3, on observe un décalage des cellules exprimant phospho-S6. En revanche, après stimulation par billes anti-CD3/CD28, on observe l'apparition de différentes populations cellulaires se présentant à différents niveaux de taille et de granulosité. Lorsqu'on observe chacune de ces populations cellulaires, on constate que les cellules les plus grosses et les plus granuleuses expriment davantage phospho-S6. Cependant, au vu de cette modification de taille et de granulosité provoquée par la stimulation par billes anti-CD3/CD28, celle-ci n'a pas été retenue pour les analyses de ce travail.

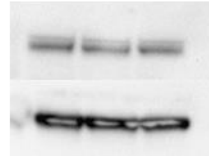
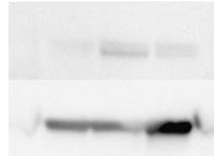
ANNEXE 5 : TAMPONS DE LYSE POUR L'ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE PHOSPHORYLEE S6K1

Tampon de lyse Thermo Scientific™ RIPA

Tampon de lyse TNE/glycérol

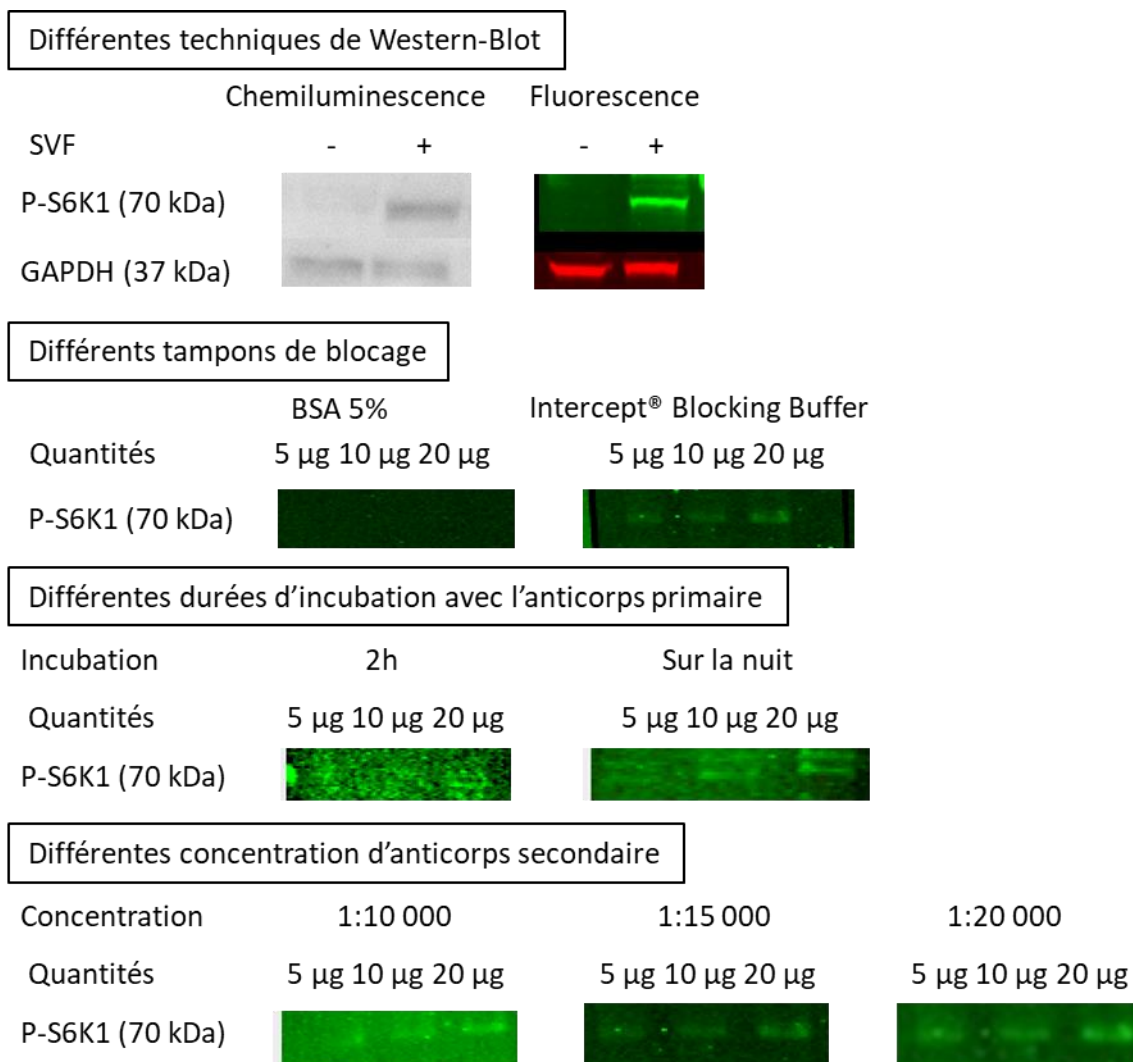
P-S6K1 (70 kDa)

GAPDH (37 kDa)



L'expression de la forme phosphorylée de S6K1 est mieux détectée lorsque les cellules sont lysées dans le tampon TNE/glycérol, comme démontré sur ce Western-Blot. GAPDH sert de témoin de charge.

ANNEXE 6 : MISE AU POINT DE L'ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA PROTEINE PHOSPHORYLEE S6K1



L'expression de la forme phosphorylée de S6K1 est détectée de façon variable selon les techniques de Western-Blot, les tampons de blocage, les durées d'incubation et les concentrations d'anticorps secondaires utilisés.

ANNEXE 7 : SCORES DIAGNOSTIQUES DES PATIENTS INCLUS

DANS LA COHORTE D'ETUDE

A. Résultats des scores pour tous les patients de la cohorte d'étude

Patients	Score de l'IAIHG		Score simplifié	Score de l'EPSGHAN
	Avant traitement	Après traitement		
A	16	18	7	8
B	16	18	6	8
C	24	27	8	11
D	19*	21*	6*	8*
E	20	23	7	9
F	14	17	8	8
G	19	22	8	8
H	20	22	7	8
1	20	23	7	8
2	21	24	8	10
3	21	24	8	9
4	15*	18*	6*	7*
5	20	23	8	8
6	18	21	6	7
7	18*	20*	6*	7*
8	15*	18*	6*	7*
9	18	21	7	10
10	15	17	6	7
11	21	23	8	10
12	20	23	8	11
13	17	19	8	10
14	17*	19*	6*	7*

*Les scores ont été calculés même en l'absence de résultats d'histologie hépatique.

C. Détails des scores diagnostiques des patients porteurs de variants-candidats

Patients		A	B	C	D	E	F	G	H
Score de PIAIHG									
Sexe	Féminin	+2	Masculin	Féminin	Féminin	Féminin	Masculin	Féminin	Féminin
Ratio ALP:AST	>3	-2		38				4.1	
	1.5-3	0	ND						
	<1.5	+2		1.3	0.8	0.9		0.7	0.1
Gammaglobulines ou IgG (nombre de fois la normale)	>2	+3		2.2	2.8				4.9
	1.5-2	+2	1.9					2	
	1-1.5	+1				1.1	1.2		
	<1	0		0.4					
Titres d'anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM-1 ou anti-LC-1	>1:80	+3	Anti-LKM-1 > 1/640	Anti-muscle lisse 1/640	Anti-LKM-1 1/640	Anti-muscle lisse 1/640	Anti-LC-1 1/640	Anti-LC-1 1/100	Anti-LC-1 1/640
	1:80	+2							
	1:40	+1							
	<1:40	0							
Anti-mitochondrie	Positif	-4	-	-	-	-	-	-	-
Marqueurs d'une infection virale active	Positif	-3							
	Négatif	+3	-	-	-	-	-	-	-
Traitements hépatotoxiques	Oui	-4							
	Non	+2	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Consommation moyenne d'alcool	<25g/jour	+2	+	+	+	+	+	+	+
	>60g/jour	-2							
	Hépatite d'interface	+3	+	+	+		+	+	+

Patients			A	B	C	D	E	F	G	H
Caractéristiques histologiques*	Plasmocytes	+1	+	+	+		+			+
	Rosettes	+1								
	Aucun des signes précédent	-5								
	Modifications biliaires ^a	-3	+							+
	Modifications atypiques ^b	-3								
Pathologies auto-immunes		+2	+	+	+	-	+	-	-	+
HLA	DR3/DR4	+1	DR3	ND	DR3	ND	DR3	ND	ND	ND
Anti-SLA/LP, actin, ASGPR, pANNA		+2				Anti-actin				
Score avant traitement	HAI certaine	> 15	16	16	24	19*	20		19	20
	HAI probable	10-15						14		
Réponse au traitement	Rémission	+2	+	+		+				+
	Rechute	+3			+		+	+	+	
Score après traitement	HAI certaine	>17	18	18	27	21*	23		22	22
	HAI probable	12-17						17		

^aIncluant la cholangite granulomateuse, la fibrose concentrique périductulaire, la ductopénie, la prolifération marginale des canaux biliaires et la cholangiolite. ^bToute autre caractéristique en faveur d'une autre étiologie.

Score simplifié										
Anticorps anti-nucléaires	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2								1/1280
Ou anti-muscle lisse	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2		1/640		1/640				
Ou anti-LKM-1 ou anti-LC-1	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2	Anti- LKM-1 > 1/640		Anti- LKM-1 1/640		Anti-LC- 1 1/640	Anti-LC- 1 1/100	Anti-LC- 1 1/640	
Ou SLA	Positif	2								
IgG	>LSN	1		0.4			1.1			
	>1.10 fois la LSN	2	1.9		2.2	2.8		1.2	2	4.9
Histologie hépatique*	Compatible avec HAI	1	1							1
	Typique d'HAI	2		2	2		2	2	2	
Absence d'hépatite virale	Oui	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Score	HAI certaine	≥7	7		8		7	8	8	7
	HAI probable	≥6		6		6*				

Score de l'ESPGHAN										
Max. 2 points pour l'addition d'anticorps anti-nucléaires, anti-muscle lisse, anti-LKM-1, anti-LC-1, anti-SLA	Anti-nucléaires/muscle lisse	1								
	≥1 :20									
	≥1 :80	2			Anti-muscle lisse 1/640		Anti-muscle lisse 1/640			Anti-nucléaire 1/1280
	Anti-LKM-1 ≥1 :10	1								
	≥1 :80	2		> 1/640	1/640					
	Anti-LC-1	2					1/640	1/100	1/640	
	Anti-SLA	2								
pANNA	Positif	1								
IgG	> LSN	1		0.4			1.1	1.2		
	>1.20 LSN	2	1.9		2.2	2.8			2	4.9
Histologie hépatique*	Compatible avec HAI	1	1							1
	Typique d'HAI	2		2	2		2	2	2	
Absence d'autre pathologie hépatique		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Pathologie extra-hépatique	Auto-immunité	1	1	1	1	-	1	-	-	1
Antécédents familiaux	Auto-immunité	1	-	1	-	-	1	1	-	-
Cholangiographie	Normale	2			2	2				
	Anormale	-2								
Score	HAI certaine	≥8	8	8	11	8*	9	8	8	8
	HAI probable	≥7								

ANNEXE 8 : IDENTIFICATION OF mTORC1 PATHWAY AS A KEY PLAYER IN THE MAINTENANCE OF SELF-TOLERANCE IN THE LIVER

Caroline Besnard¹, Sajedah Mirshahvalad¹, Marie-Claude Stolzenberg¹, Mohhammed Zahrate², Amaria Remil³, Emmanuel Gonzales^{3,4}, Dalila Habes³, Sylvie Destombe⁵, Jean-Charles Duclos-Vallée^{4,6}, Peter Arkwright⁷, **Aude Magérus^{1,‡}, Emmanuel Jacquemin^{3,4,‡,*} and Frédéric Rieux-Laucat^{1,‡,*}.**

1. Université de Paris, Imagine Institute, Laboratory of Immunogenetics of Pediatric Autoimmune Diseases, INSERM UMR 1163, Paris, France;
2. Genomic Platform, Imagine Institute, Paris, France;
3. Pediatric Hepatology and Liver Transplantation Unit, National Reference Centre for inflammatory biliary diseases and autoimmune hepatitis, FILFOIE, ERN RARE LIVER, Bicêtre Hospital, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, University Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France;
4. INSERM UMR 1193, Hepatinov, University Paris-Saclay, Orsay, France ;
5. Department of Hepatology, Clermont-Ferrand Hospital, Clermont-Ferrand, France;
6. Department of Hepatology, INSERM UMR 1193, Paul Brousse hospital, Villejuif, France;
7. NHS, Manchester, United Kingdom.

[‡], These authors have equally contributed to the work.

Short title: mTORC1 signaling pathway and autoimmune hepatitis

Key words: *RRAGC, PRKAG1, LAMTOR1, LAMTOR3, mTOR, PIK3R1, TSC2*

* Corresponding authors: Frédéric Rieux-Laucat, Institut Imagine, INSERM UMR 1163, 24, boulevard du Montparnasse, 75015 Paris (frederic.rieux-laucat@inserm.fr), and Emmanuel Jacquemin, Hépatologie et transplantation hépatique pédiatriques, Hôpital Bicêtre, 78, avenue du Général Leclerc, 94270 Le Kremlin-Bicêtre (emmanuel.jacquemin@aphp.fr), France.

Electronic word count:

Abstract: 260 (260 max); Text: 6750 (7000 max including references and legends of tables and figures)

Number of figures and tables: 4 figures and 3 tables

Supplementary data: 4 figures and 4 tables

Conflict of interest and financial disclosure: The authors have nothing to disclose.

Grant support: The study was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by government grants from the Agence National de la Recherche as part of the “Investment for the Future” program (ANR-10-IAHU-01 and ANR-18-RHUS-0010), the Ligue Contre le Cancer-Comité de Paris, Fondation ARC pour la recherche sur le CANCER, the Centre de Référence Déficits Immunitaires Héréditaires (CEREDIH), the Agence National de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 “Lumugene” to FRL). CB was the recipient of a doctoral grant from the Fondation pour la Recherche Médicale, grant number FDM201906006582.

Author contributions: CB collected and analyzed the medical data, designed, performed, and analyzed the experiments, wrote the manuscript. SM and MCS collected and managed the patients’ samples. AR organized the collection of samples and performed the regulatory proceedings. SD, DH and PA provided care for the patients and reviewed the manuscript. JCDV and EG supervised the project and reviewed the manuscript. EJ initiated the study, designed and supervised the project, provided care for the patients, and reviewed the manuscript. AM and FRL designed and supervised the project and reviewed the manuscript.

Abbreviations:

AI: autoimmune; AIH: Autoimmune hepatitis; AIHA: autoimmune hemolytic anemia; AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase; ANA: anti-nuclear antibodies; CBS: cystathionin-beta-synthase; CS: corticosteroids; CTL4A: cytotoxic T lymphocyte antigen-4; EPSGHAN: European Pediatric Society of Gastroenterology, Hepatology And Nutrition; FoxP3: Forkhead box P3; HEAT: Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR; HI: healthy individuals; IAIHG: International Autoimmune Hepatitis Group; IL: interleukin; ITP: immune thrombocytopenia; LC-1: liver cytosol type 1; LAMTOR: Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator; LKM1: liver-kidney microsomal type 1; mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PCR: polymerase chain reaction; PID: primary immune deficiencies; PIK3R1: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1; PIP: phosphatidylinositol bisphosphate; PRAS40: proline-rich AKT substrate 40 kDa; PRKAG1: protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1; PTEN: Phosphatase and TENsin homolog; Raptor: regulatory associated protein of mTOR; Rheb: Ras homolog enriched in brain; RRAGC: Ras-related GTP-binding protein C; S6K1: S6 kinase 1; S6rp: S6 ribosomal protein; SMA: smooth muscle antibodies; TGF- β : transforming growth factor- β ; TNF- α : tumor necrosis factor- α ; T_{REG}: regulatory T cells; TSC: Tuberous Sclerosis Complex; WES: Whole exome sequencing.

Acknowledgments:

We thank AMFE (Association Maladie Foie Enfants, Malakoff, France), MLD (Monaco Liver disorder, Monaco), Association “Pour Louis 1000 Foie Merci” (Fournet-Luisans, France) and Fondation Rumsey-Cartier (Genève, Switzerland) for their support. We thank Dr Delphine Ladarré, Thi Hanh Seguin, and Isabelle Friteau for technical assistance and Prof. Olivier Bernard, Prof. Alain Fischer, Dr Geneviève de Saint Basile and Dr Panayotis Lykavieris for their help in the design of the study.

Lay summary: Identification by whole exome sequencing of nine mutations in seven genes drawing an abnormal activation of mTORC1 in eight out of 22 patients shed new light on autoimmune hepatitis pathogenesis.

What you need to know:

BACKGROUND AND CONTEXT: Autoimmune hepatitis is thought to be multifactorial in origin. So far, a monogenic etiology has never been reported outside the context of primary immune deficiency.

NEW FINDINGS: In eight patients with autoimmune hepatitis, we identified nine rare deleterious substitutions in seven partners of mTORC1, associated with mTORC1 overactivity and insensitivity to amino acid starvation in immune cells.

LIMITATIONS: Further functional studies are required to evidence the molecular and functional mechanisms at stake in mTORC1 overactivation and the development of autoimmunity related to these mutations.

IMPACT: These data shed new light on the pathogenesis of autoimmune hepatitis and may lead to better-tailored therapies.

Abstract:

Background & Aims: A defective immune tolerance and external triggers are thought to underlie the pathogenesis of autoimmune hepatitis (AIH). Regulation of mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling pathway is crucial to monitor adequate immune responses. If some polymorphisms predisposing to AIH have been reported, causative genetic defects remain to be found. Therefore, we searched for deleterious mutations in patients with AIH. **Methods:** Whole exome sequencing was performed in 22 patients with AIH. Data were analyzed with an in-house software and confirmed by Sanger sequencing. Immune profiling and mTORC1 activity were assessed when possible. **Results:** Six patients had AIH-1 and 16 AIH-2. Median age at diagnosis was 9 years (1-26). Median follow-up was 7 years (0.3-27). Putative gain-of-function of *RRAGC*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *mTOR*, *PIK3R1* and loss-of-function of *TSC2*, *PRKAG1* – activators and inhibitors of mTORC1, respectively – caused by nine rare heterozygous missense candidate-variants with damaging predictive scores were identified in eight patients with AIH-1 or -2. Mutations may alter activation (*RRAGC*, *PRKAG1*), interactions (*LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *PIK3R1*) or structure (*mTOR*, *TSC2*) of the proteins. Excess of phospho-S6⁺ CD3⁺ and CD19⁺ cells in peripheral mononuclear blood cells demonstrated an abnormal activation of mTORC1 in these patients. Persistent mTORC1 activation in their starved lymphoblasts indicated an insensitivity to amino acid starvation. **Conclusion:** These data show that patients with AIH-1 or -2, especially when burdened with poly-auto-immunity, may carry mutations in key partners of mTORC1 signaling pathway leading to its abnormal activation and insensitivity to amino acid starvation. These results shed new light on the pathogenesis of AIH and opening the way for precision medicine and specific targeted agents.

Introduction

Autoimmune hepatitis

Autoimmune hepatitis (AIH) is a rare, severe and self-perpetuating autoimmune (AI) liver disease affecting children and adults worldwide¹. Female predominance, hypergammaglobulinemia, autoantibodies and interface hepatitis prevail¹. Clinical presentation, from asymptomatic, slow progressive to fulminant liver disease, and outcome are widely heterogeneous¹. AIH-1, defined by antinuclear antibodies (ANA) and/or smooth muscle antibodies (SMA), a moderate form responding well to treatment, mostly affects 40 year-old patients and teenagers¹. AIH-2, characterized by anti-liver kidney microsomal type 1 (LKM1) and/or anti-liver cytosol type 1 (LC-1) antibodies, a rarer and more aggressive form, rather occurs in childhood, if not infancy, usually associated with AI diseases¹. Despite extensive research, AIH pathogenesis remains to be elucidated. In the current accepted model, immune tolerance fails to prevent a T-cell response against an unidentified autoantigen triggered by external factors from attacking the liver¹. If *human leukocyte antigen* genes were highly investigated, predisposition was also detected in genes involved in apoptosis, cellular signaling pathway, cytokine signaling or regulatory T cells (T_{REG})². AIH was described in 27% of patients with *AI regulator* mutations and in 14% of patients with *Forkhead box P3 (FOXP3)* mutations and in case reports of *GATA binding protein 2*, *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA4)* or *Fas* mutations³⁻⁷. The absence of a single diagnostic test delays recognition and treatment, exposing patients to rapid progression of cirrhosis and liver failure¹. Diagnostic scoring systems have been proposed by International AI Hepatitis Group (IAIHG) and European Pediatric Society of Gastroenterology Hepatology And Nutrition (EPSGHAN)⁸⁻¹⁰. The standard of care, corticosteroids (CS) alone or with azathioprine, induces remission in 80-90% of patients¹¹. Yet, challenges remain in the usual need for lifelong treatment burdened with adverse long-term

effects, the lack of therapeutic options for refractory forms, the difficulty to prevent acute liver failure and to reverse liver fibrosis to avoid cirrhosis complications¹¹.

mTORC1 signaling pathway in immune responses

mTOR (mechanistic target of rapamycin) complex 1 (mTORC1) combines the serine/threonine kinase mTOR, mammalian lethal with Sec13 protein 8 and Raptor (regulatory protein associated with mTOR). mTORC1 promotes cell growth and proliferation, particularly through phosphorylating its canonical target phospho-S6 kinase (S6K1) which phosphorylates S6 ribosomal protein (S6rp)¹². mTORC1 is regulated by endogenous inhibitors (PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 kDa) and DEP-domain-containing mTOR-interacting protein) restricting access to its active site and its mandatory localization to the lysosomal membrane. Recruited by Ras-related GTPases (RagA/B and RagC/D) anchored to the lysosome by the Ragulator complex (LAMTOR1-5), mTORC1 gets activated by binding Rheb (Ras homolog enriched in brain), released by the tuberous sclerosis complex (TSC)¹². AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase), the main sensor of energy stress, combines a catalytic subunit α and two regulatory subunits β and γ . When AMP:ATP ratio increases, AMP binds to tandem of cystathionin-beta-synthase (CBS) domains of AMPK γ 1, allowing AMPK α phosphorylation and activating AMPK. AMPK activates mTORC1 inhibitor and inhibits its activator by phosphorylating TSC and Raptor, respectively¹³. In immune cells, stimulation of T or B cell receptor (TCR and BCR) recruits p85 α of PI3K (phosphoinositide-3 kinase), activating p110 δ which turns phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) into PIP₃, activating Akt which inhibits mTORC1 inhibitors by phosphorylating PRAS40 and TSC¹⁴. Extensive research focused on mTORC1 pivotal role in monitoring adequate immune responses, supported by autoimmunity in mTORC1 overactivation by mutations in key partners¹⁵. Activation, differentiation and migration of T cells, tolerance in CD4 T cells and memory in CD8 T cells, depend on mTORC1 activation by TCR engagement, co-stimulatory signals, cytokines, growth

factors and nutrients. Activation, maturation, differentiation, antibody production and survival of B cells rely on mTORC1 activation by BCR engagement, CD40 binding, Toll Like Receptor signaling and Fc receptor binding¹⁵.

Aim of the study

Causative genetic variants could refine the pathogenesis of AIH and pave the way for more specific targeted agents. This prompted us to screen genetically a selected cohort of patients presenting with AIH to search for potentially damaging variants.

Patients/Materials and methods

Patients

Patients were recruited among the patients with AI diseases of pediatric onset addressed to the Laboratory of Immunogenetics of AI diseases in Children (Imagine Institute, Paris) by various national and international centers. Inclusion criteria were: (i) established AIH diagnosis and (ii) available genetic material. Exclusion criteria were: absence of specific auto-antibodies, medullar aplasia, giant cells hepatitis and overlap syndromes (association of AI liver diseases) given the absence of consistent criteria. Clinical experts (EJ and JCDV) reviewed the medical files and confirmed the diagnosis of AIH. Demographic, clinical, biochemical, radiological, histological and treatment data were collected for every included patient. Blood samples were addressed to the laboratory for freezing of plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated by density gradient medium, and genomic DNA extraction as previously described¹⁶.

Ethics and consent

Informed consent was obtained from each patient/family included in this study. The study protocol conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki as reflected in a priori approval by the institution human research committee of the respective institutions.

Molecular biology

Whole exome sequencing (WES) was performed by the Genomic Platform at Imagine Institute (Paris, France) as previously described¹⁷. An in-house software (Polyweb) was used to filter the variants. A first supervised analysis with an updated list of causative genes of primary immune deficiencies (PID) was performed, with these filters: variants reported <1% in international databases and <10 times in the in-site database. A second supervised analysis with an updated list of causative genes of AL-PID was performed, with this filter: variants reported < 5% in the international databases (genes lists shown in Supplementary Table 1). A third supervised

analysis searching for variants transmitted by a recessive familial model was performed, with these filters: variants reported <1% in the international databases and <10 times in the in-site database. Lastly, unbiased analysis based on the following parameters to select a variant-candidate was performed. A variant was considered candidate depending on: (1) rarity among previously reported variants in the literature (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) and in the in-site database; (2) predicted pathogenicity as a genetic variant with Combined Annotation-Dependent Depletion score (<https://cadd.gs.washington.edu/>) as deleterious >20, and as a potential protein consequence with Sorting Intolerant From Tolerant score (<https://bio.tools/sift>) as deleterious <0.05 and with Polymorphism Phenotyping v2 score (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) as deleterious >0.85; (3) biologic relevance in the phenotypic context using Online Mendelian Inheritance in man database (<https://www.omim.org/>) and literature for genotype-phenotype relationship; (4) position in protein, using UniProt database (<https://www.uniprot.org/>), key domains, using MassIVE (<https://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/massive.jsp>) and phosphorylation site, using PhosphoSitePlus (<https://www.phosphosite.org/>); and (5) structural consequences, using Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>) and review of the literature, and on the characteristics of amino acids, using HOPE database (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)¹⁸. Identification of candidate-variant was confirmed by Sanger sequencing, as well as familial segregation when possible. Primers were designed using ApE (<https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/apel/>) and Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) from the reference sequence of Ensembl database of the canonical transcript assessed by gnomAD; and produced by Eurofins Genomics (sequences available in Supplementary Table 2). Genomic DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the GoTaq® DNA Polymerase (Promega). If needed, PCR products were cloned into a plasmid vector using TOPO® TA Cloning® (Invitrogen) and transformed One Shot™ Stbl3™ Chemically Competent *Escherichia Coli*

(Invitrogen). PCR were performed on colonies containing the plasmid (selected on their color). Sanger sequencing reaction was performed, using BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher). After purification with Sephadex™ G-50 (Cytiva), capillary electrophoresis was performed with 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were analyzed with ApE.

Immune profiling

All antibodies used are detailed in Supplementary Methods. After 30 minutes of incubation on ice, protected from light, cells were washed before fixation and permeabilization with the eBioscience™ kit (Invitrogen). After 45 minutes of incubation on ice, protected from light, cells were washed twice before staining with intracellular antibodies. After 30 minutes of incubation on ice, protected from light, cells were washed before flow cytometry analysis (Fortessa). Results were examined with FlowJo™ (BD Biosciences).

Simultaneous quantification of 13 cytokines (IL-4, IL-2, CXCL-10, IL-1 β , TNF- α , MCP-1, IL-17A, IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-12p70, IL-8 et TGF- β 1) was performed using the LEGENDplex™ HU Essential Immune Response Panel (13-plex) w/VbP (BioLegend).

Autoantigen microarray for high-throughput autoantibody profiling including 128 autoantigen listed in Supplementary table 3 was performed in collaboration with Quan-Zhen Li team (Microarray Core, BioCenter, UT Southwestern Medical District, Dallas, Texas, Etats-Unis).

Cell culture

PBMC were frozen in fetal bovine serum with 10% DMSO. To generate T blasts, PBMC were cultured in RPMI with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin at 2 million cells/ml and stimulated with Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28 (Invitrogen). After 72 hours of culture in sterile incubator at 37°C and 5% CO₂, cells were washed and supplemented with IL-2 (100 UI/L). After another 48-72 hours of culture, T blasts were ready

for experiments. Epstein Barr Virus (EBV)-immortalized B blasts were generated by the Centre de Ressources Biologiques of Hospital Necker (Paris, France) from frozen PBMC of patients.

Functional studies

Phosphorylation of S6rp was assessed by flow cytometry, after fixation and permeabilization with PerFix EXPOSE kit (Beckman-Coulter). Amino acid starvation was achieved by culturing the cells in RPMI without amino acids (US Biologicals). T blasts were stimulated with IL-2 (100 UI/L) and OKT-3 (1 µg/ml). EBV B blasts were stimulated with PMA (20 ng/ml). mTOR inhibitors were added to cells at starvation onset: rapamycin (50 nM) (Cell Signaling Technology, 9904) and Torin1 (5 µM) (Cell Signaling Technology, 14379). Phosphorylation of S6K1 was assessed by western-blot with mouse antibody anti-phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (1A5) (Cell Signaling Technology) and rabbit antibody anti-p70 S6 Kinase (49D7) (Cell Signaling Technology, 2708). The protocol of western-blot is detailed in the Supplementary Methods.

Statistics

Statistical measures (total, mean, median, percentages, minimum, maximum) were performed with Excel software (Microsoft, Redmond). Statistical tests were performed with Prism software (GraphPad). Test of Student was used to compare clinical data between two groups. Test of Mann-Whitney was used to compare experimental data between groups.

Results

Description of the study cohort

Twenty-two patients were included, with a male:female ratio of 1:10, from 4 centers (Bicêtre Hospital, Paul Brousse and Clermont-Ferrand Hospital (France) and Royal Manchester Children's Hospital (United Kingdom)).

Thirteen patients (59%) exhibited $\geq$ one associated AI disease: immune thrombocytopenia (ITP) (4 cases), AI hemolytic anemia (AIHA) (3), diabetes (2), celiac disease (2), Sjögren syndrome (1), gastritis (1), alopecia (1), scleritis (1), thyroiditis (1), psoriasis (1), antiphospholipid syndrome (1).

Thirteen patients (59%) presented with acute hepatitis and five (23%) with liver failure. Median age at diagnosis was 9 years (range: 1-26). Transaminitis and conjugated bilirubin exceeded ten times the normal (40 UI/L and 5 μ mol/L) in 13 (59%) and nine patients (41%) respectively. Gamma-glutamyl transferase levels were increased in 14 patients (64%). Prothrombin time and factor V were $< 70\%$ in 12 (54%) and nine patients (41%), respectively.

ANA were found in eight patients (36%), four AIH-1 (67%) and four AIH-2 (25%). SMA were found in six patients (27%), including one AIH-2. Auto-antibodies against F-actin were found in three out of six AIH-1 patients. Three AIH-1 patients exhibited concomitant ANA and SMA. Among the 16 AIH-2 patients, 11 had anti-LKM1 auto-antibodies and five had anti-LC-1. No significant difference was evidenced between AIH-1 and AIH-2 patients (Table 1). Fourteen patients (64%) exhibited additional auto-antibodies: anti-transglutaminase (4, 18%), anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (3, 14%), anti-Langerhans islets (3, 14%), anti-gastric parietal cells (3, 14%), anti-platelets (2, 9%), anti-thyroglobulin (2, 9%), anti-gliadin (2, 9%), anti-IA2 (2, 9%), anti-GAD (1, 5%), anti-double stranded DNA (1, 5%), anti-SSA (1, 5%), anti-insulin (1, 5%), anti-reticulin (1,5%) antibodies.

Interface hepatitis was observed on 17 biopsies (77%), with plasma cells (11 cases), cholangiolitis (4), biliary changes (4) and cholangiolar proliferation (1), no ductopenia. In the remaining five patients, MRI-cholangiography found no biliary disease.

Standard of care combining CS with azathioprine was introduced in the first two weeks for 16 patients (73%). Thirteen patients (59%) had $\geq$ one relapse, with a median delay of seven years (1-24). Diagnostic scores defined a probable or definite AIH in every patient, even without liver biopsy (Supplementary Table 4). Second line treatment was required for five patients (23%). Four patients received ciclosporin A for steroid dependence, severe glucidic intolerance, incomplete remission or severe form at onset. Two patients received mycophenolate, for cytopenia and steroid dependence.

Median follow-up duration was seven years (1-27). At last visit, median age was 20 years (3-35) and 19 patients (86%) were under treatment: CS and azathioprine (13 patients), CS only (2), azathioprine only (3), mycophenolate (1). Median CS treatment duration was 15 years (2-23) in the four patients (18%) free of CS. Median azathioprine treatment duration was 7 years (3-24) in the three patients (14%) free of azathioprine. Ten patients (45%) had cirrhosis. Decompensated cirrhosis indicated liver transplantation in two patients (9%). One developed a primary liver dysfunction requiring a second successful transplantation. The other suffered from multiple organ failure and died just after transplantation.

Clinical reports of the eight patients carrying variants in mTORC1 signaling pathway

Supervised analysis of WES data from the 22 patients discarded all PID and AL-PID genes. Unbiased analysis evidenced nine candidate-variants affecting seven genes, involved in mTORC1 regulation, in eight patients (36%) (patients A-H) described in Table 2 and Supplementary table 5. They exhibited more associated AI diseases ($p=0,0524$). No significant differences were found between patients with and without variants.

Patient A was referred for hepatomegaly and splenomegaly. Transaminitis, liver failure, and hypergammaglobulinemia normalized with CS and azathioprine. He presented with AI cytopenia and gastritis. Liver histology showed interface hepatitis and few lymphocytic cholangitis. At last visit, he was on remission with prednisone and azathioprine.

Patient B was diagnosed with AI cytopenia and celiac disease. Her father had ulcerative colitis and her mother psoriasis. She had hepatomegaly and splenomegaly since 6.5 years of age. Liver histology showed interface hepatitis and no biliary changes. Transaminases normalized with prednisone and azathioprine, the latter being switched to mycophenolate because of cytopenia. At last visit, she was on remission with mycophenolate.

Patient C was referred for jaundice, pruritus, and hepatomegaly. Transaminitis since age 4 months, liver failure and hypergammaglobulinemia normalized with CS and azathioprine. At age 20 months, AI diabetes prompted a switch from ciclosporin A to mycophenolate. Multiple relapses occurred between age 11 and 19 years. During follow-up, she developed AI alopecia at 4 years-old, AI scleritis at 7 years-old and AIHA at 8 years-old, requiring rituximab. Liver histology showed interface hepatitis and no biliary changes. At last visit, she was on remission with prednisone, mycophenolate and ciclosporin A, the latter being switched to tacrolimus for cosmetic side effects.

Patient D was referred for jaundice and hepatomegaly. Transaminitis, liver failure and hypergammaglobulinemia normalized with CS and azathioprine. She had ANA and SMA with anti-F-actin specificity. Liver biopsy was not performed. MRI-cholangiography showed a normal biliary tree. At last visit, she was on remission with budesonide and azathioprine.

Patient E presented with celiac disease at 7 months of age. He was referred at 13 years-old for hepatomegaly. Hypergammaglobulinemia and transaminitis normalized with CS and azathioprine. Liver histology showed interface hepatitis and no biliary changes. One relapse occurred during follow-up. At last visit, he was on remission with prednisone and azathioprine.

Patient F was referred for abdominal pain. Hypergammaglobulinemia and liver failure normalized with prednisone and azathioprine. Liver histology showed interface hepatitis, cirrhosis and no biliary changes. Two relapses developed during follow-up. At 35 years-old, occurrence of ascites infection progressed to sepsis, hepatic encephalopathy and multiple organ failure. The patient died after a liver transplantation.

Patient G was referred for abdominal pain, jaundice, and hepatomegaly. Transaminitis, liver failure and hypergammaglobulinemia normalized with CS and azathioprine. Liver histology showed interface hepatitis, cirrhosis and no biliary changes. Poor adherence to treatment led to multiple relapses. At last visit, she was on remission with prednisone and azathioprine.

Patient H had thyroiditis at 15 years-old and Sjögren syndrome at 21 years-old. She was referred at 26 years-old for jaundice. Transaminitis, liver failure and hypergammaglobulinemia normalized with CS and azathioprine. Liver histology showed interface hepatitis and marginal ductular proliferation. At last visit, she was on remission with prednisone and azathioprine.

Genetic reports of the eight patients carrying variants in mTORC1 signaling pathway

Detailed *in silico* analysis is shown in Table 3. Mutations and familial segregation analysis were confirmed by Sanger sequencing (Figure 1 and Supplementary Figure 1). Position of mutated residues and their involvement in mTORC1 activity is illustrated in Figure 2.

The *de novo* variant c.259C>A in *Ras-related GTP-binding protein C (RRAGC)* substituted proline into threonine in position 87 in RagC. Threonine is less rigid and hydrophobic, which could disturb the GTPase domain conformation, GTP/GDP binding and heterodimerization with RagA. A gain-of-function mutation Ser75Tyr impairing GTP binding have been described to increase the GDP-loaded active form of RagC¹⁹. The mutation Pro87Thr could be gain-of-function and enhance mTORC1 activation.

Two variants were identified in *Protein Kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1 (PRKAG1)* with an autosomal recessive transmission. The variant c.193C>T substituted valine

into leucine in position 65 in CBS-1 of AMPK γ 1. The variant c.949G>A substituted valine into methionine in position 317 in CBS-4. Leucine and methionine are bigger, which could create a convexity disturbing the CBS domains conformation, blocking AMP binding. These biallelic mutations could be loss-of-function, preventing AMPK activation under energy stress, promoting persistent mTORC1 activity.

The variant c.439C>T in *Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator (LAMTOR) 1* substituted the arginine in position 147 directly involved in LAMTOR1 and LAMTOR3 association, into a cysteine, within a highly conserved zone of LAMTOR1²¹. Cysteine is smaller, more hydrophobic and neutral rather than positive, which could destabilize Ragulator structure and promote interactions with RagC²¹. The Arg147Cys mutation could be gain-of-function, increasing the activation role of Rag GTPases on mTORC1.

The variant c.221A>G in LAMTOR3 substituted tyrosine into cysteine in position 74 in LAMTOR3, within a region involved in heterodimerization between LAMTOR2 and LAMTOR3, exposed to Rag GTPases. This tyrosine is buried into the core of LAMTOR3 and forms hydrogen bonds with glutamine in position 109 of LAMTOR5²¹. Cysteine is smaller and more hydrophobic, which could suppress hydrogen bonds, disturbing LAMTOR3 conformation and destabilizing Ragulator structure, promoting its interactions with Rag GTPases. The mutation Tyr74Cys could be gain-of-function, enhancing the activation role of Rag GTPases on mTORC1.

The variant c.854A>T in *mTOR* substituted glutamate into valine in position 285 in mTOR. Valine is smaller, more hydrophobic and neutral rather than negative, which could abolish ionic interaction and hydrogen bonds, destabilize protein folding and weaken the restricted access to the active site to promote phosphorylation of substrates. The mutation Glu285Val could be gain-of-function.

The variant c.889G>A in *Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1 (PIK3R1)* substituted glutamate into lysine in position 297 in p85 α . The glutamate forms a ionic interaction with lysine in position 224 involved in PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) stabilization, a lipid phosphatase reversing PIP₃ into PIP₂²⁰. Lysine is bigger, positive rather than negative, which could disturb association of PTEN with p85 α and destabilize PTEN. The mutation Glu297Lys could be loss-of-function of an inhibitor of PI3K-Akt-mTORC1 pathway. The variant c.1090A>G in *TSC2* substituted a highly conserved isoleucine into a valine in position 364 and the variant c.1828A>G substituted isoleucine into valine in position 610 in *TSC2*. Valine is smaller, so Iso364Val could disturb the interactions between TSC1 and TSC2 and Iso610Val could destabilize TSC2 and TSC structure, disabling its hold on Rheb. Mutations Iso364Val and Iso610Val could be loss-of-function, inducing an abnormal mTORC1 activity.

mTORC1 activity in PBMC, T blasts and EBV B blasts

To investigate whether mTORC1 activity is abnormally regulated and how this could impair immune tolerance, phosphorylation of S6rp was assessed in PBMC of patients carrying variants (M⁺) *versus* PBMC of AIH patients with no identified variants (M⁻), and healthy individuals (HI). At steady state, PBMC of M⁺ exhibited a significant increase of phospho-S6rp⁺CD3⁺ and phospho-S6rp⁺CD19⁺ cells and median of fluorescence intensity (MFI) of phospho-S6rp *versus* M⁻ and HI (Figure 3A).

To examine the performance of the regulatory mechanisms inhibiting mTORC1 activity, amino acid deprivation was used on T blasts and EBV B blasts of M⁺ and *versus* T blasts of M⁻, T blasts and EBV B blasts of HI. Starved T blasts and EBV B blasts from M⁺ exhibited a significant increase of phospho-S6rp⁺ cells and MFI of phospho-S6rp. These results were confirmed by an increased phosphorylation of S6K1 in EBV B blasts of patient A *versus* HI (Figure 3B).

To analyze mTORC1 activity after stimulation, stimulation with IL-2 in T blasts and PMA in EBV B cells showed no significant difference between groups. Stimulation with OKT-3 revealed a significant increase of phospho-S6rp⁺ cells and MFI of phospho-S6rp in M⁺ *versus* M⁻ and HI (Figure 3C).

To assess the sensibility of the abnormal mTORC1 activity to mTOR inhibitors, T blasts and EBV B blasts were cultured with rapamycin and Torin1 before starvation and stimulation assays. Phosphorylation of S6-rp decreased under treatment, revoking the differences described earlier (Figure 3D).

Immune profiling

Lymphocyte phenotyping was compared between M⁺ and HI, showing no significant difference in numbers except for an increase of naïve T cells (Supplementary Figure 2A). Assessment of intracellular biomarkers of T_{REG} demonstrated a significant decrease of MFI of FoxP3, Helios and CTLA-4 in M⁺, *versus* HI (Supplementary Figure 2B).

Simultaneous quantification of cytokines in the plasma of M⁺ *versus* HI exhibited a significant increase of pro-inflammatory cytokines: IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-17A, IFN- γ and TNF- α (Supplementary Figure 3).

Searching for biomarkers of M⁺, a 128-autoantigen microarray did not detect any other auto-antibody than expected in the plasma from M⁺ and HI (Supplementary Figure 4).

Discussion

Main results

For the first time, nine potentially damaging variants encoding seven critical regulators of mTORC1 activation were evidenced in one-third of the study cohort, either affected with AIH-1 or AIH-2. Furthermore, an abnormal mTORC1 activity insensitive to amino acid starvation was demonstrated in immune cells of these patients, significantly different from other AIH patients and healthy individuals.

Study cohort: representativity and limits

The study cohort mostly comprised patients with pediatric onset AIH, explaining preponderance of AIH-2, young age of diagnosis and high frequency of acute hepatitis at presentation^{1,22}. Prevalence of liver failure is consistent with the literature²². In AIH-1 patients, prevalence of SMA was higher than usually reported²³. The male:female ratio was lower than expected, with 1:10 *versus* 1:4 to 1:7¹. Familial AI diseases was ten times more frequent than in general population (59% vs 5%)²⁴. Prevalence of associated AI diseases was similar to literature reports¹. Except for AI cytopenia, other diseases had already been described with the same frequency¹. Only one case reported AIHA with AIH after varicella-zona virus infection²⁵. Prevalence of ITP with AIH was 1% in the Japanese cohort of AIH patients²⁶. Auto-antibodies were comparable to previous descriptions¹. Remission, relapses, liver transplantation and death rates remained consistent with previous reports¹¹. Sustained drug withdrawal was obtained for 9% of the study cohort, slightly below published data of 10-20%²⁷.

Patients carrying variants: specificity

Identification of candidate-variants involved in mTORC1 activity in three patients with AIH-1 and five patients with AIH-2 supports the idea of a common pathogenesis. Clinical presentation and outcome of M+ was not significantly different from M- and resemble AIH-2 phenotype¹. Interestingly, the two AIH patients with celiac disease carried candidate-variants with abnormal mTORC1 activity, which had recently been found in celiac disease biopsies²⁸. mTOR inhibitors had never been used in M+, because most responded well to standard of care and, when second-line treatment was required, patients received better-known molecules²⁸⁻²⁹. Gain-of-function mutations of mTORC1 pathway cause overgrowth or activated PI3K δ syndromes (APDS)³⁰. M+ patients did not present features from those syndromes, such as recurrent, severe, chronic infections, benign lymphoproliferation, growth troubles, malignancies, developmental delay³⁰. Patient A had candidiasis since infancy, a frequent fungal infection in APDS. AI cytopenia was

found in the same proportions in the study cohort and in APDS. AI thyroiditis and Sjögren syndrome are also observed in APDS³⁰.

Literature support for pathogenicity of the identified mutations

Heterozygous germline substitutions have already been pledged in monogenic AI syndromes: most mutations responsible for APDS are gain-of-function heterozygous substitutions³¹.

Somatic mutations of the proto-oncogenes (*RRAGC*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3* and *mTOR*) and tumor suppressor genes (*PRKAG1*, *PIK3R1* and *TSC2*) have been found in plethora of cancer tissues (Cancer Protein Atlas, COSMIC).

To date, no AI disease have been associated with germline mutations of *RRAGC*, *PRKAG1*, *LAMTOR1*, *LAMTOR3*, *MTOR*. Therefore, patients A to E are the first reports of involvement of mutations in these genes in AI disease.

Loss-of-function mutations in *PIK3R1* cause APDS-2 by abrogating the inhibitory role of p85 α conferring a gain-of-function of PI3K³². Loss-of-function mutations in *PTEN* induce APDS-L. Mutations of *PTEN* and *PIK3R1* follow a dominant-negative autosomal transmission³². One patient with tuberous sclerosis, caused by mutations in *TSC1* and *TSC2*, was reported with SLE and an increased mTORC1 activity in every lymphocyte subset³⁴.

RagC have been cited in the lysosomal translocation mediating asymmetric activation of CD8 T cells and through the role of a GAP protein inhibiting RagC, folliculin, in the homeostasis of innate immunity³⁵⁻³⁶. AMPK activation inhibits secretion of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β) and promotes secretion of anti-inflammatory cytokines (IL-10). Its pivotal role in cell metabolism could be involved in the regulation of inflammation³⁷⁻³⁸. AMPK is inhibited in mice concanavalin A induced hepatitis, the main murine model for AIH³⁸. Polymorphisms in *LAMTOR3* have been described as a risk factor to develop SLE³⁹. Interestingly, homozygous mutations in *LAMTOR2* cause a primary immune deficiency⁴⁰. *LAMTOR1* and *LAMTOR3* are involved in macrophages polarization, leukocyte migration, CD4 T cells proliferation and

differentiation and T_{REG} suppressive function⁴¹⁻⁴³. In the murine model of mTOR deletion in T_{REG}, spontaneous severe and systemic autoimmunity demonstrated the crucial role of mTOR in T_{REG} function, differentiation and migration⁴⁴.

mTORC1 overactivity despite amino acid starvation

mTORC1 activity assessed by phosphorylation of S6rp has been identified as a biomarker for lupus flares⁴⁵. In rheumatoid arthritis, osteoclasts exhibited an increased mTORC1 activity⁴⁵. In psoriatic arthritis, T cells and skin cells showed enhanced mTORC1 activity⁴⁵.

Pathogenic potential of the candidate-variants in mTORC1 regulation relies on a solid scientific rational amply documented (Figure 4). Somatic *RRAGC* mutations in follicular lymphoma, especially between residues 75 to 118, rendered mTORC1 activity insensitive to amino acid starvation⁴⁶. Mutations in CBS-4 can abolish AMP regulation. AMP binding to one CBS domain stabilizes AMP binding in the other domains⁴⁷. Some substitutions of amino acids in mTOR confer a gain-of-function of mTORC1 by weakening the active site structure, promoting contact with substrates⁴⁸. The slightest change in the TSC complex can destabilize the structure and cancel its hold on Rheb⁴⁹.

To ascertain the importance of these mutations in AIH pathophysiology and management, assessment of mTORC1 activity at steady state in PBMC of M+ *versus* M- and HI was imperative. The significant increase of phospho-S6rp⁺ cells in M+, absent in M- and HI, evidenced the impact of these mutations on mTORC1 activity. To further investigate this unprecedented result, it was important to establish whether mTORC1 was abnormally activated in different subsets of immune cells under starvation and/or stimulation conditions. mTORC1 activity could not be assessed in every subset of PBMC due to lack of cellular material from patients. Thus, lymphoblasts were generated. M+ exhibited mTORC1 activity despite amino acid deprivation, contrarily to M- and HI. These novel data suggest that these mutations render mTORC1 activity insensitive to amino acid deprivation, in T blasts and EBV B blasts. The

absence of significant difference under different stimulation of lymphoblasts ruled out the hypothesis of mTORC1 overactivation after stimulation. Since mTORC1 was active in mutated cells despite amino acid starvation, it was crucial to determine the sensitivity to mTOR inhibitors. Treatment with mTOR inhibitors restored the sensitivity to amino acid deprivation of mTORC1 activity, supporting the potential benefits of specific targeted agents.

Still, assumed functional hypothesis of each candidate-variant require experimental clarification.

Immune profiling

Increase of naïve T cells in patients carrying mutations could be explained by the difference of age between younger patients and older HI. Although T_{REG} counts were normal, defective MFI of their specific biomarkers suggest a dysfunction in M⁺. Unfortunately, due to lack of cellular material, the T_{REG} suppressive function could not be assessed.

Since cytokines are essential mediators in immune interactions, the increase of circulating pro-inflammatory cytokines rates compared to HI supports the hypothesis of a global immune dysregulation integrating every contributor of immune system in AIH.

Despite an auto-antigen array among 128 different targets involved in AI diseases, specific biomarkers remain to be identified.

Limitations of the study

Individual and familial poly-auto-immunity were predominant in the study cohort, a feature probably related to recruitment bias: patients with multiple AI diseases or AI background were preferentially addressed to the laboratory.

AIH-2 were overrepresented in the study cohort, increasing the frequency of acute hepatitis at onset and lowering the age at diagnosis.

Transmission mode of *LAMTOR1*, *mTOR*, *PIK3R1* and *TSC2* mutations could not be established due to absence of genetic material for some relatives. However, one can assume

that family E and family F presented a dominant autosomal transmission of variants, with mutations carried by every affected relative. Asymptomatic individuals harboring candidate-variants suggest an essential role for supplemental triggers, either additional genetic events or environmental cues, yet to be discovered.

Conclusions

Taken together, the emergence of activating mTORC1 mutations in AIH patients is particularly valuable and might be exploited as a therapeutic target. However, the mechanisms of mTORC1 abnormal activation in AIH pathophysiology warrants further investigation.

References

1. Mieli-Vergani G, Vergani D, Czaja AJ, et al. Autoimmune hepatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Apr 12;4:18017.
2. Engel B, Laschtowitz A, Janik MK, Junge N, Baumann U, Milkiewicz P, Taubert R, Sebode M. Genetic aspects of adult and pediatric autoimmune hepatitis: A concise review. *Eur J Med Genet*. 2021 Jun;64(6):104214.
3. Garelli S, Dalla Costa M, Sabbadin C, et al. Autoimmune polyendocrine syndrome type 1: an Italian survey on 158 patients. *J Endocrinol Invest*. 2021 May 18.
4. Duclaux-Loras R, Charbit-Henrion F, Neven B, et al. Clinical Heterogeneity of Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: A French Multicenter Retrospective Study. *Clin Transl Gastroenterol*. 2018 Oct; 9(10): 201.
5. Webb G, Chen YY, Li KK. Single-gene association between GATA-2 and autoimmune hepatitis: A novel genetic insight highlighting immunologic pathways to disease. *J Hepatol*. 2016 May;64(5):1190-1193.
6. Al Baroudi S, Collaco JM, McGrath-Morrox S. An 18-year-old woman with pulmonary nodules found to have cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 deficiency. *BMJ Case Rep*. 2019 Dec 8;12(12):e231600.
7. Bensati L, Costanzo A, Ianni A, et al. Fas/Apo1 mutations and autoimmune lymphoproliferative syndrome in a patient with type 2 autoimmune hepatitis. *Gastroenterology*. 1997 Oct;113(4):1384-9.
8. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929–938.
9. Hennes EM, Zeniya M, Czaja Albert J, et al. Simplified criteria for the diagnosis of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2008;48:169–176.

10. Mieli-Vergani G, Vergani D, Baumann U, et al. Diagnosis and management of pediatric autoimmune liver disease: ESPGHAN hepatology committee position statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2018;66:345-360.
11. Vergani D, Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G. A reasoned approach to the treatment of autoimmune hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2021 Jun 21:S1590-8658(21)00307-8.
12. Tafur L, Kefauver J, Loewith R. Structural Insights into TOR Signaling. *Genes (Basel)*. 2020 Aug 4;11(8):885.
13. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Mar 22;13(4):251-62.
14. Jung S, Gámez-Díaz L, Proietti M, Grimbacher B. "Immune TOR-opathies," a Novel Disease Entity in Clinical Immunology. *Front Immunol*. 2018 May 9;9:966.
15. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, et al. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:39-68.
16. Miller SA, Dykes DD et Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215.
17. Hadjadj J, Aladjidi N, Fernandes H, et al. Pediatric Evans syndrome is associated with a high frequency of potentially damaging variants in immune genes. *Blood*. 2019 Jul 4;134(1):9-21.
18. Venselaar H, Te Beek TAH, Kuipers RKP, et al. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics* 2010;11:548.
19. Long PA, Zimmermann MT, Kim M, et al. De novo RRAGC mutation activates mTORC1 signaling in syndromic fetal dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 2016; 135(8):909-917.
20. Marshall JDS, Mellor P, Ruan X, et al. Insight into the PTEN - p85 α interaction and lipid binding properties of the p85 α BH domain. *Oncotarget*. 2018 Dec 11;9(97):36975-36992.

21. Su MY, Morris KL, Kim DJ, et al. Hybrid Structure of the RagA/C-Ragulator mTORC1 Activation Complex. *Mol Cell*. 2017 Dec 7;68(5):835-846.e3.
22. Biewenga M, Inderson A, Tushuizen ME, et al. Early Predictors of Short-Term Prognosis in Acute and Acute Severe Autoimmune Hepatitis. *Liver Transpl*. 2020 Dec;26(12):1573-1581.
23. Terziroli Beretta-Piccoli B, Mieli-Vergani G, Vergani D. Serology in autoimmune hepatitis: A clinical-practice approach. *Eur J Intern Med*. 2018 Feb;48:35-43.
24. Grønbæk L, Vilstrup H, Pedersen L, et al. Extrahepatic autoimmune diseases in patients with autoimmune hepatitis and their relatives: A Danish nationwide cohort study. *Liver Int*. 2019 Jan;39(1):205-214.
25. Jain D, Singh H, Singh G, et al. Autoimmune Hepatitis with Autoimmune Haemolytic Anemia Triggered by Varicella - a Rare Presentation. *Maedica (Bucur)*. 2016 Dec;11(4):349-351.
26. Takahashi A, Arinaga-Hino T, Ohira H, et al; Autoimmune Hepatitis Study Group-Subgroup of the Intractable Hepato-Biliary Disease Study Group in Japan. Autoimmune hepatitis in Japan: trends in a nationwide survey. *J Gastroenterol*. 2017 May;52(5):631-640.
27. Van Gerven NMF, Verwer BJ, Witte BI, et al. Epidemiology and clinical characteristics of autoimmune hepatitis in the Netherlands. *Scand J Gastroenterol*. 2014 Oct;49(10):1245-54.
28. Sedda S, Dinallo V, Marafini I, et al. mTOR sustains inflammatory response in celiac disease. *Sci Rep*. 2020 Jul 1;10(1):10798.
29. Kurowski J, Melin-Aldana H, Bass L, et al. Sirolimus as rescue therapy in pediatric autoimmune hepatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;58(1):e4-e6

30. Nunes-Santos CJ, Uzel G, Rosenzweig SD. PI3K pathway defects leading to immunodeficiency and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 May;143(5):1676-1687.
31. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 δ result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2014 Jan;15(1):88-97.
32. Elkaim E, Neven B, Bruneau J, et al. Clinical and immunologic phenotype associated with activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome 2: A cohort study. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jul;138(1):210-218.e9.
33. Tsujita Y, Mitsui-Sekinaka K, Imai K, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) mutation can cause activated phosphatidylinositol 3-kinase δ syndrome-like immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Dec;138(6):1672-1680.e10.
34. Singh N, Birkenbach M, Caza T, et al. Tuberous sclerosis and fulminant lupus in a young woman. *J Clin Rheumatol.* 2013 Apr;19(3):134-7.
35. Pollizzi KN, Sun IH, Patel CH, et al. Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2016 Jun;17(6):704-11.
36. Li J, Wada S, Weaver LK, et al. Myeloid Folliculin balances mTOR activation to maintain innate immunity homeostasis. *JCI Insight.* 2019 Mar 7;5(6):e126939.
37. Noor HB, Mou NA, Salem L, et al. Anti-inflammatory Property of AMP-activated Protein Kinase. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 2020;19(1):2-41.
38. Desta YT, Wu M, Bai L, et al. Mitochondrial-targeted ubiquinone alleviates concanavalin A-induced hepatitis via immune modulation. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul;84:106518.

39. Wilbe M, Kozyrev SV, Farias FH, et al. Multiple Changes of Gene Expression and Function Reveal Genomic and Phenotypic Complexity in SLE-like Disease. *PLoS Genet.* 2015 Jun 9;11(6):e1005248.
40. Bohn G, Allroth A, Brandes G, et al. A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. *Nat Med.* 2007 Jan;13(1):38-45.
41. Kimura T, Nada S, Takegahara N, et al. Polarization of M2 macrophages requires Lamtor1 that integrates cytokine and amino-acid signals. *Nat Commun.* 2016 Oct 12;7:13130.
42. Nakatani T, Tsujimoto K, Park J, et al. The lysosomal Ragulator complex plays an essential role in leukocyte trafficking by activating myosin II. *Nat Commun.* 2021 Jun 7;12(1):3333.
43. Hosokawa T, Kimura T, Nada S, et al. Lamtor1 Is Critically Required for CD4⁺ T Cell Proliferation and Regulatory T Cell Suppressive Function. *J Immunol.* 2017 Sep 15;199(6):2008-2019.
44. Vallion R, Divoux J, Glauzy S, et al. Regulatory T Cell Stability and Migration Are Dependent on mTOR. *J Immunol.* 2020 Oct 1;205(7):1799-1809.
45. Perl A. Activation of mTOR (mechanistic target of rapamycin) in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2016 Mar;12(3):169-82.
46. Okosun J, Wolfson RL, Wang J, et al. Recurrent mTORC1-activating RRAGC mutations in follicular lymphoma. *Nat Genet.* 2016 Feb;48(2):183-8.
47. Yan Y, Zhou XE, Xu HE, et al. Structure and Physiological Regulation of AMPK. *Int J Mol Sci.* 2018 Nov 9;19(11):3534.
48. Yang H, Rudge DG, Koos JD, et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature.* 2013 May 9;497(7448):217-23.
49. Yang H, Yu Z, Chen X, et al. Structural insights into TSC complex assembly and GAP activity on Rheb. *Nat Commun.* 2021 Jan 12;12(1):339.

Figures

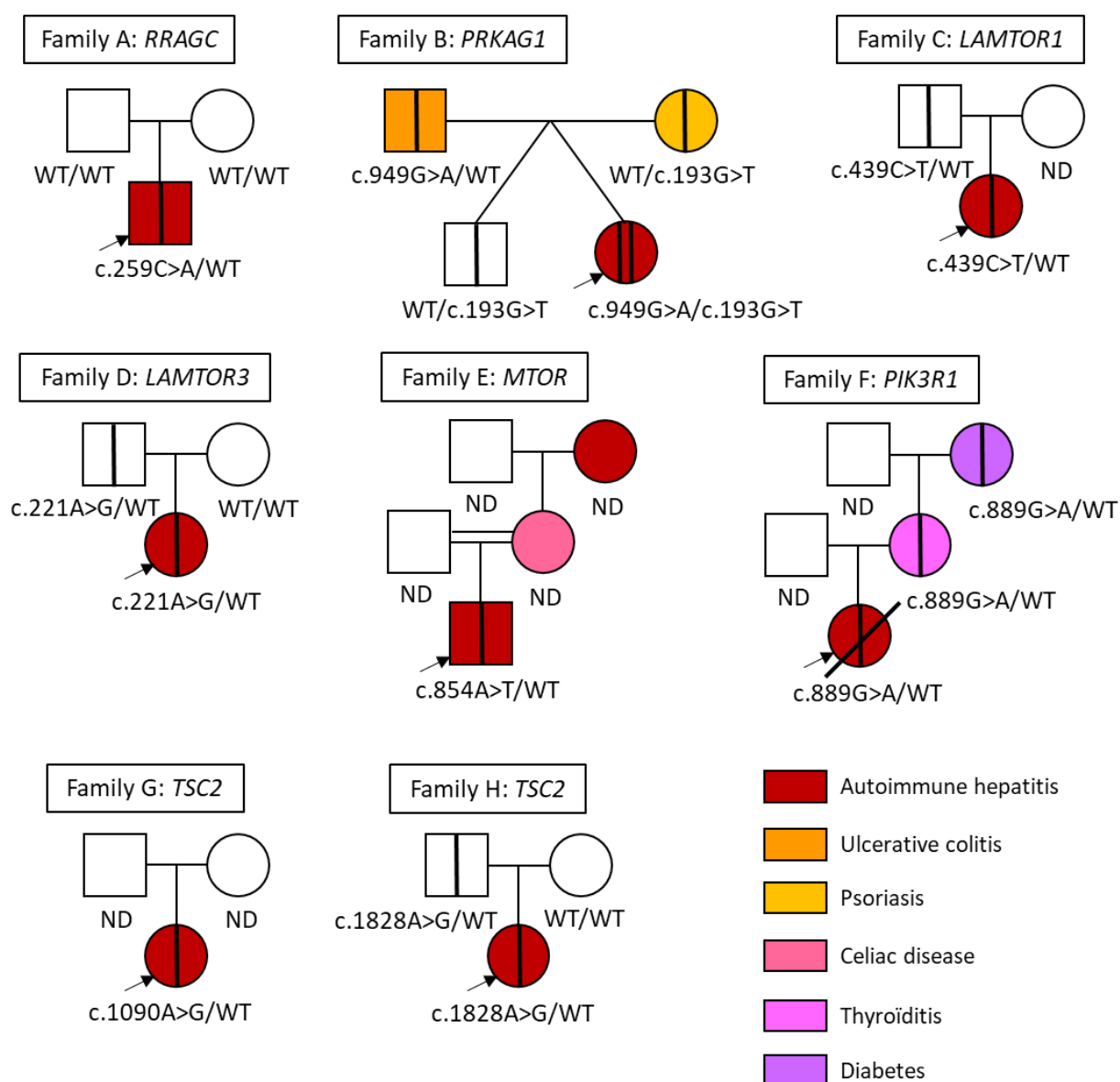


Figure 1. Segregation analysis in eight families with mutations in mTORC1 pathway.

Circles: females; squares: males; vertical bar: carriers of the mutation. The arrow points at the proband. Nomenclature is given for each canonical transcript. *LAMTOR*: late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator; *mTOR*: mechanistic target of rapamycin; ND: No DNA; *PIK3R1*: phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1; *PRKAG1*: protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1; *RRAGC*: Ras related GTP binding C; *TSC*: tuberous sclerosis complex; WT: wild type.

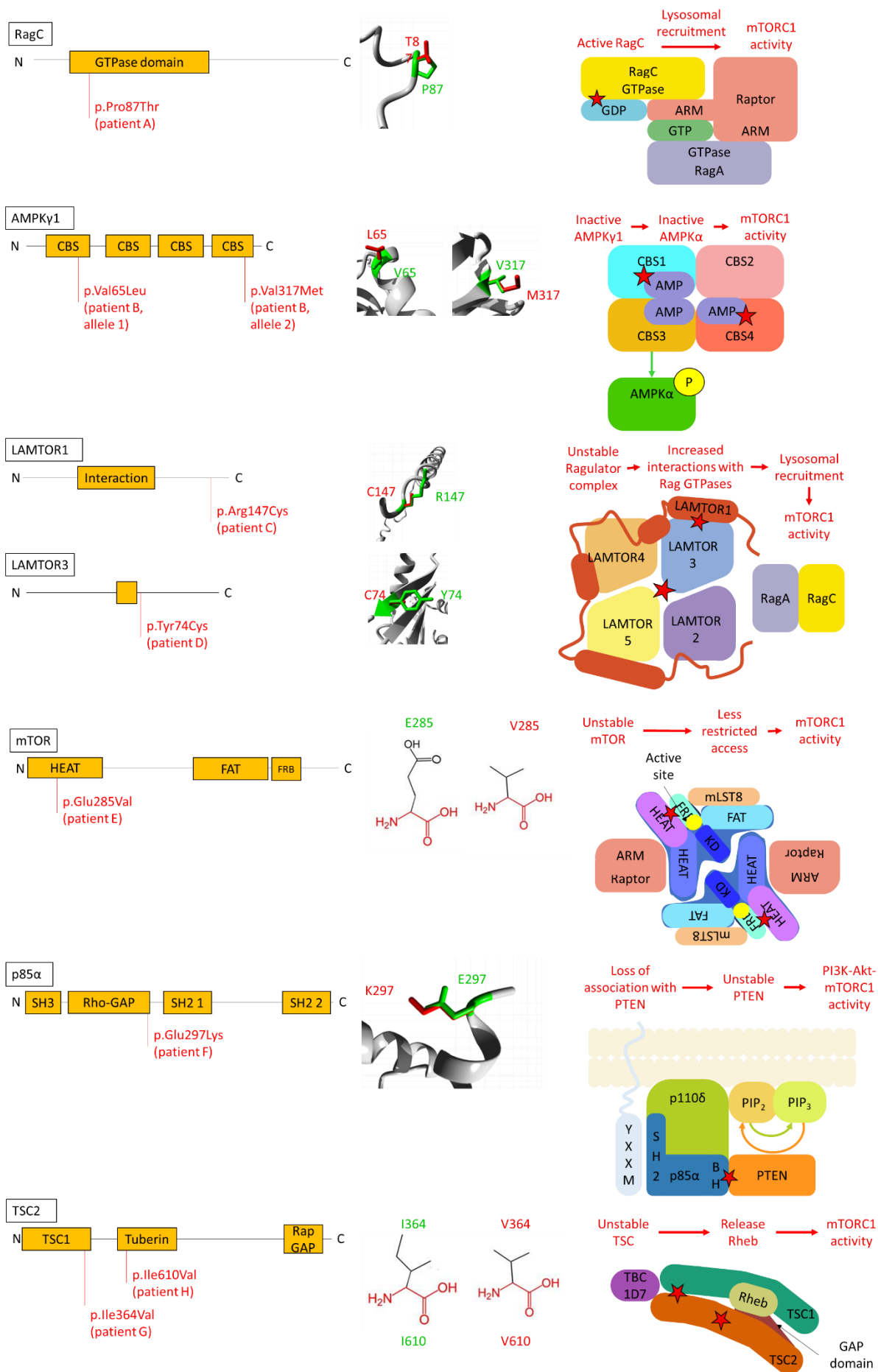


Figure 2. Assumed functional consequences for each mutation. Nomenclature is given for each canonical transcript. AMPK γ 1: AMP-activated protein kinase regulatory subunit gamma-1; ARM: armadillo repeats; CBS: cystathionine-beta synthase; BH: Rho-GAP domain; FAT: Frap, ATM, TRRAP; FRB: FKBP12 Rapamycin binding; GAP: GTPase activating protein; GTP: guanosine triphosphate; HEAT: Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR; KD: kinase domain; LAMTOR: late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator; mLST8: mammalian lethal with Sec13 protein 8; mTOR: mammalian target of rapamycin; PIP: phosphatidyl inositol phosphate; PTEN: Phosphatase TENsin homolog; RagC: Ras-related GTP binding C; SH2: Src homology 2; SH3: Src homology 3; TSC: tuberous sclerosis complex.

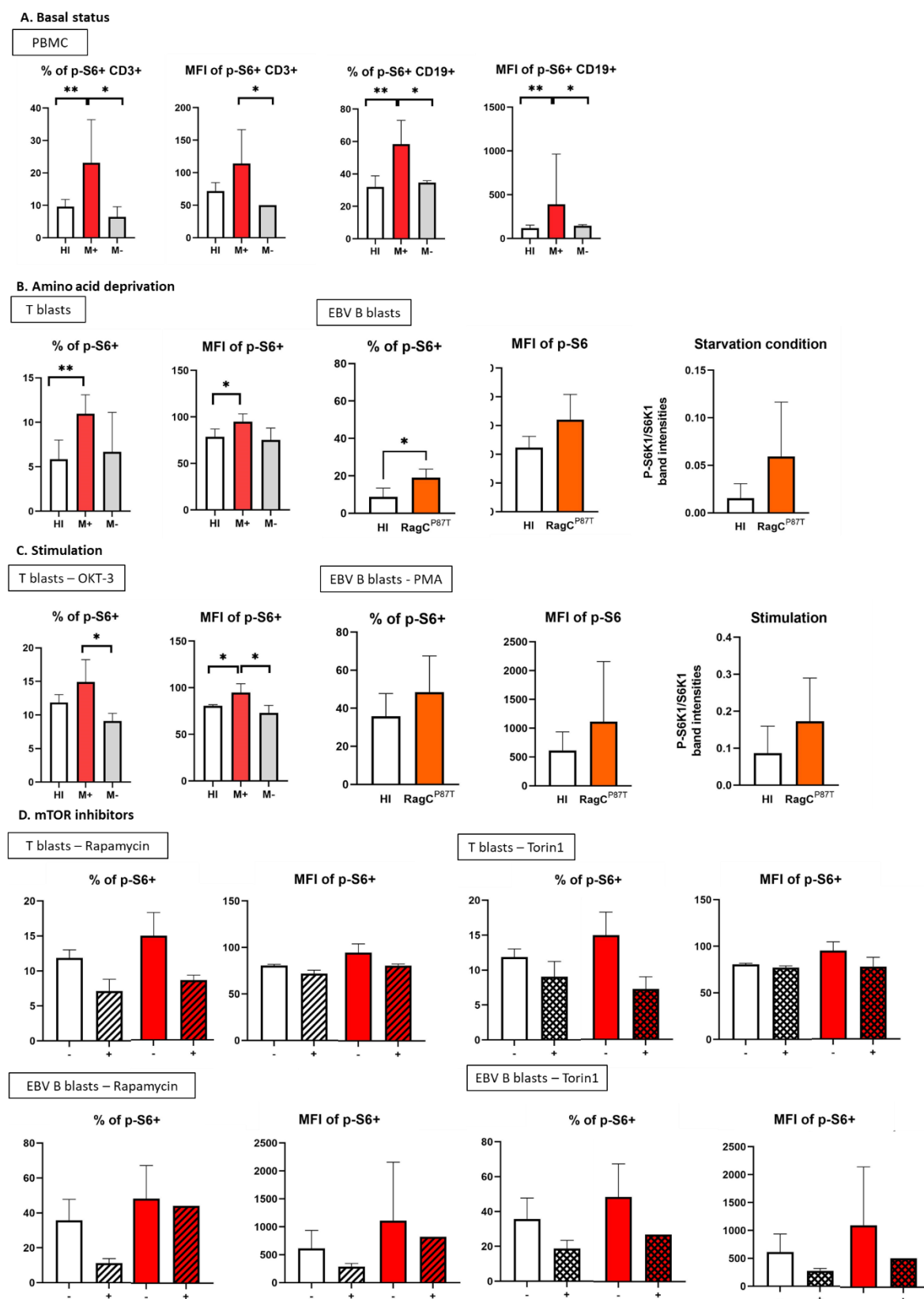


Figure 3. mTORC1 activity in PBMC, T blasts and EBV B blasts. A. Proportions and MFI of p-S6+ in CD3+ and CD19+ cells from unstimulated PBMC. B. Cells were starved in RPMI

without amino acids for one hour. C. Starved T blasts were stimulated with OKT-3 1 µg/ml for 30 minutes. Starved EBV B blasts were stimulated with PMA 20 ng/ml for 30 minutes. D. mTOR inhibitors (Rapamycin, 50 nM; Torin1, 5 µM) were added at starvation onset. EBV: Epstein-Barr Virus; HI: healthy individuals; M+: patients carrying candidate-variants; M-: patients with no identified variants; MFI: median fluorescence of intensity; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; p-S6: phosphor-S6 ribosomal protein.

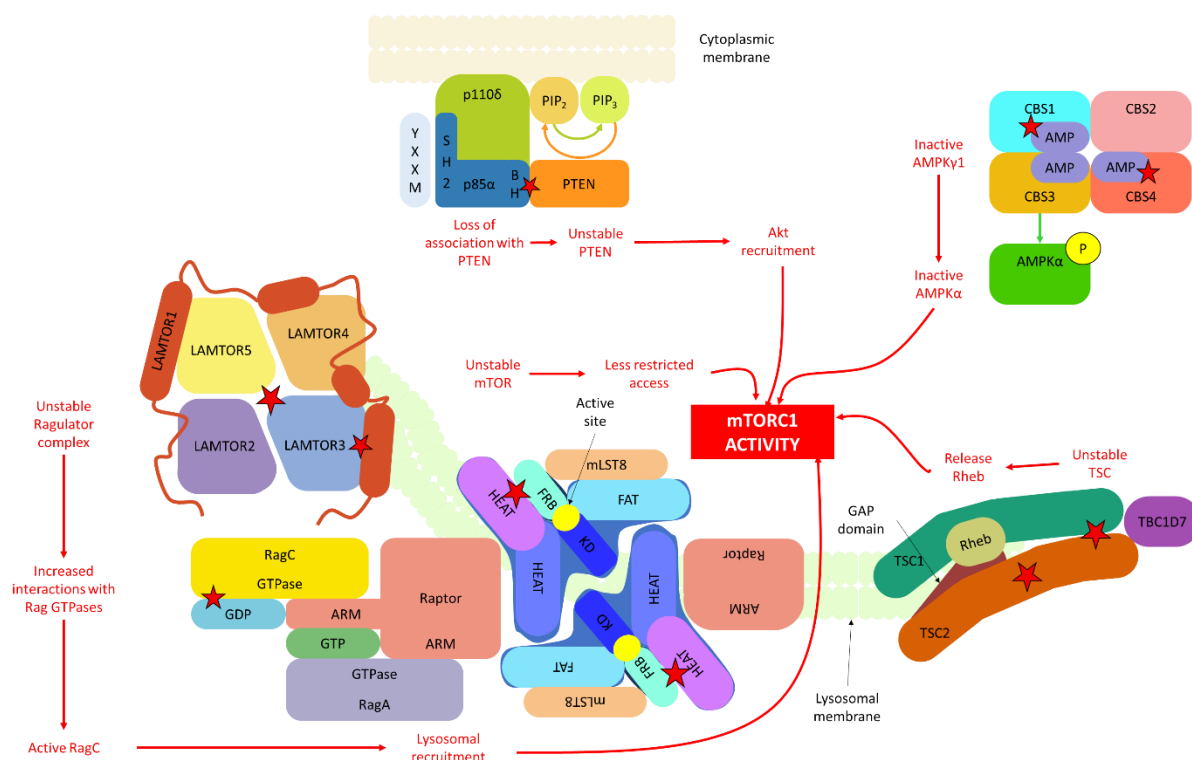


Figure 4. Summary of identified mutations from the study cohort and their impact on mTORC1 activity. RagC GOF promotes its GDP-bound active form, enhancing mTORC1 recruitment to the lysosome and its subsequent activation. LAMTOR1 GOF and LAMTOR3 GOF destabilize the Ragulator complex, increasing its interactions with Rag GTPases. GOF mutation in HEAT repeats domain of mTOR destabilize its structure, decreasing restriction to its active site, facilitating access to substrate of mTORC1. TSC2 LOF destabilizes TSC and releases Rheb, activator of mTORC1. AMPK γ 1 LOF impair AMP-binding to CBS domains, inhibiting AMPK, inhibitor of mTORC1. p85 α LOF impair association with PTEN and its stability, which is an inhibitor of Akt-mTORC1 pathway. AMPK: AMP-activated protein kinase; ARM: armadillo repeats; ; BH: Rho-GAP domain; CBS: cystathionine-beta synthase; FAT: Frap, ATM, TRRAP; FRB: FKBP12 Rapamycin binding; GAP: GTPase-activating protein; GDP: guanine diphosphate; GOF: gain-of-function; GTP: guanine triphosphate; HEAT: Huntingtin, elongation factor 3, PR65/A subunit of protein phosphatase 2A, TOR; KD: kinase domain; LAMTOR: regulator complex proteins, late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator; LOF: loss-of-function; mLST8: mammalian lethal with Sec13

protein 8; mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1; PIP: phosphatidyl inositol phosphate; PTEN: Phosphatase TENsin homolog; Rag: Ras-related GTP-binding protein; Raptor: regulated associated protein of mTOR; Rheb: Ras homolog enriched in brain; SH2: Src homology 2; SH3: Src homology 3; TSC: tuberous sclerosis complex.

Tables

Table 1. Features of the study cohort depending on the type of AIH

Characteristics	AIH-1, n (%)	AIH-2, n (%)
Sex ratio (M/F)	6/0	14/2
Familial history of autoimmunity	4 (67)	9 (56)
Consanguinity	0	1
Media nage at diagnostic	12 (7-26)	6 (1-22)
Hepatomegaly at diagnostic	1 (17)	6 (38)
Splenomegaly at diagnostic	1 (17)	3 (19)
Alanine aminotransferase (IU/L)	780 (23-1542)	506 (49-1923)
Gamma-glutamyl transferase (IU/L)	85 (16-97)	55 (21-409)
Conjugated bilirubin (µmol/L)	59 (4-147)	65 (7-195)
Prothrombin time (%)	43 (31-85)	52 (28-100)
Facteur V (%)	55 (37-83)	46 (30-110)
Gammaglobulins (g/L)	33 (7-63)	20 (13-26)
At least one associated autoimmune disease	2 (33)	11 (69)
At least one relaps	2 (33)	11 (69)
Median follow-up duration (years)	5 (1-16)	13 (1-27)
Ongoing treatment at last visit	5 (83)	15 (94)
Cirrhosis at last visit	3 (50)	7 (44)

Table 2. Detailed reports of the patients carrying candidate-variants in mTORC1 pathway

Patients	A	B	C	D	E	F	G	H
Candidate-variants	<i>RRAGC</i>	<i>PRKAG1</i>	<i>LAMTOR1</i>	<i>LAMTOR3</i>	<i>mTOR</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TSC2</i>	<i>TSC2</i>
Sex	Male	Female	Female	Female	Male	Female	Female	Female
Consanguinity	-	-	-	-	+	-	-	-
Familial AI	-	+	-	-	+	+	-	-
Age at 1st symptoms	12	6.5	0.3	12	13	13	12.5	15
Age at diagnostic	12	15	1.5	12	13	13	12.5	26
Alat, IU/L (N<40)	156	23	280	780	254	49	473	768
Bilirubin, μmol/L (N<5)	32	4	155	36	9	7	104	113
PT, % (N>70)	32	ND	56	52	100	42	38	31
GGT, IU/L (N<40)	20	16	200	97	28	21	409	76
Factor V, % (N >80)	39	ND	64	71	ND	34	ND	37
IgG^f, g/L	25	5	18	33	13	14	26	63
Anti-LKM1	1/640	-	1/640	-	-	-	-	-
Anti-LC-1	-	-	-	-	1/640	1/100	1/640	-
Anti-smooth muscle	-	1/640	-	1/640	-	-	-	-
Anti-nuclear	-	-	-	1/1280	-	-	-	1/1280
IAIHG before/after treatment	16/18	16/18	24/27	19/21*	20/23	14/17	19/22	20/22
Simplified score	7	6	8	6*	7	8	8	7
ESPGHAN score	8	8	11	8*	9	8	8	8
METAVIR score	A2F2	A2F2	A3F3	ND	A2F2	A2F4	A3F4	A3F2

Patients	A	B	C	D	E	F	G	H
Associated diseases	AI	ITP, AIN, AIHA, gastritis	ITP, AIN, celiac disease	diabetes, AIHA, scleritis, alopecia	-	Celiac disease	-	Sjögren syndrome, thyroïditis
Other antibodies	auto-	Anti-gastric parietal cells, anti-GAD, anti-IA2	-	Anti-GAD, anti-IA2, anti-Langerhans islets, anti-insulin	-	Anti-reticulin, anti-gliadin, anti-transglutaminase	-	Anti-double stranded DNA
Follow-up duration	5.7	4.6	22	1	3.4	21.8	20.3	1
Relapse	-	-	+	-	+	+	+	-
Second-line	-	+	+	-	-	-	-	-
Last status	Remission	Cirrhosis	Cirrhosis	Remission	Remission	Deceased	Cirrhosis	Remission
Age at last visit	17	17	23	13	16	34	33	27

*Scores were calculated in the absence of liver biopsy. AI: autoimmune; AIHA: AI hemolytic anemia; AIN: AI neutropenia; ESPGHAN: European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology And Nutrition; GGT: gamma-glutamyl transferase; IAIHG: International AI hepatitis group; ITP: immune thrombocytopenia; LAMTOR: Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator; LC-1: liver cytosol-1; LKM1: liver kidney microsome 1; mTOR: mechanistic target of rapamycin; ND: no data; PIK3R1: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1; PRKAG1 : protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1; PT: prothrombin time; RRAGC : Ras-related GTP binding C; TSC: tuberous sclerosis complex.

Table 3. *In silico* analysis of the nine candidate-variants in mTORC1 signaling pathway

Patients	A	B	B	C	D	E	F	G	H
Gene	<i>RRAGC</i>	<i>PRKAG1</i> (allele 1)	<i>PRKAG1</i> (allele 2)	<i>LAMTOR1</i>	<i>LAMTOR3</i>	<i>mTOR</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TSC2</i>	<i>TSC2</i>
Protein	RagC	AMPK γ 1	AMPK γ 1	LAMTOR1	LAMTOR3	mTOR	p85 α	TSC2	TSC2
Transcript	c.259C>A	c.193G>T	c.949G>A	c.439C>T	c.221A>G	c.854A>T	c.889G>A	c.1090A>G	c.1828A>G
Proteic	p.Pro87Thr	p.Val65Leu	p.Val317Met	p.Arg147Cys	p.Tyr74Cys	p.Glu285Val	p.Glu297Lys	p.Ile364Val	Ile610Val
CADD	27.4	24.5	22.8	34	30	25.4	23.2	24.9	24
Polyphen2	0.998	0.003	0.7	0.627	0.811	0.95	0.003	0.911	0.911
Sift	0	0.03	0.21	0	0.04	0.17	0.52	0.05	0.1
gnomAD	NR	1.42e-5	NR	8.03e-6	NR	NR	9.34e-5	NR	NR
UniProt	Q6HB90	P54619		Q6IAA8	Q9UH44	P42345	P27986	P49815	
PDB	6ULG	5ISO		6EHR	6B9X		1PBW		
OMIM	608267	602742		613510	603296	60734, 616638	615214, 616005, 269880	607341, 606690, 613254	

AMPK: adenosine monophosphate-dependent protein kinase; CADD: combined annotation dependent depletion; gnomAD: Genome Aggregation Database; LAMTOR: late endosomal/lysosomal adaptor mitogen-activated protein kinases and mTOR activator; mTORC1: mechanistic target of rapamycin complex 1; NR: not reported; PIK3R1: Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1; PRKAG1: protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 1; Sift: sorting intolerant from tolerant; RRAGC: Ras-related GTP binding C; TSC: tuberous sclerosis complex. Predictive scores, nomenclature and consequences are given for each canonical transcript. Reference human genome used was GRCh38p.13.

Supplementary data

Supplementary methods

The following antibodies were added to thawed PBMC for lymphocyte phenotyping: anti-CD3 BV510 (OKT3) (iCyt-Sony 2186660), anti-CD4/4 FITC (Leu3a+3b) (BD347413), anti-CD25 PE (2A3) (BD 341011), anti-CD127 PeCy7 (HIL-7R-M21) (BD 560822), anti-CD45Ra APC Vio770 (T6D11) (Miltenyi – 130-096-604), anti-FoxP3 APC (3G3) (Miltenyi 130-093-013), anti-Helios eF450 (22F6) (eBiosciences), anti-CTLA-4.

The following antibodies were added to thawed PBMC for assessment of phospho-S6 ribosomal protein: anti-CD3 PeCy7 (BD 345765), anti-CD4 BV510 (BioLegend, BLE317444), anti-CD19 BV421 (BioLegend, 302234), anti-CD45RA PE (Immunotech, 1834), anti-CD14 FITC (Miltenyi, 130-080-701), and the anti-phospho-S6rp (Ser240/244) (D68/F8) Alexa Fluor® 647 (Cell Signaling Technology, 5044)

Cold-washed cells were lysed for 20 minutes on ice in TNE-glycerol lysis buffer (20 ml of Tris pH 8, 40 ml of glycerol phosphate, 1,6 ml of EDTA 0.5 M, 3.5 g of NaCl, 4 ml of NP40 ; distilled water until 400 ml of final volume) supplemented with 5% of sodium fluoride, 100X of phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich, P5726 et 200-664-3) and protease inhibitor (Invitrogen, 87786). Proteins were quantified using the Pierce™ BCA kit (Invitrogen, 23225). Proteins were reduced with 10X NuPAGE™ (Invitrogen™) and loaded with 4X Protein Sample Loading Buffer (LI-COR Biosciences) in a heating block at 70°C for 10 minutes. Protein migration was performed on NuPAGE™ 10%, Bis-Tris, 1.0 mm mini-gel (Invitrogen™). Transfer was performed with iBlot™ 2 (Invitrogen) on a nitrocellulose membrane. After one hour of blockade with Intercept® Blocking Buffer (LI-COR Biosciences), membrane was stained with primary antibody diluted at 1:1000 in Intercept® T20 Antibody Diluents (LI-COR Biosciences) on a shaker at 4°C overnight; washed 3 times in TBS-Tween® 0,05%; stained with secondary antibody diluted at 1:20 000 on a shaker for one hour and washed

3 times. Odyssey® CLx (LI-COR Biosciences) was used to record the infrared fluorescence signals consistent with the quantity of the proteins, allowing precise and reproducible measure with no signal saturation. Data were analyzed with Image Studio™ (LI-COR Biosciences).

Supplementary table 1. Genes lists for PID and AL-PID**PID genes**

<i>ACD</i>	<i>CD8A</i>	<i>GIMAP6</i>	<i>LCK</i>	<i>POLE2</i>	<i>STAT4</i>
<i>ACP5</i>	<i>CDC42</i>	<i>GIN51</i>	<i>LIG1</i>	<i>POMP</i>	<i>STAT5B</i>
<i>ACTB</i>	<i>CDCA7</i>	<i>HAVCR2</i>	<i>LIG4</i>	<i>PRF1</i>	<i>STIM1</i>
<i>ACTN1</i>	<i>CDH17</i>	<i>HAX1</i>	<i>LIPA</i>	<i>PRKCD</i>	<i>STING1</i>
<i>ADA</i>	<i>CEBPE</i>	<i>HELLS</i>	<i>LPIN2</i>	<i>PRKDC</i>	<i>STK4</i>
<i>ADA2</i>	<i>CFB</i>	<i>NCKAP1L</i>	<i>LRBA</i>	<i>PSMB10</i>	<i>STN1</i>
<i>ADAM17</i>	<i>CFD</i>	<i>HYOU1</i>	<i>LYST</i>	<i>PSMB2</i>	<i>STX11</i>
<i>ADAR</i>	<i>CFH</i>	<i>ICOS</i>	<i>MAGT1</i>	<i>PSMB8</i>	<i>STXBP2</i>
<i>AICDA</i>	<i>CFHR1</i>	<i>ICOSLG</i>	<i>MALT1</i>	<i>PSMG2</i>	<i>STXBP3</i>
<i>AIRE</i>	<i>CFI</i>	<i>IFIH1</i>	<i>MAN2B2</i>	<i>PSTPIP1</i>	<i>TALDO1</i>
<i>AK2</i>	<i>CFP</i>	<i>IFNAR1</i>	<i>MAP3K14</i>	<i>PTCRA</i>	<i>TAP1</i>
<i>ALPI</i>	<i>CHD7</i>	<i>IFNAR2</i>	<i>MAPK8</i>	<i>PTEN</i>	<i>TAP2</i>
<i>AP3B1</i>	<i>CHUK</i>	<i>IFNG</i>	<i>MASP1</i>	<i>PTPRC</i>	<i>TAPBP</i>
<i>AP3D1</i>	<i>CIB1</i>	<i>IFNGR1</i>	<i>MASP2</i>	<i>RAB27A</i>	<i>TAZ</i>
<i>APOL1</i>	<i>CIITA</i>	<i>IFNGR2</i>	<i>MBL2</i>	<i>RAC1</i>	<i>TBK1</i>
<i>ARHGEF1</i>	<i>SH3KBP1</i>	<i>IGHM</i>	<i>MCM4</i>	<i>RAC2</i>	<i>TBX1</i>
<i>ARPC1B</i>	<i>CLPB</i>	<i>IGKC</i>	<i>MEFV</i>	<i>RAG1</i>	<i>TBX21</i>
<i>ATM</i>	<i>COLEC11</i>	<i>IGLL1</i>	<i>MRTFA</i>	<i>RAG2</i>	<i>TCF3</i>
<i>B2M</i>	<i>COPA</i>	<i>IKBKB</i>	<i>MOGS</i>	<i>RASGRP1</i>	<i>TCN2</i>
<i>BACH2</i>	<i>CORO1A</i>	<i>IKBKG</i>	<i>MPO</i>	<i>RBCK1</i>	<i>TERC</i>
<i>BCL10</i>	<i>CR2</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MR1</i>	<i>RC3H1</i>	<i>TERT</i>
<i>BCL11B</i>	<i>CSF2RA</i>	<i>IKZF3</i>	<i>MRE11</i>	<i>KPNA2</i>	<i>TET2</i>
<i>BLM</i>	<i>CSF2RB</i>	<i>IL10</i>	<i>MRTFA</i>	<i>REL</i>	<i>TFRC</i>
<i>BLNK</i>	<i>CSF3R</i>	<i>IL10RA</i>	<i>MS4A1</i>	<i>RELA</i>	<i>TGFB1</i>
<i>BLOC1S6</i>	<i>CTC1</i>	<i>IL10RB</i>	<i>MSH6</i>	<i>RELB</i>	<i>TGFBR1</i>
<i>BTK</i>	<i>CTLA4</i>	<i>IL12B</i>	<i>MSN</i>	<i>RFX5</i>	<i>TGFBR2</i>
<i>C1QA</i>	<i>CTNBL1</i>	<i>IL12RB1</i>	<i>MTHFD1</i>	<i>RFXANK</i>	<i>THBD</i>
<i>C1QB</i>	<i>CTPS1</i>	<i>IL12RB2</i>	<i>MVK</i>	<i>RFXAP</i>	<i>TICAM1</i>
<i>C1QC</i>	<i>CTSC</i>	<i>IL17A</i>	<i>MYD88</i>	<i>RHOH</i>	<i>TIFA</i>
<i>C1R</i>	<i>CXCR2</i>	<i>IL17F</i>	<i>MYSM1</i>	<i>RIPK1</i>	<i>HAVCR2</i>

<i>C1S</i>	<i>CXCR4</i>	<i>IL17RA</i>	<i>NBAS</i>	<i>CARMIL2</i>	<i>TINF2</i>
<i>C2</i>	<i>CYBA</i>	<i>IL17RC</i>	<i>NBN</i>	<i>RMRP</i>	<i>TLR3</i>
<i>C3</i>	<i>CYBB</i>	<i>IL18</i>	<i>NCF1</i>	<i>RNASEH2A</i>	<i>TMC6</i>
<i>C4A</i>	<i>CYBC1</i>	<i>IL18BP</i>	<i>NCF2</i>	<i>RNASEH2B</i>	<i>TMC8</i>
<i>C4B</i>	<i>DACT1</i>	<i>IL1RN</i>	<i>NCF4</i>	<i>RNASEH2C</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>C5</i>	<i>DBR1</i>	<i>IL21</i>	<i>NCKAP1L</i>	<i>RNASEL</i>	<i>TNFRSF13B</i>
<i>C6</i>	<i>DCLRE1B</i>	<i>IL21R</i>	<i>NFAT5</i>	<i>RNF168</i>	<i>TNFRSF13C</i>
<i>C7</i>	<i>DCLRE1C</i>	<i>IL23R</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>RNF31</i>	<i>TNFRSF1A</i>
<i>C8A</i>	<i>DEF6</i>	<i>IL2RA</i>	<i>NFKB1</i>	<i>RNU4ATAC</i>	<i>TNFRSF4</i>
<i>C8B</i>	<i>DGAT1</i>	<i>IL2RB</i>	<i>NFKB2</i>	<i>RORC</i>	<i>TNFRSF9</i>
<i>C8G</i>	<i>DIAPH1</i>	<i>IL2RG</i>	<i>NFKBIA</i>	<i>RIPK1</i>	<i>TNFSF12</i>
<i>C9</i>	<i>DKC1</i>	<i>IL36RN</i>	<i>NFKBID</i>	<i>RPSA</i>	<i>TNFSF13</i>
<i>CACNA1F</i>	<i>DNAJC21</i>	<i>IL6R</i>	<i>NHEJ1</i>	<i>RTEL1</i>	<i>TOM1</i>
<i>CARD11</i>	<i>DNASE1L3</i>	<i>IL6ST</i>	<i>NHP2</i>	<i>SAMD9</i>	<i>TOP2B</i>
<i>CARD14</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>IL7</i>	<i>NLRC4</i>	<i>SAMD9L</i>	<i>TPP2</i>
<i>CARD8</i>	<i>DOCK11</i>	<i>IL7R</i>	<i>NLRP1</i>	<i>SAMHD1</i>	<i>TRAC</i>
<i>CARD9</i>	<i>DOCK2</i>	<i>INO80</i>	<i>NLRP12</i>	<i>SBDS</i>	<i>TRAF3</i>
<i>CARMIL2</i>	<i>DOCK8</i>	<i>IRAK1</i>	<i>NLRP2</i>	<i>SEC61A1</i>	<i>TRAF3IP2</i>
<i>CASP10</i>	<i>DSG1</i>	<i>IRAK4</i>	<i>NLRP3</i>	<i>SEMA3E</i>	<i>TREX1</i>
<i>CASP8</i>	<i>ELANE</i>	<i>IRF1</i>	<i>NOD2</i>	<i>SERPING1</i>	<i>TRIM22</i>
<i>CCBE1</i>	<i>EOMES</i>	<i>IRF2BP2</i>	<i>NOP10</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TRNT1</i>
<i>TNFSF9</i>	<i>EPG5</i>	<i>IRF3</i>	<i>NOS2</i>	<i>SH3BP2</i>	<i>TTC37</i>
<i>FCGR3A</i>	<i>ERBIN</i>	<i>IRF4</i>	<i>NRAS</i>	<i>SH3KBP1</i>	<i>TTC7A</i>
<i>CD19</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>IRF7</i>	<i>NSMCE3</i>	<i>SHARPIN</i>	<i>TYK2</i>
<i>CD244</i>	<i>EXTL3</i>	<i>IRF8</i>	<i>OAS1</i>	<i>SKIV2L</i>	<i>UNC119</i>
<i>CD247</i>	<i>FAAP24</i>	<i>IRF9</i>	<i>ORAI1</i>	<i>SLC11A1</i>	<i>UNC13D</i>
<i>CD27</i>	<i>FADD</i>	<i>ISG15</i>	<i>OTULIN</i>	<i>SLC29A3</i>	<i>UNC93B1</i>
<i>CD28</i>	<i>FAS</i>	<i>ITCH</i>	<i>PARN</i>	<i>SLC35C1</i>	<i>UNG</i>
<i>CD3D</i>	<i>FASLG</i>	<i>ITGAX</i>	<i>PAX1</i>	<i>SLC39A7</i>	<i>USB1</i>
<i>CD3E</i>	<i>FCHO1</i>	<i>ITGB2</i>	<i>PAX5</i>	<i>SLC46A1</i>	<i>USP18</i>
<i>CD3G</i>	<i>FCN3</i>	<i>ITK</i>	<i>PCNA</i>	<i>SLC7A7</i>	<i>VPS13B</i>
<i>CD4</i>	<i>FERMT1</i>	<i>ITPKB</i>	<i>PGM3</i>	<i>SMARCAL1</i>	<i>VPS45</i>
<i>CD40</i>	<i>FERMT3</i>	<i>JAGN1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SNORA31</i>	<i>WAS</i>

<i>CD40LG</i>	<i>FNIP1</i>	<i>JAK1</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>SOCS1</i>	<i>WASF2</i>
<i>CD46</i>	<i>FOXN1</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>SP110</i>	<i>WIPF1</i>
<i>CD48</i>	<i>FOXP3</i>	<i>JAK3</i>	<i>PLCG2</i>	<i>SPI1</i>	<i>WDR1</i>
<i>CD55</i>	<i>FPR1</i>	<i>MAPK8</i>	<i>PMS2</i>	<i>SPINK5</i>	<i>XIAP</i>
<i>CD59</i>	<i>G6PC3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PNP</i>	<i>SPPL2A</i>	<i>XRCC4</i>
<i>CD70</i>	<i>G6PD</i>	<i>KMT2A</i>	<i>POLA1</i>	<i>SRP54</i>	<i>ZAP70</i>
<i>CD79A</i>	<i>GATA2</i>	<i>KMT2D</i>	<i>POLD1</i>	<i>STAT1</i>	<i>ZBTB24</i>
<i>CD79B</i>	<i>GFI1</i>	<i>KRAS</i>	<i>POLD2</i>	<i>STAT2</i>	<i>ZNF341</i>
<i>CD81</i>	<i>GIMAP5</i>	<i>LAT</i>	<i>POLE</i>	<i>STAT3</i>	

AL-PID

<i>FAS</i>	<i>SETBP1</i>	<i>STXBP2</i>	<i>IL2RA</i>	<i>SOCS1</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IKBKA</i>
<i>FASLG</i>	<i>ASXL1</i>	<i>MYO5A</i>	<i>IL2RB</i>	<i>SOCS2</i>	<i>IKZF2</i>	<i>IKBKB</i>
<i>FADD</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>RAB27A</i>	<i>JAK1</i>	<i>SOCS3</i>	<i>IKZF3</i>	<i>IKBKG</i>
<i>CASP10</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>JAK2</i>	<i>SOCS5</i>	<i>IKZF4</i>	<i>NFKBIA</i>
<i>CASP8</i>	<i>CTLA4</i>	<i>XIAP</i>	<i>JAK3</i>	<i>PIAS3</i>	<i>AIRE</i>	<i>NFKBIB</i>
<i>NRAS</i>	<i>LRBA</i>	<i>WAS</i>	<i>STAT1</i>	<i>NFATC1</i>	<i>FOXP3</i>	<i>REL</i>
<i>KRAS</i>	<i>NBEAL2</i>	<i>RAG1</i>	<i>STAT2</i>	<i>NFATC2</i>	<i>ADA2</i>	<i>RELA</i>
<i>HRAS</i>	<i>PRF1</i>	<i>RAG2</i>	<i>STAT3</i>	<i>NFATC3</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>RELB</i>
<i>PTPN11</i>	<i>UNC13D</i>	<i>TPP2</i>	<i>STAT5B</i>	<i>NFATC4</i>	<i>SHARPIN</i>	<i>NFKB1</i>
<i>CBL</i>	<i>STX11</i>	<i>CARD11</i>	<i>STAT6</i>	<i>NFAT5</i>		<i>NFKB2</i>

Supplementary table 2. Sequences of the specific primers designed for Sanger sequencing confirmation

Gene	Exon	Forward (3' -> 5')	Reverse (3' -> 5')
<i>RRAGC</i>	2	GAG-CCT-GAG-GTA-GGC- ATT-CA	GAG-ATG-CAG-TTG-CAG- AGT-GC
<i>PRKAG1</i>	3	CTG-CAG-GTG-GGT-GAA- ATC-CT	GGA-GAC-AAG-CTT-CAG- GCA-GT
<i>PRKAG1</i>	8	AGC-CTT-GAG-AGT-GGG- GTT-TG	TGC-CCT-TCT-ATC-TGG- GAG-CT
<i>LAMTOR1</i>	5	AGG-GTA-TGG-CAG-AGG- GTT-CA	TCA-TCC-AGA-CCC-TGG- TCA-CA
<i>LAMTOR3</i>	5	GGG-CTG-TAA-ATC-TCT- CTA-CCA-T	TTC-AGT-TGT-CAT-TTT- TGT-GCC-T
<i>mTOR</i>	7	AGT-TGC-GTT-TCG-GGA- TTA-GG	GGA-AAG-GGC-CTC-TCA- CCA-C
<i>PIK3R1</i>	7	AGA-TTC-TCA-GCA-GCC- AGG-TAA-G	AGT-TCC-CTG-TAC-CCT- TCA-ACA-TT
<i>TSC2</i>	11	GCC-CCT-GAT-AAA-CGT- GTG-GT	TGC-CAG-AAC-CGT-GTT- CTC-TG
<i>TSC2</i>	17	GCT-GTC-TTA-GGA-CTG- CGT-TT	AGG-TAT-CCC-CGT-CTC- GGC

Supplementary table 3. Auto-antigens from the microarray

Category	Antigenic target	Disease
Nuclear antigen	dsDNA, ssDNA, gDNA	SLE
	Nucleosome, chromatin	SLE
	<i>Core histone</i> , histones (H1, H2A, H2B, H3, H4)	SLE
	Scl-70, DNA topoisomerase I	SSc
	Centromeres: CENP-A, CENP-B	SSc
	PCNA, Ku (P70/P80)	SLE
	Mi-2, TIF1/TRIM33, MDA5/IFIH1	DM
	SP100	PBC
	ssRNA	SLE
	Ro/SSA, 52 kDa, Ro/SSA, 60 kDa, La/SSB	Sjögren
	Smith antigen: Sm, Sm/RNP, SmD, SmD1, SmD2, SmD3	SLE
	U1-snRNP 68/70, U1-snRNP A, B/B' et C	
	Nuclear exosome: PM/Scl-75 et PM/Scl 100	SSc
	Nucleolin (C23)	
	Ribosomal phosphoproteins: P0, P1, P2	
	Jo-1, PL-7, PL-12)	DM
	SRP54	
	POLB	
Membranar and cytoplasmic proteins	ANCA : MPO, PR3 and BPI	
	LKM1, LC1	AIH-2
	Cytochrome C	SLE
	M2	CBP
	TTG	CD
	Beta2-microglobulin	SLE, RA
	Proteoglycans: aggrecan, alpha-fodrin, chondroitin sulfate C, decorine-bovine, heparane sulfate, HSPG	
	Muscarinic receptor, Myosin	Myasthenia
	Vimentin	
	gp210, Nup 62	
Cellular matrix proteins	Collagens (I, II, III, IV, V, VI)	SSc
	Fibrinogen (IV, S)	
	Fibronectin, vitronectin	
Phospholipids	Beta2-GP1, cardiolipin, GP2	APLS
Glomerulitis-specific proteins	MBG	Goodpasture
	Alpha-actinin, laminin, amyloïd, elastin, matrigel	
	AGTR	
Thyroid	Thyroglobulin, thyroperoxydase	Hashimoto
Gut-specific proteins	Gliadin, deaminated gliadin peptides	CD
Central nervous system	AQP4, basic protein of myelin, sphingomyelin	
Microbial proteins	Lipopolysaccharides, EBNA1	
External agents	Entactin EDTA, matrigel	
Circulating proteins	Complement: C1q, C3, C3a, C4, C5, C6, C7, C8, C9	SLE
	Prothrombin, heparin	
	Intrinsic factors: B, D, H, I, P	
	Intrinsic factor	Biermer
	CRP, TNF-alpha	
	Human glycated albumin	
	Hemocyanin, peroxiredoxin 1	
	Insulin	Diabetes
	DAMP: S100	

AIH: autoimmune hepatitis; APLS: antiphospholipid syndrome; CD: celiac disease; DM: dermatomyositis; ds: double-stranded; g: genomic; PBC: primary biliary cirrhosis; RA: rheumatoid arthritis; SLE: systemic lupus erythematosus; ss: single-stranded; SSc: systemic sclerosis

Supplementary table 4. Diagnostic scores calculated in each patient

Patients	IAIHG scores		Simplified score	ESPGHAN score
	Before treatment	After treatment		
A	16	18	7	8
B	16	18	6	8
C	24	27	8	11
D	19*	21*	6*	8*
E	20	23	7	9
F	14	17	8	8
G	19	22	8	8
H	20	22	7	8
1	20	23	7	8
2	21	24	8	10
3	21	24	8	9
4	15*	18*	6*	7*
5	20	23	8	8
6	18	21	6	7
7	18*	20*	6*	7*
8	15*	18*	6*	7*
9	18	21	7	10
10	15	17	6	7
11	21	23	8	10
12	20	23	8	11
13	17	19	8	10
14	17*	19*	6*	7*

*Scores were calculated in the absence of liver biopsy.

Supplementary table 5. Detailed diagnostic scores for patients carrying variants

Patients		A	B	C	D	E	F	G	H	
IAIHG score										
Sex	Female	+2	Male	Female	Female	Female	Male	Female	Female	Female
Blood ALP:AST ratio	>3	-2		38				4.1		
	1.5-3	0	NA							
	<1.5	+2			1.3	0.8	0.9		0.7	0.1
Serum globulins or IgG (times above normal)	>2	+3			2.2	2.8				4.9
	1.5-2	+2	1.9						2	
	1-1.5	+1					1.1	1.2		
	<1	0		0.4						
ANA, SMA, anti-LKM-1 or anti-LC-1 antibodies titres	>1:80	+3	Anti- LKM1 > 1/640	SMA 1/640	Anti- LKM1 1/640	SMA 1/640	Anti- LC-1 1/640	Anti- LC-1 1/100	Anti- LC-1 1/640	ANA 1/1280
	1:80	+2								
	1:40	+1								
	<1:40	0								
AMA	Positive	-4	-	-	-	-	-	-	-	-
Viral markers of active infection	Positive	-3								
	Negative	+3	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatotoxic drug history	Yes	-4								
	No	+2	No	No	No	No	No	No	No	No
Average alcohol	<25g/day	+2	+	+	+	+	+	+	+	+
	>60g/day	-2								
Histological features*	Interface hepatitis	+3	+	+	+		+	+	+	+

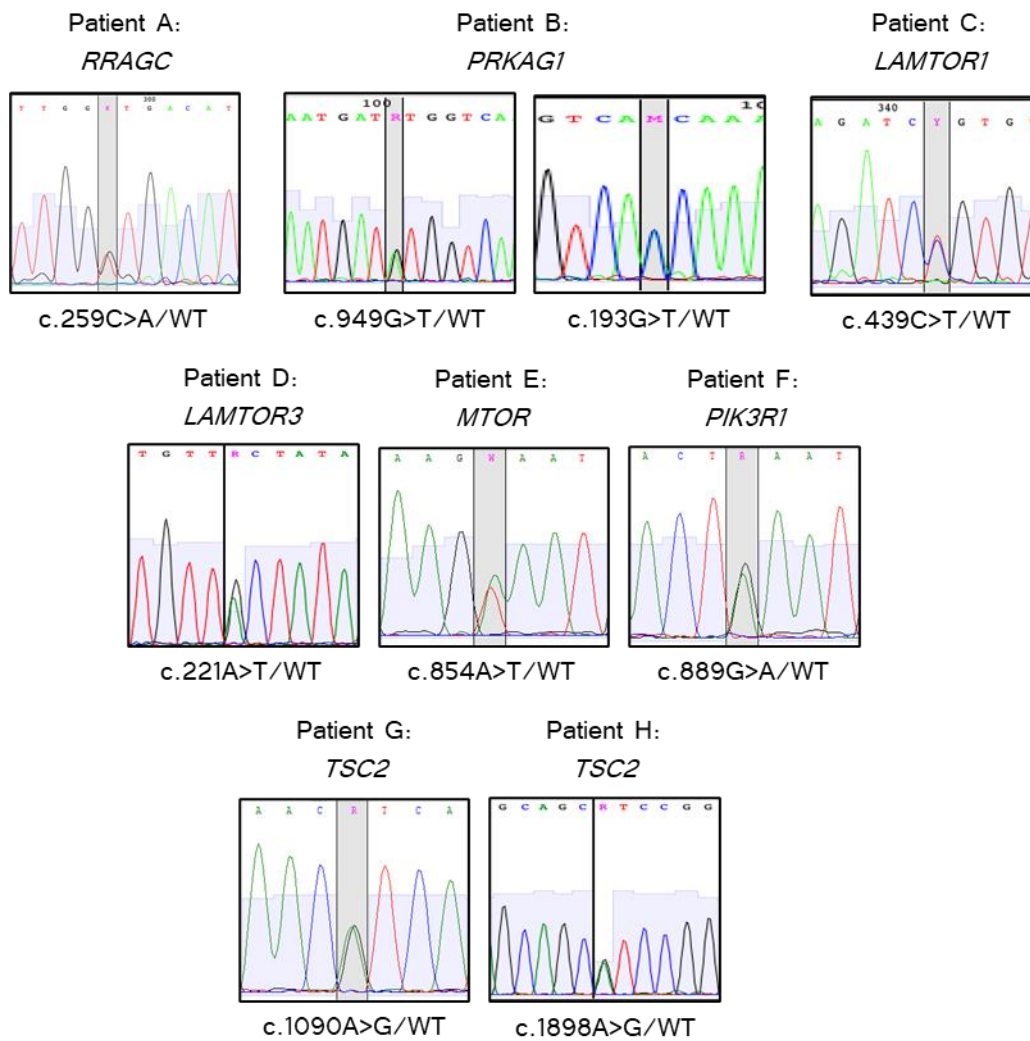
Patients			A	B	C	D	E	F	G	H
	Plasma cells	+1	+	+	+		+			+
	Rosettes	+1								
	None of the above	-5								
	Biliary changes	-3	+							+
	Atypical changes	-3								
Immune diseases (thyroiditis, colitis, other)		+2	+	+	+	-	+	-	-	+
HLA	DR3/DR4	+1	DR3	NA	DR3	NA	DR3	NA	NA	NA
Seropositivity for other autoantibodies (anti-SLA/LP, actin, ASGPR, pANNA)		+2				Anti-actin				
Pre-treatment score	final	Definite AIH	> 15	16	16	24	19*	20	19	20
		Probable AIH	10-15					14		
Response to therapy	Remission	+2	+	+		+				+
	Relapse	+3			+		+	+	+	
Post-treatment score	final	Definite AIH	>17	18	18	27	21*	23	22	22
		Probable AIH	12-17					17		
Simplified score										
ANA	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2								1/1280
Or SMA	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2		1/640		1/640				
Or anti-LKM-1 or anti-LC-1	≥1 :40	1								
	≥1 :80	2	Anti-LKM1 > 1/640		Anti-LKM1 1/640		Anti-LC-1 1/640	Anti-LC-1 1/100	Anti-LC-1 1/640	
Or SLA	Positive	2								

Patients			A	B	C	D	E	F	G	H
IgG	>ULN	1		0.4			1.1			
	>1.10 times ULN	2	1.9		2.2	2.8		1.2	2	4.9
Liver histology*	Compatible with AIH	1	1							1
	Typical of AIH	2		2	2		2	2	2	
Absence of viral hepatitis	Yes	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Score	Definite AIH	≥7	7		8		7	8	8	7
	Probable AIH	≥6		6		6*				
ESPGHAN score										
Serology max. 2 points for addition of ANA, SMA, anti-LKM1, anti-LC-1, anti-SLA	ANA and/or SMA ≥1 :20	1								
	≥1 :80	2		SMA 1/640		SMA 1/640				ANA 1/1280
	Anti-LKM1 ≥1 :10	1								
	≥1 :80	2	> 1/640		1/640					
	Anti-LC-1	2					1/640	1/100	1/640	
	Anti-SLA	2								
pANNA	Positive	1								
IgG	> ULN	1		0.4			1.1	1.2		
	>1.20 ULN	2	1.9		2.2	2.8			2	4.9
Liver histology*	Compatible with AIH	1	1							1
	Typical of AIH	2		2	2		2	2	2	
Absence of other liver diseases (viral hepatitis, NASH, Wilson disease, DILI)		2	2	2	2	2	2	2	2	2
Concomitant diseases	Extrahepatic autoimmunity	1	1	1	1	-	1	-	-	1

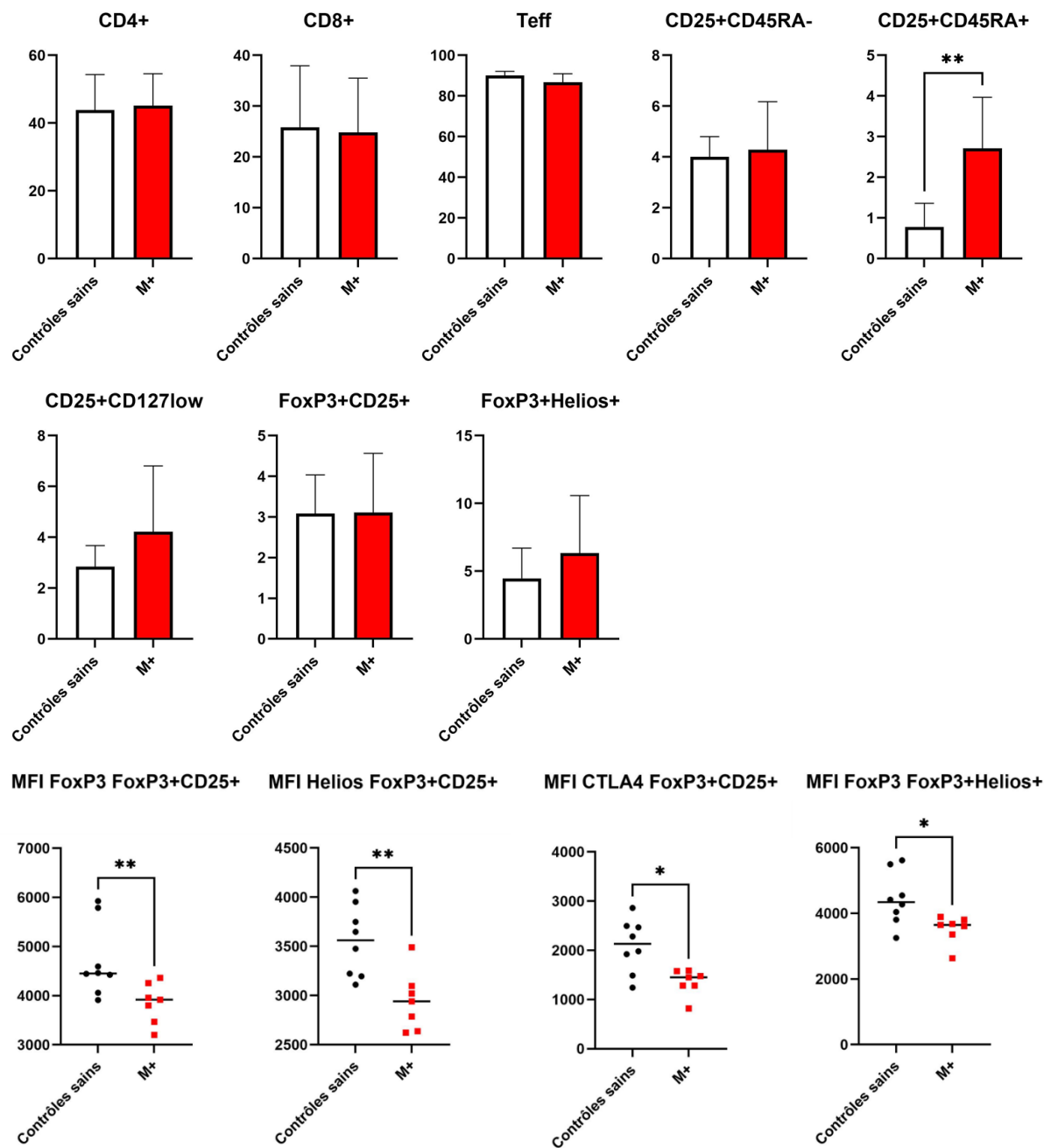
Patients			A	B	C	D	E	F	G	H
Family history	AI disease	1	-	1	-	-	1	1	-	-
Cholangiography	Normal	2			2	2				
	Abnormal	-2								
Score	Definite AIH	≥8	8	8	11	8*	9	8	8	8
	Probable AIH	≥7								

*Scores were calculated even in absence of liver biopsy. AI: autoimmune; AIH: autoimmune hepatitis; ALP: alkaline phosphatase; AMA: anti-mitochondrial antibodies; ANA: antinuclear antibodies; ASGPR: asialoglycoprotein receptor; AST: alanine aspartate; DILI: drug induced liver injury; ESPGHAN: European society of pediatric gastroenterology hepatology and nutrition; HLA: human leukocyte antigen; IAIHG: international AIH group; Ig: immunoglobulin; LC-1: liver cytosol-1; LKM1: liver kidney microsome 1; LP: liver pancreas; NA: not available; NASH: non alcoholic steatosis hepatitis; pANNA: antinuclear neutrophil antibodies; SLA: soluble liver antigen; SMA: smooth muscle antibodies; ULN: upper limit of the normal.

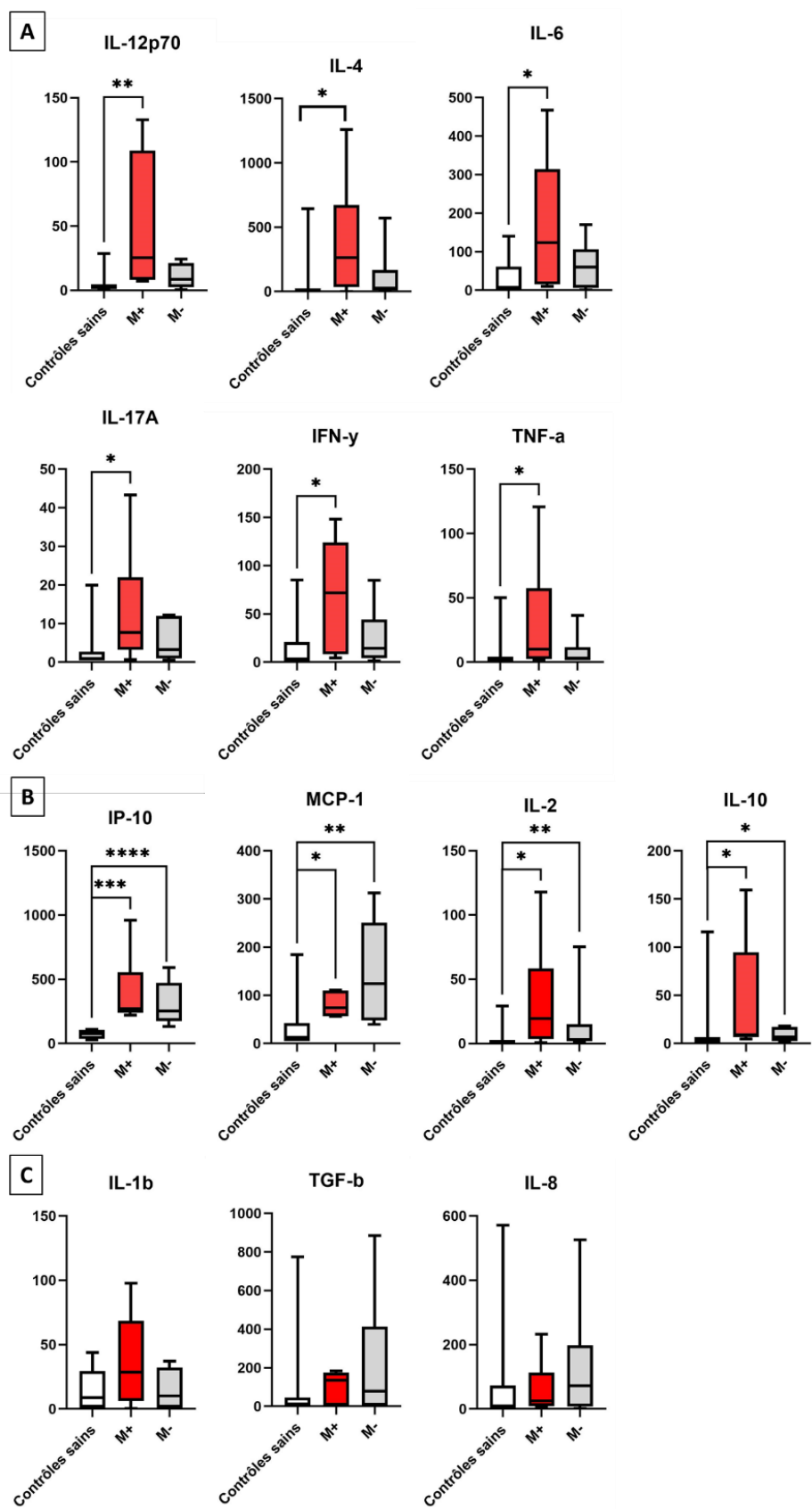
Supplementary Figure 1. Confirmation of mutations by Sanger sequencing



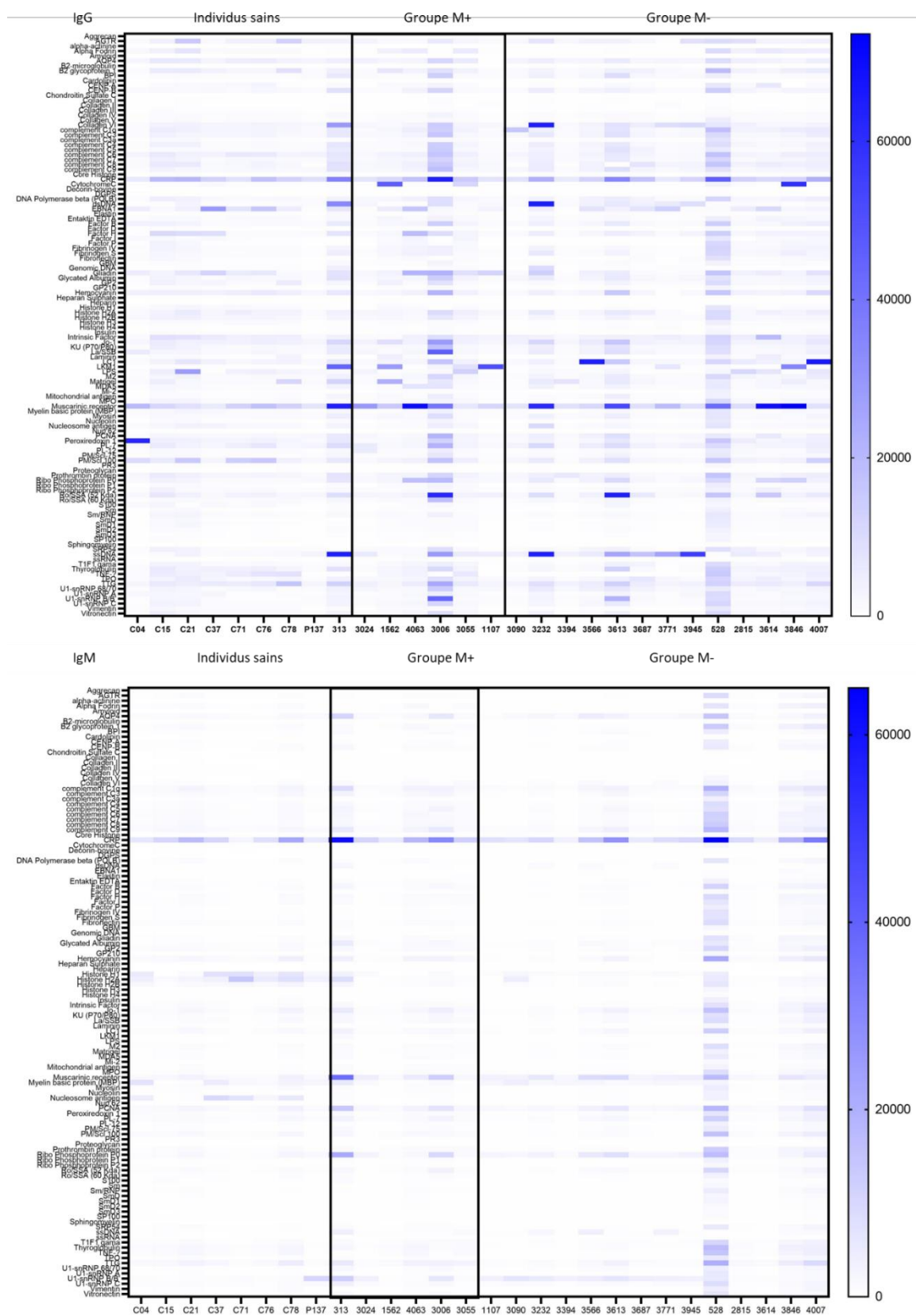
Supplementary Figure 2. Immunophenotyping of regulatory T cells



Supplementary Figure 3. Quantification of plasmatic cytokines



Supplementary Figure 4. Autoantigen array



ANNEXE 9 : PEDIATRIC-ONSET EVANS SYNDROME : HETEROGENEOUS PRESENTATION AND HIGH FREQUENCY OF MONOGENIC DISORDERS INCLUDING LRBA AND CTLA4 MUTATIONS



Pediatric-onset Evans syndrome: Heterogeneous presentation and high frequency of monogenic disorders including LRBA and CTLA4 mutations

Caroline Besnard^{a,c,d,1}, Eva Levy^{a,b,1}, Nathalie Aladjidi^e, Marie-Claude Stolzenberg^{a,b}, Aude Magerus-Chatinet^{a,b}, Olivier Alibeu^f, Patrick Nitschke^{b,g}, Stéphane Blanche^{b,c}, Olivier Hermine^{b,h}, Eric Jeziorskiⁱ, Judith Landman-Parker^{d,j}, Guy Leverger^j, Nizar Mahlaoui^c, Gérard Michel^k, Isabelle Pellier^l, Felipe Suarez^{b,m,n}, Isabelle Thuret^o, Geneviève de Saint-Basile^{b,p,q}, Capucine Picard^{b,c,q}, Alain Fischer^{a,b,c,r}, Bénédicte Neven^{a,b,c}, Frédéric Rieux-Laucat^{a,b,*,1}, Pierre Quartier^{a,b,c,1}, on behalf of the Members of the French reference center for pediatric autoimmune cytopenias (CEREVANCE)

^a INSERM UMR 1163, Laboratory of Immunogenetics of pediatric autoimmune diseases, Paris, France

^b Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^c Pediatric immuno-hematology and rheumatology unit, RAISE reference centre for pediatric inflammatory rheumatic diseases and systemic autoimmune diseases, Necker-Enfants Malades University Hospital, Assistance publique – Hôpitaux de Paris, France

^d Sorbonne Universités, UPMC université Paris 06, Paris, France

^e Pediatric Hematology Oncology Immunology, Centre de Référence National des Cytopénies Auto-immunes de l'enfant, CEREVANCE, CIC 1401, CHU Bordeaux, France

^f Genomic Platform, INSERM UMR 1163, Paris Descartes Sorbonne Paris Cité University, Imagine Institute, Paris, France

^g INSERM UMR 1163, Bioinformatics Department, Imagine Institute, Paris, France

^h Hematology, Immunology, Infectiology, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

ⁱ Pediatrics, Infectiology, Rheumatology, Hôpital Arnaud de Villeneuve, CHRU de Montpellier, France

^j Pediatric hematology, Immunology, Oncology, Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, Assistance publique – Hôpitaux de Paris, Paris, France

^k Department of Pediatric Hematology and Oncology, Research Unit EA 3279, Aix-Marseille University, Timone Hospital, Marseille, France

^l Pediatric Oncology, Hematology, Immunology, CHU d'Angers, Angers, France

^m Adult hematology, Necker-Enfants Malades University Hospital, APHP, Paris, France

ⁿ Inserm U1163, CNRS ERL 8254, Imagine Institute, Paris, France

^o Pediatrics and Pediatric hematology, Hôpital de la Timone, Marseille, France

^p INSERM UMR 1163, Laboratory of Normal and pathological homeostasis of the immune system, Paris, France

^q Study Center for Primary Immunodeficiencies, Necker-Enfants Malades Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Necker Medical School, Paris, France

^r Collège de France, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 August 2017

Received in revised form 16 December 2017

accepted with revision 20 December 2017

Available online 10 January 2018

Keywords:

Autoimmune cytopenias

Immune checkpoint deficiencies

Extensive genetic screening

LRBA and CTLA-4 deficiencies

ABSTRACT

Evans syndrome (ES) is defined by the combination of autoimmune hemolytic anemia and immune thrombocytopenia. Clinical presentation includes manifestations of immune dysregulation, found in primary immune deficiencies, autoimmune lymphoproliferative syndrome with FAS (ALPS-FAS), Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA-4) and Lipopolysaccharide-Responsive vesicle trafficking Beige-like and Anchor protein (LRBA) defects. We report the clinical history and genetic results of 18 children with ES after excluding ALPS-FAS. Thirteen had organomegaly, five lymphocytic infiltration of non-lymphoid organs, nine hypogammaglobulinemia and fifteen anomalies in lymphocyte phenotyping. Seven patients had genetic defects: three *CTLA4* mutations (c.151C > T; c.109 + 1092_568-512del; c.110-2A > G) identified by Sanger sequencing and four revealed by Next Generation Sequencing: *LRBA* (c.2450 + 1C > T), *STAT3* gain-of-function (c.2147C > T; c.2144C > T) and *KRAS* (c.37G > T). No feature emerged to distinguish patients with or without genetic diagnosis. Our data on pediatric-onset ES should prompt physicians to perform extensive screening for mutations in the growing pool of genes involved in primary immune deficiencies with autoimmunity.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ES, Evans syndrome; AIHA, Autoimmune hemolytic anemia; ITP, Immune thrombocytopenia; ALPS, Autoimmune lymphoproliferative syndrome; CTLA-4, Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4; LRBA, Lipopolysaccharide-Responsive and Beige-like Anchor protein; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; KRAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; Ig, Immunoglobulin; PID, Primary Immune Deficiencies; Treg, regulatory T-cell; NGS, Next Generation Sequencing; WES, Whole Exome Sequencing; PCR, Polymerase chain reaction; Ab, antibodies; RALD, Ras-associated autoimmune leukoproliferative disorder.

* Corresponding author at: INSERM UMR 1163, Institut Imagine, 24 boulevard du Montparnasse, 75015 Paris, France.

E-mail address: frederic.rioux-laucat@inserm.fr (F. Rieux-Laucat).

¹ Statement of equal authors' contributions: Caroline Besnard and Eva Lévy contributed equally to this work. Frédéric Rieux-Laucat and Pierre Quartier contributed equally to this work.

1. Introduction

In 1951, R. Evans demonstrated the spectrum-like relationship between autoimmune hemolytic anemia (AIHA) and immune thrombocytopenic purpura (ITP) [1]. Evans syndrome (ES) has a chronic and relapsing history with a heavy burden of mortality and complications although the therapeutic armamentarium has expanded during the last 35 years [2]. The high incidence of combination of AIHA and ITP in systemic acquired autoimmune diseases supports the consideration of an identical immune causative mechanism [3]. ES is a diagnosis of exclusion. The clinical presentation can be polymorph, with hepatomegaly, splenomegaly and lymphadenopathy [4–6]. A number of patients with ES have abnormal immunoglobulin (Ig) and lymphocytes levels [7–9]. Indeed, Teachey et al. showed that a subset of patients with ES have autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), a rare disorder of abnormal lymphocyte survival caused by an underlying genetic defect [10, 11]. Furthermore, AIHA and ITP are frequently observed in patients with primary immune deficiencies (PID) with a risk factor at least 120 times higher compared to the general pediatric population [12]. Therefore, a number of non-ALPS patients with ES may have other monogenic PID. Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4 (CTLA4) or Lipopolysaccharide-Responsive Beige-like and Anchor protein (LRBA) defects are immune checkpoint deficiencies among PID, and their clinical features are frequently associated with ES. CTLA-4 is a key protein in the immune response suppression. Expressed in T-cells, CTLA-4 inhibits their activation and proliferation by competing with the principal T-cell costimulatory molecule, CD28, for the same ligands [13]. Mice with knocked-out *CTLA4* gene develop a lethal autoimmune and lymphoproliferative disease [14]. In humans, *CTLA4* defects are described as heterozygous loss-of-function mutations with autosomal dominant transmission [15,16]. CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration refers to a complex immune disorder with autoimmune cytopenias, hypogammaglobulinemia and lymphocytic infiltration of non-lymphoid organs [17]. CTLA-4 intracellular vesicle trafficking is regulated by LRBA [18]. Clinical presentation of LRBA deficiency involves autoimmune infiltration and enteropathy, and sometimes other autoimmune features such as diabetes and erosive polyarthritis [19]. Laboratory features include positivity of autoantibodies, regulatory T-cell (Treg) defects. LRBA deficiency and CTLA-4 haploinsufficiency can cause autoimmune cytopenias, organomegaly, recurrent upper respiratory tract infections, chronic enteropathy, low switched memory B cells and suppression of Treg function.

The objective was to describe on a clinical and genetic level a cohort of non-ALPS children presenting with ES who were investigated for genetic defect including *CTLA4* and *LRBA* defect.

2. Patients & methods

We reviewed the clinical records and genetic results of a cohort of children recruited among patients with a diagnosis of ES referred at the department of Pediatric Immunology, Hematology and Rheumatology of Necker Hospital (Paris, France) and investigated at the Laboratory of Immunogenetics of Pediatric autoimmune diseases at Imagine Institute (Paris, France) from 1996 to 2014. Inclusion criteria were: occurrence of first symptoms before the age of 18 years, ES defined as simultaneous or sequential development of AIHA and ITP, minimal follow-up of 6 months, genetic analysis performed throughout each patient's management. We excluded patients responding to one or more of the revised diagnostic criteria of ALPS: defective lymphocyte apoptosis, somatic or germline pathogenic mutation in *FAS*, *FASLG*, or *CASP10*, elevated plasma soluble FAS-ligand levels, elevated plasma interleukin-10 levels, elevated serum or plasma vitamin B12 levels [20]. This retrospective and descriptive cohort study was performed in collaboration with the French reference center for autoimmune cytopenias (CEREVANCE, Bordeaux, France).

2.1. Data collection

Data collected included demographics, clinical presentation, laboratory explorations, management and outcome. Written informed consent (parental consent for minors) was obtained from all participants. The study and protocols conform to the 1975 Declaration of Helsinki and were approved by the Comité de Protection des Personnes Ile de France II and the French advisory committee on data processing in medical research.

2.2. Genetic analysis

DNA samples were collected from patients' peripheral blood using standard extraction methods. Sequencing was done by Sanger sequencing or Next Generation Sequencing (NGS) such as panel NGS-sequencing or Whole Exome Sequencing (WES). Mutations identified by NGS-sequencing were confirmed by Sanger sequencing. NGS was performed for all patients who did not have a mutation in *ALPS* or *CTLA4*.

Exons were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from genomic DNA according to standard protocols. The PCR products were sequenced in both directions and analyzed with ApE-A plasmid Editor v2.0.45.

Illumina compatible precapture barcoded genomic DNA libraries were constructed according to the manufacturer's protocol (Ovation Ultralow, Nugen Technologies) from 1 to 3 µg of DNA. Several precapture libraries were pooled at equimolar concentrations. The capture process was performed using this pool and biotinylated probes from the SureSelect panel (Agilent). Libraries were sequenced on an Illumina HiSeq2500 (Paired-End sequencing 130 × 130 bases, High Throughput Mode). Sequence reads were aligned to the human hg19 reference genome using the Burrows-Wheeler Alignment version 0.6.2.13. The mean depth of coverage obtained for each sample was $\geq 300\times$, with $\geq 97\%$ of the panel regions covered at least at $15\times$ and $\geq 90\%$ of the panel regions covered at least at $30\times$.

Exome libraries were prepared using the 50 Mb SureSelect Human All Exon kit V3 (Agilent Technologies). Paired-end 75 + 35 reads were generated using a SOLiD5500XL (Life technologies) and mapped using LifeScope (Life Technologies). The mean depth of coverage obtained for each sample was $\geq 70\times$, with $\geq 83\%$ of the exome covered at least at $15\times$.

For all high throughput sequencing, single nucleotide polymorphisms and indel calling were performed using GATK tools. An in-house software (Polyweb) was used to filter the variants.

2.3. Statistics

Descriptive statistics included mean (standard deviation) or median (minimum-maximum) for continuous variables and frequency (percentage) for categorical variables. Statistical analyses were performed with Excel and GraphPad Prism softwares for Macintosh and p-value < 0.05 was considered as significant. Quantitative variables were compared with the non-parametric test of Mann-Whitney and qualitative variables with Fischer exact test.

3. Results

3.1. Main characteristics (Table 1)

48 patients with Evans syndrome were evaluated during an 18 year-period. After excluding 30 patients with ALPS, 18 patients were included in the study and tested for gene defects. Twelve were females. Four patients were born from consanguineous unions. There was a family history of autoimmunity in 7 cases. Mean age at first cytopenias was 4.7 (+/− 4.3) years (Table 1).

3.2. Genetic defects (Table 2)

Genetic exploration during analysis led us to identify a gene defect in 7 patients (39%), of which 5 are unreported, involving 4 PID genes. Details of the mutations and their consequences at protein level are displayed on Table 2. The 4 exons and flanking sequences of *CTLA4* were systematically studied by Sanger sequencing for the 18 included patients. Three patients carried heterozygous mutations in *CTLA4*, leading to haploinsufficiency. Sanger sequencing of candidate genes in 7 patients led us to identify one somatic mutation in *KRAS*, previously reported [21]. NGS-sequencing (panel or WES), performed in 14 patients, revealed mutations in 3 additional patients. One carried a homozygous splice-site mutation of *LRBA*, resulting in an absence of protein expression. Two patients had a *STAT3* gain-of-function mutation.

3.3. Comparative description of clinical and immunological features (Tables 3A, B and 4)

Autoimmune cytopenias occurred simultaneously in 6 cases. In other cases, ITP preceded AIHA in 10 cases (63%). The mean delay between cytopenias was 4 $\pm$ 3.8 years. A concurrent autoimmune neutropenia was observed in 10 cases (56%). Thirteen patients (72%) presented with organomegaly, from diagnosis (in 9 cases) or after (median delay 11 months). Five patients (28%) had enteropathy. Nine patients (50%) contracted lower respiratory tract infections and 3 (17%) had upper respiratory infections. When comparing patients with or without identification of a genetic defect, no significant difference was found regarding the clinical presentation (Table 3A).

The direct antiglobulin test was positive for IgG in 12 patients (67%), IgG + complement in 2 and unspecified for the remaining 4. The quantitative complement lysis-inhibition assay found IgG bound to platelets in 9 of the 10 patients assessed. Identification of antiplatelet antibodies (Ab) showed anti-GPIIb/IIIa in 3 patients (17%), anti-GPIbIX in 2 (11%) and GPIIa in 2 (11%). Six patients (33%) had elevated inflammatory markers, either C-reactive protein and/or erythrocyte sedimentation rate, 2 with a genetic diagnosis and 4 without. Eleven patients, out of the 16 tested, had autoantibodies, including antinuclear (5), antineutrophils (1), antineutrophil cytoplasmic (2), antismooth muscle (1) and antithyroperoxidase (2). Ten patients, out of the 16 tested, had abnormal Ig levels and five of them had hypogammaglobulinemia. Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was abnormal in 10 patients out of 15. Eleven patients (61%) had lymphopenia, involving NK (6), T (5) and/or B (4) cells (Table 3B and 4). Three patients had low memory B cell rate. No significant difference upon immunological

testing was found between patients with or without an identified mutation (Table 4).

Six patients underwent splenectomy. The main reason was chronic severe ITP (2), persisting AIHA (2) and both cytopenias (2). After a median follow-up of 1.2 [0.3–8.7] years after splenectomy, 2 patients showed a complete response. One patient developed a severe and lethal infection due to *Streptococcus pneumoniae* 3 years after splenectomy. All patients received at least one course of corticosteroids (2 to 4 mg/kg/day). An initial response permitted the discontinuation of treatment in 15 cases (83%). Corticosteroid-dependence occurred in 7 cases (39%). They all received intravenous Ig initiated at 2 g/kg. In total, 14 patients (78%) received at least one second-line therapy, including rituximab (11), azathioprine (8), cyclosporine (5), mycophenolic acid (3), hydroxychloroquine (2), cyclophosphamide (1), anti-D gammaglobulins (1), vinblastine (1), colchicine (1) and eltrombopag, thrombopoietin receptor agonist (1). Out of the 11 patients treated with rituximab, 8 achieved initial remission. After a median delay of 12.2 [0.5–61] months, 5 had relapsed. Among the 9 patients who developed hypogammaglobulinemia requiring regular intravenous Ig, 6 had received rituximab, but hypogammaglobulinemia pre-existed for 4 of them. The median follow-up duration was 10.8 ($\pm$ 5.5) years and significantly longer for patients with a genetic diagnosis ($p = 0.03$). At last visit, four (22%) patients were in remission off treatment, 10 (56%) in remission on treatment, whereas 2 (11%) still had an active disease while on treatment. Two children (11%) died. One, carrying a somatic *KRAS* mutation, died after developing juvenile myelomonocytic leukemia. The other, carrying a *CTLA4* mutation, died from multiple organ failure 3 years after splenectomy. No significant difference was found toward the clinical outcome or response treatments of patients with or without genetic diagnosis (Table 4).

4. Discussion

The clinical description of 18 children diagnosed with ES demonstrated heterogeneous presentation with organ-specific inflammation, autoimmunity and immunological abnormalities. A causative gene defect was found in seven of them: *CTLA4* or *LRBA* in 4 cases, activating *KRAS* or *STAT3* gain of function mutations in the others. Neither clinical nor immunological phenotype provided significant criteria to distinguish patients with and without a genetic diagnosis.

Since its first description, the immune dysregulation in Evans syndrome, supported by clinical or biological immune anomalies [1–9], led to discuss the initial definition of ES, widened to autoimmune cytopenias (anemia, thrombocytopenia and/or neutropenia). We included

Table 1
Main characteristics.

Characteristic	N (%) patients	N (%) patients with genetic diagnosis	N (%) patients without genetic diagnosis	P
Gender male	13 (72)	5 (71)	8 (73)	1
Consanguinity	4 (22)	2 (29)	2 (18)	1
Family background ^a	7 (39)	4 (57)	3 (27)	0.14
Age at first symptoms (years)	4.7 ($\pm$ 4.3)	4.6 ($\pm$ 4.4)	4.8 ($\pm$ 4.4)	0.93
Age at diagnosis (years)	6.9 ($\pm$ 4.6)	6.2 ($\pm$ 4)	7.3 ($\pm$ 5.0)	0.78
Age at last follow-up (years)	15.2 ($\pm$ 5.5)	18.7 ($\pm$ 5.4)	13.1 ($\pm$ 4.5)	0.06
Follow-up duration (years)*	10.5 ($\pm$ 5.6)	14.1 ($\pm$ 3.1)	8.2 ($\pm$ 5.8)	0.03
Sequential occurrence of cytopenias	12 (67)	5 (71)	7 (64)	1
Number of treatment lines ^{ab}	3.2 ($\pm$ 1.7)	4.3 ($\pm$ 1.5)	2.5 ($\pm$ 1.4)	0.02
Red blood cell transfusions needed*	9 (50)	0	9 (82)	<0.001
Splenectomy	6 (33)	4 (57)	2 (18)	0.14
Complications ^c	14 (78)	7 (100)	7 (64)	0.12
Death	2 (11)	2 (29)	0	0.13

Percentages are calculated on the number (N) of patients in each column, respectively total (N = 18), with (N = 7) and without genetic diagnosis (N = 11). Results of continuous variables are shown as mean $\pm$ standard deviation. Age is expressed in years. AIHA: autoimmune haemolytic anemia. ITP: immune thrombocytopenia.

* $p < 0.05$

^a Family background included autoimmune cytopenia (3), Basedow disease (1), type I diabetes (1), myeloblastic acute leukemia (1) and celiac disease (1).

^b Initial course of corticosteroids or intravenous Ig counts for the first treatment line. Each subsequent treatment counts for an additional line.

^c Complications, either disease- or treatment-related included hypogammaglobulinaemia (8), hepatic cytolysis (3), osteopenia (1), osteoporosis (1), adrenal insufficiency (2), failure to thrive (4), Cushing syndrome (3) and anxiety disorder (1).

Table 2
Genetic defects specifications.

Patient	1	2	3	4	5	6	7
Gene	LRBA (MIM#606453)	CTLA4 (MIM#123890)			STAT3 (MIM#102582)		KRAS (MIM#190070)
Variation type	Homozygous splice site substitution*	Substitution in exon 2	Large deletion of exon 2 and 3	Substitution in intron 1	Substitution in exon 23	Substitution in exon 22	Substitution
Transcript	NM:006726	NM:005214.4			NM:139276		NM:004985
Variation on CDS	c.2450 + 1C > T	c.151C > T	c.109 + 1092_568-512del	c.110-2A > G	c.2147C > T	c.2144C > T	c.37G > T
Proteic variation	p.E789fsX792	p.R51X	p.M38Kfs*22		p.T716 M	p.P715L	p.G13C
Mutation status	Novel	Novel	Novel	Novel	Described [27]	Novel	Hotspot [21,28–30]

When unspecified, the defects are heterozygous. The proteic variations correspond to the predicted consequences of the defect. *this substitution is responsible for abnormal splicing with exon 20 skipping, inducing frameshift and premature stop codon. MAF minor allele frequency; ExAC Exome Aggregation Consortium [34].

children with AIHA and ITP, according to the initial description, given this association is the most common in PID [12].

Table 3A
Clinical overview.

Patient	Gene	Age	Presentation	Organomegaly HMG/SMG/ADM	Inflammation	Autoimmunity	Infections	Other	Relapses	Specific treatment
1	LRBA	3	HMG, SMG, AI enteropathy, AIHA	+ / + / –	Interstitial gastritis	AI enteropathy	Chronic bronchitis, chronic cholecystitis, cholangitis	–	2/2	Rituximab, azathioprine, cyclosporine, MMF, purinethol
2	CTLA4	14	ITP, AIHA	– / – / –	–	Lung nodules	Recurrent bronchitis, sinusitis	–	3/13	Splenectomy, rituximab, azathioprine, cyclosporine, elthombopag, hydroxychloroquine
3 [†]	CTLA4	2	Dilated myocarditis	+ / + / +	Hepatic infiltration, arthralgias, renal nodules, cerebral vasculitis	ILD, vitiligo, bilateral uveitis, type 1 diabetes	Zona, meningitis, dilated myocarditis, pneumonia	–	1/2	Splenectomy, rituximab, azathioprine, MMF, cyclophosphamide
4	CTLA4	5	ILD, ITP	– / – / –	ILD, eczema	–	–	–	4/3	Splenectomy, rituximab
5	STAT3	3	ITP, AIHA, celiac disease	– / + / +	–	Celiac disease	–	–	3/2	G-CSF, azathioprine
6	STAT3	2	ITP	+ / + / +	Bilateral kerato-conjunctivitis	–	Recurrent bronchitis, recurrent otitis	Dysmorphia, swallowing disorder	5/2	G-CSF, rituximab, azathioprine
7 [†]	KRAS	5	AIHA, ITP	+ / + / +	Arthralgias, pericarditis	–	Pneumonia, zona	Hepatic hemangioma, sigmoid mass, severe JMML	2/2	Splenectomy, colchicine, rituximab, purinethol
8	–	0,2	AIHA, ITP	+ / + / +	–	Bronchiectasies, lung micronodules	Recurrent pneumonia	Hepatic cytolysis	2/1	Rituximab
9	–	5	AIHA, ITP, HMG, SMG, ADM	+ / + / +	–	–	Bronchitis, zona, meningitis	–	¾	Splenectomy, azathioprine, cyclosporine
10	–	5	Pneumonia	– / – / –	–	–	Pneumonia	–	3/1	Splenectomy
11	–	0.7	ITP	– / – / –	Arthralgias	Enteropathy	Purpura fulminans	–	2/1	Rituximab, azathioprine, cyclosporine, MMF
12	–	6	AIHA, ITP	– / + / –	Arthralgias	–	Recurrent bronchitis, recurrent furunculosis, zona	–	1/7	Rituximab
13	–	13	ITP	– / – / +	–	Urticaria	–	–	2/5	0
14	–	3	SMG	+ / + / –	–	–	Zona	–	1/5	Anti-D gammaglobulins, rituximab
15	–	13	ITP	– / + / +	–	–	–	–	3/5	0
16	–	2	ITP	+ / + / +	–	–	–	–	3/15	Thrombopoietin receptor agonist, rituximab, hydroxychloroquine
17	–	3	ITP	– / + / –	–	–	–	–	3/5	Vinblastine, azathioprine, cyclosporine
18	–	3	AIHA, ITP	– / – / –	–	–	–	–	1/2	0

[†]Deceased. Patient 3 died from meningitis due to Streptococcus pneumonia and Patient 7 from a severe juvenile myelomonocytic leukemia. HMG: hepatomegaly. SMG: splenomegaly. ADM: adenomegaly. +: presence. –: absence. AI: autoimmune. ILD: interstitial lung disease. JMML: juvenile myelo-monocytic leukemia. A relapse of ITP or AIHA was defined by the recurrence of ITP and/or AIHA after partial or complete remission. 1st value in relapses are AIHA, 2d value are ITP. Specific treatment correspond to therapeutics in addition to corticosteroids or intravenous Ig. MMF: mycophenolic acid.

Table 3B

Laboratory overview.

Patient	Gene	Inflammatory syndrome	Ig abnormalities	Lymphocyte phenotyping	IL-10	sFAS-L	DNT	Auto Ab
1	LRBA	0	hypogA and M	T CD8 lymphocytosis	30	0.67	<2%	PNN, plt, ANCA, SM
2	CTLA4	0	hypogG	–	<20	<0.2	3%	–
3	CTLA4	1	hypoA and M	T, B, NK lymphopenia, memory B cell lymphopenia	<20	<0.2	6.7%	AN
4	CTLA4	0	hypogG, A and M	B lymphopenia	<20	<0.2	5%	–
5	STAT3	1		NK lymphopenia, CD8 T lymphocytosis, memory B cell lymphopenia	<20	<0.2	8%	PNN, plt
6	STAT3	0		T and NK lymphopenia	<20	0.4	4%	PNN
7	KRAS	0		B and NK lymphopenia	<20	<0.2	<2%	ANCA, plt
8	–	0	hypogA and M	T and NK lymphopenia, DNT cells	<20	<0.2	<2%	PNN
9	–	0	hypoG, hyperM, hypo A	–	<20	0.3	–	PNN
10	–	0	hypogA and M	Memory B cell lymphopenia, DNT cells	<20	<0.2	<2%	–
11	–	0	–	–	<20	<0.2	<2%	SM
12	–	1	hypogG, A and M	–	<20	<0.2	3	–
13	–	1	hypogG, A and M	T, B and NK lymphopenia, DNT cells	<20	<0.2	3	–
14	–	1	–	–	<20	0.28	1	Plt, TPO
15	–	0	–	–	<20	<0.2	–	–
16	–	0	–	T lymphopenia, memory B cell lymphopenia, DNT cells	–	–	3	Plt, AN
17	–	1	hyper IgG, hyper IgA	–	<20	<0.2	<2%	AN, ANCA, TPO
18	–	0	–	–	–	–	–	–

DNT: presence of double negative T cells. AutoAb: autoantibodies. PNN: antipolynuclear neutrophils antibodies. Plt: antiplatelet antibodies. ANCA: antineutrophil cytoplasmic antibodies. SM: antismooth muscle antibodies. AN: antinuclear antibodies. TPO: antithyroperoxidase antibodies. IL-10: interleukin 10 level. sFAS-L: soluble Fas-ligand level.

Systematic exploration of *LRBA* and *CTLA-4* brought to light 4 unreported mutations, in these recent immune checkpoint deficiencies in which only 60 and 30 patients have respectively been described so far [15,16,22–26]. The 3 mutations in 2 other genes are also known as responsible for monogenic PID. The substitution in exon 23 of *STAT3* has been reported several times as responsible for an early-onset multi-organ autoimmune disease [27]. The other is novel and its functional assessment is on-going. The *KRAS* mutation affects one of the 3 hotspots for activating mutations. This mutation is frequently described with Ras-associated autoimmune leukoproliferative disorder phenotype [28–30]. In a recent paper of Calvo et al., 2 of the 3 patients with this mutation presented pericarditis, which was also the case for this patient [30].

Seven pediatric ES series have been reported over the last 35 years with a follow-up ranging from 3 to 8 years [4–9]. Most of the patients in our cohort developed dysimmune disorders, in line with previously published data. Autoimmune neutropenia (56% vs 14% to 74%), autoantibodies and organ-specific autoimmunity (67% vs 55.6% and 82%) were in range with previous series' data. However, organomegaly (72% vs 36% to 69%), antinuclear Ab (28% vs 18% and 25%) and chronic infections (61% vs 11.5% to 54.5%) were more frequent in this cohort. Overall specific autoantibodies, found in half of this cohort, were not assessed in previous series. Severity of cytopenia was not correlated to gene defects in our cohort. Indeed, blood transfusion is the most significant difference found between the groups, more frequent in patients without genetic mutation revealed. First-line therapies as corticosteroids and

intravenous Ig are barely sufficient to achieve complete remission, as 14 out of 18 patients needed a second-line treatment. Splenectomy had poor outcome. Secondary hypogammaglobulinemia after rituximab occurred in 2 cases out of 11, which was described in patients with an underlying PID [2]. B lymphocyte depletion after rituximab have been reported and could lead to hypogammaglobulinemia [2]. Mortality rate was high, and our findings are in line with previous reports (11% vs 8% to 35%). However, there is hope to improve patients care thanks to hematopoietic stem cell transplantation [31] and, in some cases, the use of targeted biologic therapies, as recently shown for abatacept in *CTLA4* and *LRBA* deficiencies [18,19,32,33].

Our study had some limitations. It was retrospective and patients' recruitment was biased toward a relatively small number of patients referred to a pediatric reference center for immune deficiencies.

5. Conclusion

Genetic testing of children with ES led us to identify a causative PID gene defect in almost half of our cohort, involving *CTLA4*, *LRBA*, *STAT3* gain-of-function and *KRAS* mutations. Therefore, it should prompt clinicians to perform extensive genetic screening for mutations, starting with the growing pool of genes involved in PID with autoimmunity. This could have direct consequences on patients' management, given the on-going effort for development of targeted therapies, as new monogenic disorders and their pathophysiological mechanisms are unraveled.

Table 4

Immunological characteristics.

Explorations	N patients +/-explored	N patients with genetic diagnosis	N patients without genetic diagnosis
Direct antiglobulin test	18/18	7/7	11/11
Dickson test	5/11	3/5	2/6
Inflammatory syndrome	6/18	2/7	4/11
Abnormalities in serum Ig	10/16	4/7	6/9
Abnormalities in lymphocyte phenotype	10/15	6/7	4/8
Decrease in complement C4	2/9	2/5	0/4
Maturation block of the granular lineage	3/15	1/7	2/8
Auto-antibodies	7/16	3/6	4/10
– Antinuclear antibodies	4/14	2/5	2/9
– Antineutrophil antibodies	5/10	3/5	2/5
– Antineutrophil cytoplasmic antibodies	3/8	2/5	1/3
– Antiplatelet antibodies	5/11	3/5	2/6
– Antismooth muscle antibodies	2/6	1/3	1/3
– Antithyroperoxidase antibodies	2/7	0/3	2/4

Contributors' statement page

Ms. Besnard and Dr. Levy designed the research, acquired the data, analyzed data, and wrote the manuscript. These authors contributed equally to this work.

Dr. Rieux-Laucat designed the research and wrote the manuscript. Pr Quartier participated in clinical care, designed the research and wrote the manuscript. These authors contributed equally to this work.

Mrs. Stolzenberg, Mrs. Magerus-Chatinet, Mr. Alibeu and Mr. Nitschké acquired the data and critically revised the manuscript.

Dr. Aladjidi, Dr. Jeziorski, Pr Landman-Parker, Pr Leverger, Dr. Pellier, Dr. Thuret, Pr Michel, Dr. Suarez, Pr Hermine, Dr. Mahlaoui, Pr Blanche, Pr Picard, Pr de Saint-Basile, Pr Fischer, Dr. Neven participated in clinical care and critically revised the manuscript.

All authors approved the final manuscript as submitted and agree to be accountable for all aspects of the work.

Funding source

This work was funded by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Fondation Maladies Rares, the European Research Council (ERC PIDIMMUN no. 249816 to A. Fischer), and Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE14-0026-01 "Lumugene" to F. Rieux-Laucat). This program has received a state subsidy managed by the National Research Agency under the "Investments for the Future" program bearing the reference ANR-10-IAHU-01 and IDEX Sorbonne Paris Cité (SPC/JFG/2013 - 031 to F. Rieux-Laucat). E. Lévy was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Association pour la Recherche sur le Cancer (France) and Imagine Institute. C. Besnard was supported by Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (France).

Financial disclosure

The authors have indicated they have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank the patients and family members for their cooperation in this study. We thank the CEDI team for technical assistance and Dr. B. Bader-Meunier for her clinical insight. We are deeply indebted to the CRM CERIVANCE for its supporting involvement in ES studies.

References

- [1] R.S. Evans, K. Takahashi, R.T. Duane, R. Payne, C. Liu, Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia; evidence for a common etiology, *AMA Arch Intern Med.* 87 (1) (1951) 48–65.
- [2] B. Bader-Meunier, N. Aladjidi, F. Bellmann, et al., Rituximab therapy for childhood Evans syndrome, *Haematologica* 92 (12) (2007) 1691–1694, <https://doi.org/10.3324/haematol.11540>.
- [3] M. Michel, V. Chanet, A. Dechartres, et al., The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases, *Blood* 114 (15) (2009) 3167–3172, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215368>.
- [4] C.H. Pui, J. Wilimas, W. Wang, Evans syndrome in childhood, *J. Pediatr.* 97 (5) (1980) 754–758.
- [5] W. Wang, H. Herrod, C.H. Pui, G. Presbury, J. Wilimas, Immunoregulatory abnormalities in Evans syndrome, *Am. J. Hematol.* 15 (4) (1983) 381–390.
- [6] N. Aladjidi, H. Fernandes, T. Leblanc, et al., Evans syndrome in children: long-term outcome in a prospective French national observational cohort, *Front Pediatr.* 3 (2015) 79, <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00079>.
- [7] S. Savaşan, I. Warrier, Y. Ravindranath, The spectrum of Evans' syndrome, *Arch. Dis. Child.* 77 (3) (1997) 245–248.
- [8] P. Blouin, A. Auvrignon, A. Pagnier, et al., Evans' syndrome: a retrospective study from the ship (French Society of Pediatric Hematology and Immunology) (36 cases), *Arch. Pediatr.* 12 (11) (2005) 1600–1607, <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2005.08.002>.
- [9] I. Ghaithi Al, N.A.M. Wright, V.R. Breakley, et al., Combined autoimmune cytopenias presenting in childhood, *Pediatr. Blood Cancer* 63 (2) (2016) 292–298, <https://doi.org/10.1002/pbc.25769>.
- [10] D.T. Teachey, C.S. Manno, K.M. Axsom, et al., Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS), *Blood* 105 (6) (2005) 2443–2448, <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3542>.
- [11] A.E. Seif, C.S. Manno, C. Sheen, S.A. Grupp, D.T. Teachey, Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study, *Blood* 115 (11) (2010) 2142–2145, <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-239525>.
- [12] A. Fischer, J. Provot, J.-P. Jais, A. Alcaïs, N. Mahlaoui, Members of the CEREDIH French PID Study Group, Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies, *J. Allergy Clin. Immunol.* (February 2017) <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.12.978>.
- [13] L.S.K. Walker, D.M. Sansom, The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (12) (2011) 852–863, <https://doi.org/10.1038/nri3108>.
- [14] P. Waterhouse, J.M. Penninger, E. Timms, et al., Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4, *Science* 270 (5238) (1995) 985–988.
- [15] H.S. Kuehn, W. Ouyang, B. Lo, et al., Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4, *Science* 345 (6204) (2014) 1623–1627, <https://doi.org/10.1126/science.1255904>.
- [16] D. Schubert, C. Bode, R. Kenefick, et al., Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations, *Nat. Med.* 20 (12) (2014) 1410–1416, <https://doi.org/10.1038/nm.3746>.
- [17] B. Lo, J.M. Fritz, H.C. Su, G. Uzel, M.B. Jordan, M.J. Lenardo, CHAI and LATAIE: new genetic diseases of CTLA-4 checkpoint insufficiency, *Blood* 128 (8) (2016) 1037–1042, <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-712612>.
- [18] B. Lo, K. Zhang, W. Lu, et al., Autoimmune disease. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy, *Science* 349 (6246) (2015) 436–440, <https://doi.org/10.1126/science.aaa1663>.
- [19] E. Lévy, M.-C. Stolzenberg, J. Bruneau, et al., LRBA deficiency with autoimmunity and early onset chronic erosive polyarthritis, *Clin. Immunol.* 168 (2016) 88–93, <https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.03.006>.
- [20] J.B. Oliveira, J.J. Bleesing, U. Dianzani, et al., Revised Diagnostic Criteria and Classification for the Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS): Report from the 2009 NIH International Workshop, Vol 116, 2010 e35–e40, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-280347>.
- [21] N. Lanzarotti, J. Bruneau, A. Trinquand, et al., RAS-associated lymphoproliferative disease evolves into severe juvenile myelo-monocytic leukemia, *Blood* 123 (12) (2014) 1960–1963, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-548958>.
- [22] O.K. Alkhairy, H. Abolhassani, N. Rezaei, et al., Spectrum of phenotypes associated with mutations in LRBA, *J. Clin. Immunol.* (December 2015) <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0224-7>.
- [23] A. Alangari, A. Alsultan, N. Adly, et al., LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (2) (2012) 481, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.05.043>.
- [24] S.O. Burns, H.L. Zenner, V. Plagnol, et al., LRBA gene deletion in a patient presenting with autoimmunity without hypogammaglobulinemia, *J. Allergy Clin. Immunol.* 130 (6) (2012) 1428–1432, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.07.035>.
- [25] G. Lopez-Herrera, G. Tampella, Q. Pan-Hammarström, et al., Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity, *Am. J. Hum. Genet.* 90 (6) (2012) 986–1001, <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.015>.
- [26] S. Zeissig, B.-S. Petersen, M. Tomczak, et al., Early-onset Crohn's disease and autoimmunity associated with a variant in CTLA-4, *Gut* 64 (12) (2015) 1889–1897, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308541>.
- [27] S.E. Flanagan, E. Haapaniemi, M.A. Russell, et al., Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease, *Nat. Genet.* 46 (8) (2014) 812–814, <https://doi.org/10.1038/ng.3040>.
- [28] J.E. Niemela, L. Lu, T.A. Fleisher, et al., Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis, *Blood* 117 (10) (2011) 2883–2886, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-07-295501>.
- [29] M. Takagi, K. Shinoda, J. Piao, et al., Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation, *Blood* 117 (10) (2011) 2887–2890, <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-301515>.
- [30] K.R. Calvo, S. Price, R.C. Braylan, et al., JMML and RALD (Ras-associated autoimmune leukoproliferative disorder): common genetic etiology yet clinically distinct entities, *Blood* 125 (18) (2015) 2753–2758, <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-567917>.
- [31] S.Z. Rousoo, O. Shamriz, A. Zilkha, et al., Hematopoietic stem cell transplantations for primary immune deficiencies: 3 decades of experience from a tertiary medical center, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 37 (5) (2015) e295–e300, <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000352>.
- [32] S. Lee, J.S. Moon, C.-R. Lee, et al., Abatacept alleviates severe autoimmune symptoms in a patient carrying a de novo variant in CTLA-4, *J. Allergy Clin. Immunol.* 137 (1) (2016) 327–330, <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.036>.
- [33] P. Vignesh, A. Rawat, S. Singh, An update on the use of Immunomodulators in primary Immunodeficiencies, *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 52 (2) (2017) 287–303, <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8591-2>.
- [34] Exome Aggregation Consortium (ExAC), <http://exac.broadinstitute.org> (Accessed February 5, 2017).

LISTE DES PUBLICATIONS ANTERIEURES

BESNARD C, Schmitt C, Galmiche-Rolland L, Debray D, Fabre M, Molina T, Gouya L, Ged C, Castelle M, Cavazana M, Magrin E, Neven B, Moshous D, Blanche S, Frémond ML. Bone marrow transplantation in congenital erythropoietic porphyria: Sustained efficacy but unexpected liver dysfunction. *Biol Blood Marrow Transplant* 2020 Apr;26(4):704-711.

BESNARD C, Gitiaux C, Girard M, Galmiche-Rolland L, Talbotec C, Quartier P, Bodemer C, Berteloot L, Bader-Meunier B. Severe abdominal manifestations in juvenile dermatomyositis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2020 Feb;70(2):247-251.

BESNARD C, Lévy E, Aladjidi N, Stolzenberg MC, Alibeu O, Nitschké P, Blanche S, Hermine O, Jeziorski E, Landman-Parker J, Leverger G, Mahlaoui N, Michel G, Pellier I, Suarez F, Thuret I, de Saint-Basile G, Picard C, Fischer A, Neven B, Rieux-Laucat F and Quartier P. Pediatric-onset Evans syndrome: heterogeneous presentation and high frequency of monogenic disorders including LRBA and CTLA4 mutations. *Clin Immunol* 2018 Mar;188:52-57.