

Université de Montréal

**Facteurs de risque pour les maladies inflammatoires de l'intestin :
Caractérisation de l'impact de variants rares d'*IFIH1* sur la réponse
épithéliale antivirale**

Par
Laurie Pruneau

Sciences Biomédicales, Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences Biomédicales, option médecine expérimentale

Août 2020

© Laurie Pruneau, 2020

Ce mémoire intitulé

**Facteurs de risque pour les maladies inflammatoires de l'intestin :
Caractérisation de l'impact de variants rares d'*IFIH1* sur la réponse
épithéliale antivirale**

Présenté par

Laurie Pruneau

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Marc Servant

Président-rapporteur

Dr. John D. Rioux

Directeur de recherche

Dre. Emilia Liana Falcone

Membre du jury

Résumé

Les maladies inflammatoires de l'intestin (MII), incluant la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse, sont des maladies chroniques qui résultent d'un dérèglement de la réponse immunitaire aux microorganismes de la lumière intestinale. Des études de séquençages réalisées par le laboratoire du Dr. Rioux, avec ses collègues du International IBD Genetics Consortium ont identifié quatre variants rares, indépendants et causals pour les MII, dans le gène *IFIH1*. La protéine d'*IFIH1* (MDA5) interagit avec certains virus à ARN, afin de déclencher une réponse antivirale de l'immunité innée. Nous avons émis l'hypothèse que ces variants dans *IFIH1* diminuaient la réponse antivirale de l'épithélium intestinal, suite à une infection. Nous avons d'abord travaillé avec des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) obtenues à partir d'individus atteints de MII et qui sont homozygotes ou hétérozygotes composés pour ces variants, ainsi qu'à partir d'individus contrôles (*IFIH1* wt). Ces LCLs ont été reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites humaines, avant d'être différenciées en cultures épithéliales intestinales. Nos résultats ont d'abord confirmé l'impact des variants sur la structure génique et protéique (*IFIH1*/MDA5), dans ces modèles cellulaires. Puis, la réponse antivirale a été induite, grâce à la stimulation avec des agents (moléculaire et viral) connus pour stimuler la protéine MDA5. Nous avons démontré que ces variants dans *IFIH1* induisaient effectivement une moins grande réponse antivirale, caractérisée par une plus faible expression d'IFNs, comparativement aux contrôles. Finalement, la modulation des IFNs constituerait une avenue potentiellement intéressante pour le traitement des patients atteints des MII et porteurs des variants causals.

Mots clés : Maladies inflammatoires de l'intestin, *IFIH1*/MDA5, réponse antivirale, immunité innée, génétique, organoïdes intestinaux

Abstract

Inflammatory Bowel Disease (IBD), including Crohn's disease and ulcerative colitis, are chronic inflammatory diseases of the gastro-intestinal tract. IBD is associated with a disturbance of the immune response to the microorganisms of the intestinal lumen. Sequencing studies conducted by the laboratory of Dr. John Rioux, in collaboration with his colleagues of the International IBD Genetics Consortium, identified four rare and independent variants in *IFIH1*, associated to IBD. The protein of *IFIH1* (MDA5) interacts with certain RNA viruses to trigger the innate mechanism of antiviral defense. Our hypothesis was that these *IFIH1* variants decreased the intestinal epithelial antiviral response, following an infection. We first worked with lymphoblastoid cell lines (LCLs) obtained from IBD patients who are homozygotes or compound heterozygotes for the different variants, as well as from control individuals (*IFIH1* wt). These LCLs were reprogrammed into human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs), before being differentiated into intestinal epithelial cultures. Our results first confirmed the impact the variants on the genetic and protein structure for these models. Then, the antiviral response was triggered by the stimulation of LCLs and intestinal epithelial cells, with agents (molecular and viral) known to stimulate MDA5. We have demonstrated that these *IFIH1* variants did indeed induce a lower antiviral response, characterized by lower IFNs expression, compared to control cell lines. Finally, modulation of IFNs could be an interesting avenue for the treatment of IBD patients with the causal variants.

Keywords : Inflammatory bowel diseases, IFIH1/MDA5, antiviral response, innate immunity, genetic, intestinal organoids

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	10
Liste des figures	11
Liste des tableaux supplémentaires.....	12
Liste des figures supplémentaires	13
Liste des sigles et abréviations.....	14
Remerciements.....	18
Chapitre 1 - Introduction.....	19
1.1 Le système digestif	19
1.1.1 Structure du tube digestif.....	19
1.1.2 Composition de la paroi intestinale.....	19
1.1.2.1 Les cellules épithéliales intestinales	20
1.1.2.2 La polarité	21
1.1.2.3 Les jonctions cellulaires.....	21
1.1.2.4 Les entérocytes.....	22
1.1.2.5 Les cellules caliciformes.....	23
1.1.2.6 Les cellules entéro-endocrines.....	24
1.1.2.7 Les cellules de Paneth.....	25
1.1.2.8 Les cellules tuft.....	25
1.1.2.9 Les cellules <i>Microfold</i> « M ».....	26
1.1.2.10 Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT).....	26

1.2 Le microbiote intestinal	26
1.2.1 Développement du microbiote.....	27
1.2.2 Modulation de la composition du microbiote	27
1.2.3 Débalancement du microbiote	28
1.2.4 Le virome intestinal	28
1.3 Protection/défense de l'intestin.....	30
1.3.1 Mécanismes de défense non immunologiques.....	30
1.3.1.1 Muqueuse.....	30
1.3.1.2 Mucus.....	30
1.3.1.3 Péristaltisme.....	30
1.3.1.4 Neurones sensoriels	31
1.3.1.5 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote	31
1.3.1.6 Gradient de la tension d'oxygène dans l'intestin.....	32
1.3.1.7 Stress du réticulum endoplasmique	32
1.3.2 Mécanismes de défense immunologiques.....	33
1.3.2.1 La réponse immunitaire innée.....	33
1.3.2.2 La réponse immunitaire adaptative	34
1.3.2.2.1 Lymphocytes T	34
1.3.2.2.2 Lymphocytes B.....	35
1.3.2.2.3 Les cellules Natural Killers.....	36
1.3.3 Système immunitaire inné des cellules épithéliales intestinales.....	36
1.3.3.1 Reconnaissance virale et induction des IFNs.....	37
1.3.3.1.1 RLRs : MDA5 et RIG-I	38
1.3.3.1.2 RLR : LGP2	39
1.3.3.1.3 TLR3	40

1.3.3.1.4 NLRs	40
1.3.3.2 Mécanismes induits par les IFNs	41
1.3.3.3 Les gènes stimulés par les IFNs.....	42
1.3.3.4 Effet de la polarité cellulaire sur les réponses aux IFNs.....	43
1.4 Réponse des cellules épithéliales intestinales aux virus entériques.....	43
1.5 Maintien de l'homéostasie via les interactions intestinales	45
1.6 Les maladies inflammatoires de l'intestin	46
1.6.1 Qualité de vie et impacts économiques.....	46
1.6.2 Présentations cliniques.....	47
1.6.3 Traitements	48
1.6.4 Étiologie.....	49
1.6.4.1 Facteurs environnementaux	50
1.6.4.1.1 Études d'association pangénomique (GWAS).....	51
1.6.4.1.2 Découverte de variants dans le gène IFIH1	52
1.6.4.1.3 Structure de la protéine MDA5.....	53
1.6.4.1.4 Impacts des variants dans IFIH1 sur la structure du transcrit et de la protéine	53
1.6.4.1.5 Variants dans IFIH1 en conditions expérimentales	54
1.7 Association microbiote-MII.....	56
1.7.1 Déséquilibre des bactériophages.....	56
1.7.2 Virus à ARN	59
1.8 Modèles cellulaires dérivés de cellules de patients.....	60
1.8.1 Les cellules lymphoblastoïdes	61
1.8.2 Les cellules souches pluripotentes induites humaines	61
1.8.3 Les sphéroïdes/organoïdes intestinaux	62

1.8.3.1 Les sphéroïdes/organoïdes intestinaux pour l'étude des MII	63
Chapitre 2 - Hypothèses et objectifs	64
Chapitre 3 - Matériel et méthodes.....	65
3.1 Lignées cellulaires et milieux de culture	65
3.1.1 L929 et Caco-2.....	65
3.1.2 LCLs	65
3.1.3 Reprogrammation des LCLs en hiPSCs	66
3.1.4 Différenciation des hiPSCs en endoderme définitif.....	67
3.1.5 Différenciation de l'endoderme définitif en sphéroïdes/organoïdes intestinaux	68
3.1.5.1 Dissociation des sphéroïdes et culture en monocouche.....	69
3.2 Mesure de la résistance électrique transépithéliale.....	70
3.3 Production et titrage d'EMCV	70
3.4 Infection avec l'EMCV.....	71
3.5 Nucléofection / Transfection avec le poly (I:C)	72
3.6 Extraction et dosage d'ARN.....	73
3.7 Transcription inverse	73
3.8 PCR quantitative (qPCR).....	74
3.9 PCR et migration de l'ADN sur gel d'agarose	75
3.10 Extraction et dosage de protéines	76
3.11 Immunobuvardage de type Western et révélation	76
Chapitre 4 - Résultats.....	78
4.1 Expression génique et protéique des différents allèles d' <i>IFIH1</i> dans les LCLs.....	78
4.2 Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs dans les LCLs	79
4.3 Induction de la réponse antivirale avec le poly (I:C) dans les LCLs	80
4.4 Production d'EMCV et titrage	82

4.5 Efficacité d'infection dans les LCLs et les CEIs dérivées d'hiPSCs.....	84
4.6 Expression génique et protéique des différents allèles d' <i>IFIH1</i> dans les sphéroïdes dérivés d'hiPSCs.....	86
4.7 Composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs.....	87
4.8 Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs dans les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs	91
4.9 Induction de la réponse antivirale avec le poly (I:C) dans les CEIs dérivées d'hiPSCs.....	94
4.10 Induction de la réponse antivirale avec l'EMCV dans les CEIs dérivées d'hiPSCs	96
Chapitre 5 - Discussion.....	99
Chapitre 6 - Conclusion	113
Bibliographie.....	114
Annexes.....	139

Liste des tableaux

Tableau 1. Génotype IFIH1 des différentes lignées de LCLs provenant de la biobanque NIDDK.....	66
Tableau 2. Liste des amorces de qPCR.....	74
Tableau 3. Liste des amorces de PCR.....	76

Liste des figures

Figure 1.	Distribution des jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal.....	22
Figure 2.	Signalisation des IFNs de type I et III.	42
Figure 3.	Impact des variants dans <i>IFIH1</i> sur la structure de la protéine.	54
Figure 4.	Les différentes étapes de différenciation pour obtenir des organoïdes intestinaux humains, à partir d'hiPSCs.	69
Figure 5.	Impact des variants rares d' <i>IFIH1</i> sur la structure du transcrit (<i>IFIH1</i>) et de la protéine (MDA5) dans les LCLs d'individus homozygotes ou hétérozygotes composés.	79
Figure 6.	Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, dans les LCLs porteurs de variants rares d' <i>IFIH1</i>	80
Figure 7.	Effet du poly (I:C) sur l'expression génique d' <i>IFN-β</i> dans les LCLs porteurs de variants rares d' <i>IFIH1</i>	81
Figure 8.	Titrage de la production d'EMCV par la méthode DICT50.	83
Figure 9.	Évaluation de la capacité d'infection de la nouvelle production d'EMCV, comparativement à l'EMCV de la compagnie ATCC.	83
Figure 10.	Infection avec l'EMCV (MOI de 1) de LCLs ou de CEIs (<i>IFIH1</i> wt).	85
Figure 11.	Validation de la structure génique et protéique d' <i>IFIH1</i> /MDA5 pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs.	87
Figure 12.	Profil d'expression de gènes témoignant de la composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 2D).	89
Figure 13.	Profil d'expression de gènes témoignant de la composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 3D).	90
Figure 14.	Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 2D).	92
Figure 15.	Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 3D).	93
Figure 16.	Évaluation de la réponse au poly (I:C) au cours du temps, des CEIs dérivées d'hiPSCs.	95
Figure 17.	Évaluation de la réponse au poly (I:C) pour les CEIs dérivées d'hiPSCs avec les génotypes wt K17945 et Sp2/E627X.	96
Figure 18.	Évaluation de la réponse à l'EMCV pour les CEIs dérivées d'hiPSCs.	98

Liste des tableaux supplémentaires

Tableau supplémentaire 1. Caractéristiques phénotypiques des individus à l'origine des LCLs.....	139
Tableau supplémentaire 2. Amorces pour vérifier l'intégration des plasmides par PCR.	140
Tableau supplémentaire 3. Amorces pour séquençage.	141
Tableau supplémentaire 4. Amorces pour qPCR (marqueurs de pluripotence).....	142

Liste des figures supplémentaires

Figure supplémentaire 1. Validation de la pluripotence des hiPSCs.	143
Figure supplémentaire 2. Validation de l'absence d'intégration des plasmides dans les hiPSCs.	144
Figure supplémentaire 3. Caryotypage des hiPSCs.	144
Figure supplémentaire 4. Séquençage des différentes lignées d'hiPSCs avec les variants dans IFIH1 et d'un contrôle wt.	146
Figure supplémentaire 5. Gain des marqueurs de pluripotence dans les hiPSCs.	147
Figure supplémentaire 6. Validation de la capacité des hiPSCs à former les 3 feuillets embryonnaires.	147
Figure supplémentaire 7. Validation de la perte des marqueurs de pluripotence et du gain des marqueurs d'endoderme dans l'endoderme dérivé d'hiPSCs.....	148

Liste des sigles et abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ACE2 : enzyme de conversion de l'angiotensine 2
AGCC : acide gras à chaînes courte
ALPI : Alkaline Phosphatase Intestinal
ARN : acide ribonucléique
BCR : B-cell receptor
BMDMs : macrophages dérivés de moelle osseuse
CARDs : domaine de recrutement des caspases
CDX2 : Caudal-Type Homeobox Protein 2
CEIs : cellules épithéliales intestinales
CERFNT : Comité d'éthique de la recherche et du développement des nouvelles technologies
CHGA : chromagranine A
CSEs : cellules souches embryonnaires
CU : colite ulcéreuse
CVID : immunodéficience variable commune
CXCL2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4
Db : double brin
DSS : Dextran Sulfate de Sodium
EAF : épithélium associé aux follicules
EBV : virus Epstein-Barr
EGF : facteur de croissance épidermique
EMCV : virus encéphalomyocarditis
EMEM : Eagle's Minimum Essential Medium
FBS : sérum de veau fœtal
FFAs : free fatty acids receptors
FGF4 : facteur de croissance des fibroblastes 4
GLP-1 : glucagon-like peptide 1
GP2 : glycoprotéine 2
GWAS : genome-wide association studies
Hel2i : domaine helicase-insert 2

HIF : facteur inductible par l'hypoxie
hiPSCs : cellules souches pluripotentes induites humaines
HOCCM : milieu de culture organoïde humain
HPRT : hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IBDGC : IBD Genetics Consortium
IFIH1 : Interferon Induced With Helicase C Domain 1
IFITM1: Interferon Induced Transmembrane Protein 1
IFI6 : protéine 6 inductible par l'interféron α
IFN : interféron
IFNAR : récepteur de l'IFN α/β
IFNLR1 : récepteur de l'IFN lambda 1
Ig : immunoglobulines
IGM : milieu de croissance intestinal
IL : interleukine
IL10RB : sous-unité β du récepteur interleukine 10
IKK ϵ : inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IWP-2 : inhibiteur de la production de WNT-2
IRF : facteurs de régulation de la transcription
ISGs : gènes stimulés par les interférons
ISGF3 : ISG Factor 3
ISRE : interferon-stimulated response element
JAK2 : janus kinase 2
kDa : kilodalton
KLF4 : Kruppel-like factor 4
KO : knock-out
LCLs : lignées cellulaires lymphoblastoïdes
LGP2 : laboratory of genetics and physiology 2
LIN28 : Lin-28 homolog A
L-MYC : L-Myc Proto-Oncogene Protein
LRR : domaine de répétition riche en leucine
LYZ : lysozyme
MAF : fréquence allélique mineure
MAVS : protéine de signalisation antivirale mitochondriale
MALT : tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale

MAMs : membranes associées aux mitochondries
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MC : maladie de Crohn
MDA5 : melanoma differentiation-associated gene 5
MEFs : fibroblastes embryonnaires de souris
MERS-COV : coronavirus du syndrome respiratoire du Moyent-Orient
MII : maladies inflammatoires de l'intestin
MOI : multiplicité d'infection
MUC2 : mucine 2
MRV : mammalian reovirus
MYD88 : réponse primaire de différenciation myéloïde 88
NF-κB : facteur nucléaire-κB
NIDDK : National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
NLRs : Nod-like Receptors
NLRP : Nod-like receptor family pyrin domain containing
NMD : dégradation des ARNm non-sens
NOD2 : nucleotide binding oligomerization domain containing
NSP8 : nonstructural protein 8
OCT 3/4 : octamer-binding transcription factor 3/4
OD : rapport de cotes
PACT : Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A
PAMPs : motifs moléculaires associés aux agents pathogènes
PBRM1 : chromatin remodeler polybromo-1
Poly (I:C) : acide polyriboinosinique : polyribocytidylique
POU5F1 : POU Class 5 Homeobox 1
PrPC : protéine prion cellulaire
PRRs : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires
PYY : peptide YY
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
REGIII : C-type lectin regenerating islet-derived protein IIIγ
RIG-I : retinoic acid inducible gene I
RIPA : tampon d'analyse de radioimmunoprécipitation
RNS : espèces réactives de l'azote
ROS : espèces réactives de l'oxygène dérivées des mitochondries

SARS-CoV-2 : coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère

Sb : simple brin

SEM : erreur standard de la moyenne

SI : sucrase isomaltase

SNP : single-nucleotide polymorphism

SOX2 : SRY-related HMG-box gene 2

Sp1 : splice 1, IFIH1*IVS8+1

Sp2 : splice 2, IFIH1*IVS14+1

TAE : Tris-Acétate EDTA

TBK1 : TANK-binding kinase 1

TBS(T) : Tris-Buffered Saline (Tween)

Tc : lymphocyte T cytotoxique

TCR : T-cell receptor

TEER : résistance électrique trans-épithéliale

Th : lymphocytes T auxiliaires

TLR : Toll-like receptors

TMPRSS2 : protéine transmembranaire à serine 2

TNF : tumor necrosis factor alpha

Treg : cellules T régulatrices

TRIF : TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β

TRIM65 : Tripartite motif containing 65

TYK2 : tyrosine kinase 2

UPR : réponse liée aux protéine mal repliées

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VIL : villine

VIM : vimentine

VSV : virus de la stomatite vésiculaire

Wt : wild type

ZO : zonula occludens

5-ASA : Aminosalicylates

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Dr. John Rioux de m'avoir accueillie dès un premier stage en cours de baccalauréat. Ce fut un honneur d'apprendre à vos côtés.

Merci à Dr. Guy Lemay de m'avoir accordé votre précieux temps pour m'enseigner à produire et à titrer les virus. Merci pour les discussions, vos conseils, ainsi que pour votre grande générosité.

Merci à Philippe de m'avoir guidée au cours de cette maîtrise, ainsi que pour ta grande disponibilité pour répondre à mes questions.

Merci à Jean de m'avoir accompagnée dans ce projet. Je suis chanceuse d'avoir pu bénéficier de ton expérience.

Merci à Marie-Ève pour ton soutien et tes conseils lors de l'écriture de ce mémoire.

Merci à Claudine, Gabrielle, Jessy, Isabelle, Sylvain, Saraï, Roselle, Mohamad, Geneviève, Hugues, Chloé, Frédéric, Virginie et Julie pour tous vos précieux conseils. Ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Finalement, merci à ma famille, Hélène, Pierre, Maude et Grand-Maman, et merci à Clément, pour votre amour, vos encouragements et votre grand soutien.

Chapitre 1 - Introduction

1.1 Le système digestif

Le système digestif a pour principaux objectifs le transit des aliments et la transformation de ceux-ci en éléments assimilables par l'organisme. Il comprend le tube digestif, les glandes annexes et le péritoine. Les glandes annexes, incluant les glandes salivaires, le foie, la vésicule biliaire et le pancréas, déversent leurs sécrétions dans le tube digestif, ce qui permet la digestion. Le péritoine assure la protection et le maintien des organes situés dans la région abdominale.

1.1.1 Structure du tube digestif

Le tube digestif débute au niveau de la cavité buccale, où les aliments sont mastiqués et mélangés à la salive et au mucus, ce qui forme le bol alimentaire. Ce dernier est acheminé par le pharynx, puis par l'œsophage, avant d'atteindre l'estomac. Il devient le chyme une fois mélangé aux sucs gastriques. L'intestin grêle reçoit le chyme et les sécrétions des glandes annexes. Il a pour principales fonctions la digestion et l'absorption de la majorité des nutriments (acides gras, acides aminés et carbohydrates). Il est divisé en trois parties : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le côlon suit l'intestin grêle et intervient dans l'absorption de l'eau et d'électrolytes, dans la production de vitamines via certaines bactéries, ainsi que dans l'élimination de déchets. Il contient la plus grande concentration du microbiote intestinal (bactéries, virus, bactériophages, etc.) (sera décrit dans la section 1.2). Il comprend le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïdo-pelvien et enfin, le rectum qui permet un contrôle sur l'évacuation des selles par l'anus. Les selles sont composées du chyme mélangé au mucus et aux microorganismes de l'intestin (1, 2).

1.1.2 Composition de la paroi intestinale

La paroi intestinale est divisée en quatre couches, soit la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. Selon la localisation dans l'intestin, ces différentes couches présentent

des distinctions pour s'adapter aux différentes fonctions physiologiques. La muqueuse correspond à la région superficielle du tube digestif qui est en contact avec la lumière intestinale. Elle inclut une monocouche de cellules épithéliales intestinales (CEIs) spécialisées, la lamina propria où se trouvent les cellules immunitaires du système inné ou adaptatif, ainsi que le *muscularis mucosae*. Cette dernière est une couche musculaire qui sépare la muqueuse de la sous-muqueuse et qui intervient dans des mouvements locaux. Ceci favorise le contact entre l'épithélium et le contenu de la lumière et est optimal pour la libération du contenu des cryptes glandulaires. La sous-muqueuse comprend du tissu conjonctif irrigué par des vaisseaux sanguins et lymphatiques. À cet endroit, on retrouve également des plexus nerveux qui jouent un rôle dans la régulation de la digestion. La musculature est composée de deux couches de muscles lisses, d'abord le muscle circulaire interne, puis le muscle longitudinal externe. Cette disposition favorise les contractions intestinales, ce qui induit le mélange et la propulsion péristaltique des aliments dans le tube digestif. Enfin, le péritoine viscéral, une membrane séreuse, est la partie la plus externe qui recouvre l'organe. Elle est constituée d'une couche de cellules mésothéliales et de tissu conjonctif (1, 2).

1.1.2.1 Les cellules épithéliales intestinales

L'épithélium intestinal joue un rôle de barrière sélective et semi-perméable, en bloquant les agents potentiellement pathogènes, tout en permettant l'absorption de nutriments et le passage de signaux immunitaires (3).

L'épithélium de l'intestin grêle est constitué de plusieurs villosités/cryptes se succédant. Les villosités sont des replis de la muqueuse qui se projettent dans la lumière intestinale. Chacun de ces replis est recouvert d'une monocouche de CEIs polarisées et englobe une artériole, une veinule et un capillaire lymphatique. Ceux-ci contribuent au transport de molécules et à l'évacuation de déchets. Par ailleurs, les villosités présentent plusieurs projections digitiformes observables au microscope, soit les microvillosités, qui donnent l'apparence d'une bordure en brosse. Elles apparaissent à la surface des CEIs, face à la lumière. Les villosités/microvillosités ont pour but d'augmenter la surface de contact avec le contenu intestinal, ce qui favorise et accélère la digestion et l'absorption. Elles sont séparées par une invagination s'enfonçant jusqu'à la *muscularis*

mucosae, appelée la crypte de Lieberkühn. Quant au côlon, il possède des cryptes, mais est dépourvu de villosités. Au fond des cryptes se trouvent des cellules souches épithéliales pluripotentes qui ont le potentiel de se différencier en cellules entérocytaires. Ces dernières pourront, par la suite, se différencier en divers types de CEIs, soit les entérocytes, les cellules caliciformes, les cellules entéro-endocrines, les cellules de Paneth, les cellules M et les cellules tuft (2, 4). Elles possèdent des rôles spécifiques (seront décrits dans les prochaines sections) et sont présentes en quantités variables, en fonction de la localisation dans le tractus gastro-intestinal. L'épithélium intestinal est renouvelé de façon continue. Ainsi, les cellules différenciées matures migrent vers le haut des cryptes où elles sont expulsées dans la lumière par desquamation, après 3 à 7 jours de vie. Les cellules de Paneth ont quant à elles une durée de vie de 3 à 6 semaines et demeurent à la base des cryptes (2, 5).

1.1.2.2 La polarité

La polarité de l'épithélium est essentielle pour le maintien de l'homéostasie intestinale, soit le maintien à l'équilibre des fonctions physiologiques. Elle implique que les CEIs possèdent un côté apical qui fait face à la lumière et à l'opposé, un côté basal qui fait face à la membrane basale. Ces deux côtés se distinguent par des organisations structurales et des compositions moléculaires qui sont optimales pour le bon fonctionnement du métabolisme, de l'absorption et de la sécrétion. Certains récepteurs et transporteurs sont distribués préférentiellement à la surface apicale ou basale, permettant ainsi le transport approprié de nutriments et de molécules immunitaires à travers l'épithélium (6).

1.1.2.3 Les jonctions cellulaires

L'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est assurée par des complexes protéiques qui forment les jonctions intercellulaires, ainsi que des jonctions avec la matrice extracellulaire. Elles comprennent les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes, les jonctions communicantes et les hémidesmosomes (représentés à la Figure 1) (7-9).

Les jonctions serrées régulent la perméabilité et les mouvements paracellulaires de plusieurs molécules, tels que des ions, des solutés et l'eau. Elles comprennent différentes protéines, qui sont davantage situées du côté apical, telles que les claudines et les occludines. Ces dernières connectent les protéines zonula occludens (ZO) qui agissent comme des ponts pour lier les jonctions avec les protéines du cytosquelette (10). Les jonctions adhérentes se situent sous les jonctions serrées et contribuent à leur assemblage (11). Les jonctions adhérentes et les desmosomes assurent un lien fort et étroit entre les CEIs. Les jonctions communicantes, ou *gap junctions*, sont formées de connexines regroupées en canaux. Elles relient le cytoplasme des CEIs voisines et permettent le passage intercellulaire d'ions et de molécules de faible poids moléculaire (moins de 2 kDa) (8). Les jonctions serrées, adhérentes, communicantes et les desmosomes sont régulés directement ou indirectement par des molécules du cytosquelette telles que l'actine et la myosine (8, 10-12). Enfin, les hémidesmosomes lient les cellules à la matrice extracellulaire.

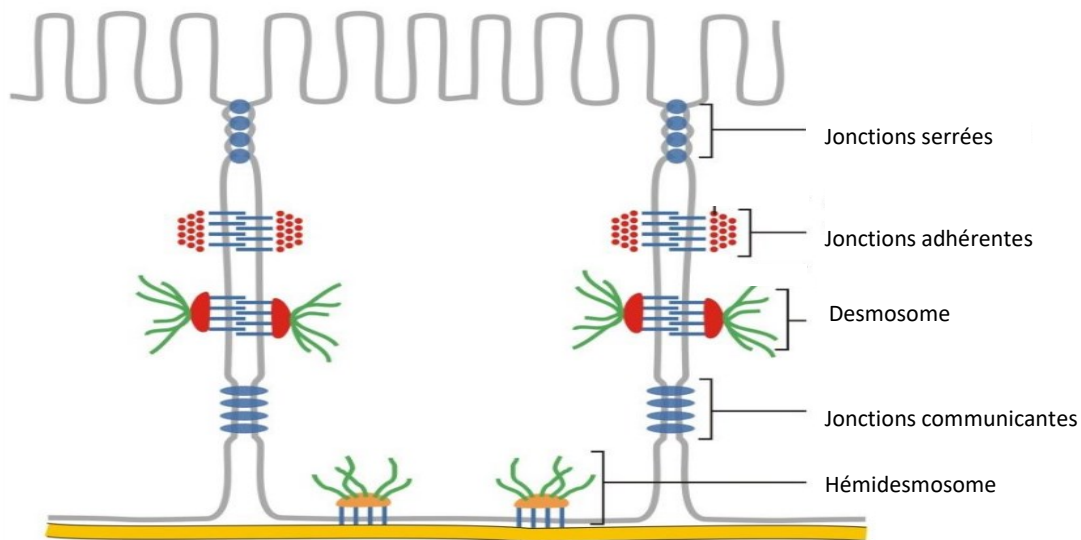


Figure 1. Distribution des jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal.

Ces jonctions sont représentées par les jonctions serrées, adhérentes, communicantes, les desmosomes et les hémidesmosomes. Adaptée de Forget *et al.* (9).

1.1.2.4 Les entérocytes

Les entérocytes sont situés dans le petit intestin, ainsi que dans le côlon et ils représentent environ 90% des CEIs (13, 14). Leur principale fonction est l'absorption, ce qui est favorisé par la bordure

en brosse retrouvée au pôle apical. Les entérocytes se retrouvent davantage dans l'intestin grêle, comparativement au côlon. En effet, l'intestin grêle exprime jusqu'à 80% des entérocytes intestinaux. Par ailleurs, la plupart des nutriments sont absorbés par les entérocytes de l'intestin grêle (13, 15). Ils jouent d'ailleurs un rôle important dans l'absorption des lipides, en modifiant leurs composantes chimiques afin de permettre leur entrée dans le système lymphatique. Plus spécifiquement, les lipides alimentaires sont digérés par des enzymes de la lumière intestinale, avant d'entrer dans les entérocytes et d'être estérifiés de nouveau. Ces derniers sont par la suite emmagasinés dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques ou ils sont transformés en pré-chylomicrons, dans le réticulum endoplasmique. Les pré-chylomicrons sont transportés à l'appareil de Golgi et deviennent des chylomicrons matures. Ceux-ci sortent de la cellule par exocytose pour rejoindre le système lymphatique, où ils peuvent circuler. L'eau est quant à elle absorbée par les entérocytes du côlon. (16).

Les entérocytes ont également une fonction dans la défense immunitaire. Ils ont la capacité de sécréter des cytokines/chimiokines en présence de certains pathogènes. Ceci a pour principal effet de recruter et/ou d'activer des cellules immunitaires, tels que des neutrophiles, des macrophages, des lymphocytes T et des cellules dendritiques (13). Par ailleurs, les entérocytes sécrètent des peptides antimicrobiens tel que la *C-type lectin regenerating islet-derived protein III γ* (REGIII γ). Cette dernière peut également être sécrétée par les cellules de Paneth et aurait pour effet de limiter l'accès des bactéries aux CEIs (17).

1.1.2.5 Les cellules caliciformes

Les cellules caliciformes ont pour principal rôle la sécrétion de mucine. Cette dernière forme un arrangement pour créer la barrière protectrice de mucus et limite l'accès des microorganismes de la lumière intestinale aux CEIs (18). Le mucus a également une utilité de protection contre les contraintes mécaniques, en lubrifiant le contenu intestinal (19). De plus en plus d'études soulèvent l'implication des cellules caliciformes dans le système immunitaire de l'intestin. Ces dernières peuvent notamment capter des antigènes et être régulées par des cytokines immunomodulatrices (18, 20).

Différents types de cellules caliciformes se retrouvent à des localisations précises du tube digestif et présentent des fonctions spécifiques. Les cellules caliciformes situées en surface du côlon sécrètent de façon constitutive pour permettre le maintien de la couche de mucus. À l'opposé, celles situées dans les cryptes du petit intestin et du côlon sécrètent seulement en présence de certains stimuli tels que l'acétylcholine ou d'autres agonistes cholinergiques (21).

1.1.2.6 Les cellules entéro-endocrines

Le système entéro-endocrinien représente le plus grand système endocrinien du corps, bien que les cellules entéro-endocrines ne représentent que 1 % des CEIs. Elles sont dispersées à partir de l'estomac, jusqu'au rectum et permettent l'absorption des nutriments (acides gras, carbohydrates et acides aminés) (22, 23). Il existe plusieurs types de cellules entéro-endocrines intestinales, tels que les cellules K, L, I, G, les cellules entérochromaffines, etc. Celles-ci présentent diverses fonctions et libèrent des molécules intervenant dans la régulation de la digestion, telles que des hormones peptidiques (motiline, sécrétine et leptine), ainsi que des amines bioactives (histamine et sérotonine) (23). Ces molécules peuvent moduler l'appétit, la motilité et les sécrétions intestinales, ainsi que l'homéostasie de glucose. Les hormones intestinales sécrétées communiquent de façon paracrine ou endocrine avec des organes distants. Ces cellules peuvent activer le nerf afférent vagal pour influencer des fonctions intestinales, telles que la motilité intestinale, la sécrétion d'acide, la production d'enzymes pancréatiques, la sécrétion et les contractions de la vésicule biliaire (23-25).

Les cellules entéro-endocrines peuvent affecter l'immunité innée en conduisant à l'expression de cytokines suite à la reconnaissance de microorganismes et en relayant rapidement des signaux au système immunitaire (23, 26). Par ailleurs, les hormones peptidiques peuvent jouer un rôle dans l'immunité adaptative, par exemple, en diminuant (cholécystokinine (27) et somatostatine (28)) ou en augmentant (ghréline (29)) l'activation des lymphocytes B, ainsi qu'en favorisant leur prolifération (neurotensine (30)).

1.1.2.7 Les cellules de Paneth

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et jouent un rôle de protection. Par exemple, elles assurent le maintien de la niche de cellules souches intestinales, en sécrétant, de façon constitutive, des molécules tels que Wnt, le facteur de croissance épidermique (EGF) et les ligands de Notch (31). Elles produisent également des molécules immunitaires, tels que l'interféron- β (IFN- β) et l'interleukine-1- β (IL-1- β) (31, 32). Aussi, sous l'influence de stimuli variés, tels que des agents cholinergiques ou certaines cytokines, elles libèrent des granules. Celles-ci contiennent des peptides ou des protéines antimicrobiennes, des cytokines et des protéases (31). L' α -défensine est la protéine la plus exprimée par ce type cellulaire (33). Elle agit contre une grande variété de pathogènes et elle est la seule composante granulaire des cellules de Paneth connue pour avoir une fonction antivirale (34). De plus, les sécrétions de ces cellules peuvent influencer la composition du microbiote intestinal. Par exemple, l'absence d' α -défensine mature au niveau de l'intestin grêle de souris induirait des changements chez les espèces bactériennes dominantes du microbiote (Firmicutes et Bacteriodes). Dans le cadre de cette expérience, aucun autre effet n'a été observé suite à cette modification microbienne, bien que des effets métaboliques (principalement obésité) ont déjà été rapportés dans de tels cas (35). L'épithélium du côlon n'a pas de cellules de Paneth, mais possède des cellules ayant des fonctions similaires, soit les cellules sécrétrices de crypte profonde (36, 37).

1.1.2.8 Les cellules tuft

Les cellules tuft représentent environ 0,4% des CEIs (38). Elles sont des cellules sécrétrices caractérisées par de longues microvillosités du côté apical et elles ont une forme cylindrique qui se rétrécit aux extrémités apicale et basale (39, 40). Dépendamment de l'environnement, elles peuvent libérer des molécules ayant diverses fonctions biologiques, tels que l'acétylcholine (neurotransmetteur), des cyclooxygénases pro-inflammatoires, ainsi que des protéines impliquées dans la transduction du goût (39, 41). Elles sont également connues pour induire l'immunité de type 2. Celle-ci intervient dans les allergies, ainsi qu'en présence de certains parasites, tels que les helminthes, afin de les éliminer (41). Il existe deux populations de cellules tuft matures dans l'intestin, soit tuft-1 et tuft-2. Ces sous-types sont similaires, mais les cellules tuft-1 sembleraient

davantage jouer un rôle de neuromodulateur, alors que les cellules tuft-2 seraient plutôt associées à des fonctions immunologiques (42).

1.1.2.9 Les cellules *Microfold* « M »

Les cellules *Microfold* ou cellules M de l'épithélium intestinal sont principalement situées dans des régions appelées épithélium associé aux follicules (EAF), où elles représentent 10% des cellules (43). Elles ont une morphologie particulière caractérisée par une bordure en brosses irrégulière et des microvillosités réduites, ainsi que des récepteurs extracellulaires situés du côté apical (glycoprotéine 2 (GP2), protéine prion cellulaire (PrPC), etc.). Ceci facilite la reconnaissance de particules, d'antigènes, de bactéries et de virus pathogènes de la lumière intestinale (43-45). Par processus de transcytose, ces derniers se déplacent jusqu'au côté basal pour atteindre les cellules immunitaires sous-épithéliales, au niveau de la lamina propria. À cet endroit, on retrouve le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT) qui représente un site important où ont lieu les réponses immunitaires (43). Celui-ci sera davantage décrit dans la section suivante.

1.1.2.10 Le tissu lymphoïde associé à la muqueuse intestinale (MALT)

Le MALT consiste en des agrégats de tissus lymphoïdes situés sous le EAF (46). Il inclut divers tissus lymphoïdes tels que les patchs de Peyers de l'intestin grêle, les patchs caecaux, les patchs coliques et des follicules lymphoïdes isolés (45). Ces derniers sont de grands réservoirs de lymphocytes B. Ils comprennent également des lymphocytes T, ainsi que des phagocytes mononucléaires qui peuvent s'attaquer aux microbes (45, 46). Enfin, le MALT est essentiel pour contenir ou éliminer les microorganismes pathogènes ayant traversé la barrière intestinale (46).

1.2 Le microbiote intestinal

Le microbiote est un véritable écosystème constitué majoritairement de bactéries et également de virus, d'archées, de champignons et de protozoaires (47). Chez l'humain, on le retrouve à différents endroits, tels que la peau et la cavité buccale, bien qu'il soit majoritairement localisé au niveau de

l'intestin, et plus particulièrement au niveau du côlon (48). Le microbiote intestinal humain adulte serait composé d'environ mille milliards de cellules et représenterait approximativement 100 fois plus de gènes non redondants que de gènes contenus dans le génome humain (49). De plus, la majorité de ces microbes sont retrouvés chez la plupart des individus sains (47).

1.2.1 Développement du microbiote

L'établissement du microbiote apparaît tôt au cours de la vie. À la naissance, ce dernier est faiblement diversifié, mais il se complexifie jusqu'à environ 3-5 ans. À ce moment, il est presque aussi complexe que celui de l'adulte (50). L'accouchement par voie vaginale, plutôt que par césarienne, ainsi que l'allaitement sont favorables pour la diversité et la composition du microbiote (51). Une grande diversité du microbiote intestinal est associée à une stabilité de l'écosystème intestinale et à une meilleure santé de l'individu (49).

1.2.2 Modulation de la composition du microbiote

Les distinctions interindividuelles, en ce qui concerne la composition du microbiote intestinale, peuvent résulter de facteurs génétiques et environnementaux, tels que l'alimentation et la prise de médicaments. Il a été proposé que les humains soient divisés en trois entérotypes. L'entérotipe 1 est caractérisé par la prédominance des bactéries *Bacteroides*, l'entérotipe 2 des *Prevotella* et l'entérotipe 3, des *Ruminococcus*. À long terme, l'alimentation peut influencer l'entérotipe. Par exemple, une alimentation riche en gras et en protéines favorise les entérotypes 1 et 3, alors qu'une alimentation riche en carbohydrates favorise davantage l'entérotipe 2 (52). Le microbiote intestinal produit des milliers de métabolites qui jouent plusieurs fonctions chez l'hôte, ainsi que sur sa santé. Il peut être impliqué dans la régulation de mécanismes immunitaires et métaboliques, ainsi que dans des traits neurocomportementaux.

Les fibres alimentaires représentent un large éventail de polysaccharides qui ne peuvent pas être digérés par les enzymes humaines. Elles sont toutefois un substrat important pour les bactéries intestinales. Ces dernières ont la capacité de dépolymériser et de fermenter les polysaccharides en acides gras à chaîne courte (AGCC) qui sont absorbables par l'hôte (53). Les cellules entéro-

endocrines expriment des *free fatty acids receptors* (FFAs) en grande quantité. Les FFA2 et FFA3 sont des récepteurs pour les AGCC et sont impliqués dans l'augmentation de la sécrétion d'hormones intestinales, tels que le peptide YY (PYY) et le *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) (54). Aussi, une plus grande présence d'AGCC circulant est, entre autres, associée à une diminution de la résistance à l'insuline et à une baisse du taux d'obésité (55). Enfin, une alimentation riche en graisse induit un microbiote pro-inflammatoire, ce qui a pour conséquence d'augmenter la perméabilité intestinale et peut résulter en une amplification des lipopolysaccharides circulant (52).

1.2.3 Débalancement du microbiote

La dysbiose est un débalancement du microbiote intestinal et elle est associée à plusieurs maladies, telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (MII) (37), l'obésité (55), des allergies (56), etc. Les antibiotiques nuisent à la survie des bactéries et ont donc pour effet d'altérer leur composition au niveau du microbiote intestinal, en diminuant leur quantité, ainsi que leur composition. Ceci peut avoir des effets délétères sur l'hôte, par exemple en nuisant à la protection contre les pathogènes qui est normalement offerte par le microbiote commensal (57). Des régimes alimentaires sains et des interventions nutritionnelles spécifiques telles que l'addition de fibres alimentaires, ainsi que la consommation de probiotiques et de prébiotiques sont importants pour conserver et restaurer l'équilibre des bactéries intestinales bénéfiques (58).

1.2.4 Le virome intestinal

Le virome est représenté par les composants viraux du microbiote et comprend principalement des bactériophages capables d'infecter des bactéries, ainsi que des virus pouvant infecter les cellules d'eucaryotes (59). Le bactériophage le plus abondant dans le virome est le crAssphage (60, 61). Celui-ci reste à être caractérisé, mais il se pourrait qu'il infecte des espèces du phylum *Bacteroidetes*, qui incluent certaines des bactéries les plus fréquemment retrouvées dans l'intestin humain (37, 60). Par ailleurs, dans un microbiote sain, on retrouve de façon importante les bactériophages de l'ordre des *Caudovirales* (virus à ADN double brin (ADNdb)) et des virus de la famille des *Microviridae* (virus à ADN simple brin (ADNsb)). De façon générale, les

bactériophages influencent l'identité des communautés bactériennes, soit par la lyse de cellules procaryotes de l'intestin ou par l'intégration de leur génome. Ceci peut modifier les structures de surface des bactéries, ainsi que les interactions bactéries-hôte. Ils peuvent aussi modifier le phénotype des bactéries et faire en sorte qu'elles développent une résistance aux antibiotiques, qu'elles deviennent capables de produire des toxines ou qu'elles puissent augmenter leur rendement énergétique (62-64). Les virus à ARN constituent une minorité des composants du virome et sont souvent associés à des gastroentérites (ex. rotavirus et norovirus) (59). La majorité des virus à ARN du virome proviennent des plantes, alors qu'une faible quantité est associée aux animaux (65). Par ailleurs, on retrouve peu de bactériophages à ARN (59, 65).

Les composants du virome peuvent être bénéfiques pour l'hôte. Par exemple, les phages peuvent agir en tant qu'alliés en fournissant à l'hôte des gènes qui donneraient des avantages concurrentiels dans l'écosystème qu'ils partagent (mutualisme) (66). Par ailleurs, certains bactériophages adhèrent à la muqueuse intestinale et la protègent contre des infections bactériennes (67). De plus, certains virus connus pour être pathogènes résident dans l'intestin sur une longue période, sans causer d'effet négatif, et peuvent même jouer un rôle protecteur pour l'hôte (68). Ils agissent, par exemple, en stimulant des réponses immunitaires à faible intensité. C'est le cas du norovirus, un virus connu pour causer la gastroentérite chez l'homme et qui infecte également la souris. Ce virus pourrait persister dans l'intestin de souris immunocompétentes, sans causer de maladie. (69, 70). D'ailleurs, l'infection avec du norovirus de souris sans microbiote (gardées dans des conditions stériles dès la naissance) ou de souris ayant été traitées aux antibiotiques pour éliminer leur microbiote aurait eu pour effet de renverser les effets négatifs causés par l'absence d'un microbiote intestinal. Le norovirus murin aurait, entre autres, amplifié la grosseur des villosités, la protection par les lymphocytes et le nombre de granules par cellules de Paneth, sans causer d'inflammation ou de maladies. Les voies de signalisations associées aux IFNs de type I seraient reliées à ces changements. De plus, l'utilisation de norovirus aurait permis de retrouver les effets bénéfiques qu'offre normalement le microbiote commensal, en permettant de mieux résister à des infections bactériennes et à des dommages intestinaux causés par des agents chimiques (70). À l'opposé, des virus entériques qui sont généralement tolérés peuvent parfois avoir un impact négatif chez certains individus. Par exemple, une étude suggère que le réovirus, un virus à ARNdb qui est normalement

bien éliminé par l'hôte, jouerait un rôle dans l'inflammation en réponse au gluten et pourrait accentuer la sensibilité pour le développement de la maladie cœliaque (71).

1.3 Protection/défense de l'intestin

La muqueuse intestinale est exposée à l'environnement extérieur, ce qui la rend vulnérable aux infections. La barrière intestinale présente des mécanismes de protection pour éviter la pénétration de pathogènes dans le corps.

1.3.1 Mécanismes de défense non immunologiques

1.3.1.1 Muqueuse

Tel qu'expliqué à la section 1.1.2.1, l'étanchéité de la barrière intestinale est assurée par les jonctions cellulaires, ainsi que par le renouvellement continu de l'épithélium, qui permet le remplacement de cellules épithéliales endommagées (72).

1.3.1.2 Mucus

Le mucus intestinal joue un rôle protecteur important en freinant ou en bloquant l'accès des pathogènes et des composants du microbiote intestinal à l'épithélium. Il résulte en l'arrangement particulier de mucine, qui présente des pores de grosseurs variables, selon la localisation dans le tube digestif. Au niveau du côlon on retrouve deux couches de mucus. Celle la plus interne est très épaisse, ce qui est optimal pour protéger l'épithélium. L'intestin grêle ne possède qu'une seule couche de mucus, avec des pores plus gros et plus perméables, favorisant ainsi l'absorption des nutriments (73).

1.3.1.3 Péristaltisme

Le péristaltisme se définit par des contractions intestinales permettant le cheminement du contenu intestinal vers l'anus. Ceci favorise la clairance des aliments, des bactéries et des déchets.

L'absence de péristaltisme a été associée à une prolifération de bactéries anaérobiques au niveau du petit intestin, ce qui peut nuire à l'absorption des nutriments et causer de l'inflammation au niveau de la muqueuse intestinale (2, 74). Par ailleurs, le péristaltisme est important pour conserver un équilibre au niveau des bactéries du côlon (75).

1.3.1.4 Neurones sensoriels

Le système nerveux entérique joue plusieurs rôles tels que la régulation de la motilité de l'intestin, ainsi que la nociception, soit l'habilité à percevoir des stimuli dangereux ou potentiellement dangereux (76). Suite à la détection de signaux, telles que des blessures mécaniques, de l'inflammation et la présence de métabolites bactériens, les neurones sensoriels nociceptifs de l'intestin libèrent des neuropeptides (tels que le peptide lié à la calcitonine, la substance P et le peptide intestinal vasoactif) (77, 78). Ceux-ci régulent la vascularisation, ainsi que des réponses immunitaires innées et adaptatives (78). Ramirez *et al.* ont procédé à l'ablation sélective de neurones nociceptifs de souris, avant de les infecter avec *Citrobacter rodentium*, ce qui a amplifié l'infection et retardé la clairance bactérienne. Ceci suggère que ces nerfs favorisent la coordination du système immunitaire de l'hôte pour optimiser sa protection (79).

1.3.1.5 Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote

Les espèces réactives de l'oxygène dérivées des mitochondries (ROS), tels que le peroxyde et l'hydroperoxyde, ainsi que les espèces réactives de l'azote (RNS) peuvent être produites naturellement dans les cellules du corps, suite au métabolisme de l'oxygène et de l'azote. Ils jouent normalement des rôles dans la signalisation cellulaire et dans l'homéostasie (80-82). Cependant, le stress oxydatif caractérisé par un déséquilibre entre la production et l'élimination des ROS/RNS et la défense antioxydante, ainsi que la modification des biomolécules produites par les ROS/RNS sont associés à certaines conditions, tel que des processus inflammatoires (82, 83). Une trop grande exposition à ces espèces réactives peut nuire les fonctions intestinales, tel qu'en nuisant à l'absorption, en augmentant la perméabilité et en nuisant à la motilité (83).

1.3.1.6 Gradient de la tension d'oxygène dans l'intestin

Le côlon maintient une faible tension en oxygène ($\sim 0,1-1$ mmHg), ce qui est favorable à la survie des microorganismes anaérobiques qui représentent plus de 90% des microbes du microbiote. Les CEIs situées aux extrémités des villosités sont hypoxiques, alors que celles situées à la base sont davantage oxygénées. Cette oxygénation est particulièrement possible grâce aux vaisseaux sanguins de la lamina propria (84).

Lorsqu'il y a une faible présence d'oxygène, des signaux hypoxiques sont libérés par les cellules. Ceci se fait via l'expression de facteurs de transcription, tels que le facteur inductible par l'hypoxie (HIF)-1 α et HIF-2 α . Ces derniers permettent le maintien de l'homéostasie intestinale. En condition d'inflammation, HIF-1 α augmente les gènes importants pour la protection de la barrière, induit des réponses immunitaires innées et active des réponses antimicrobiennes, via l'augmentation de la production de β -défensines. HIF-2 α permet le maintien de la réponse inflammatoire déclenchée par l'épithélium et est important pour la régénération de l'intestin après une lésion aiguë (85, 86).

1.3.1.7 Stress du réticulum endoplasmique

Afin de répondre à des stimuli environnementaux qui constituent des menaces pour les CEIs, le stress du réticulum endoplasmique et la réponse liée aux protéines mal repliées (UPR) qui y est associée peuvent intervenir. Ce stress est normalement favorable à l'homéostasie intestinale et à l'élimination de pathogènes. De plus, au niveau de l'épithélium intestinal, ce mécanisme favorise l'expansion de cellules du microbiote intestinal, de lymphocytes T, ainsi que l'activation de lymphocytes B. Ceci favorise la production d'anticorps, protège contre l'inflammation intestinale et apporte une protection supplémentaire à la barrière intestinale (87). Toutefois, une trop grande présence de celui-ci peut induire des effets délétères, tels qu'un excès de cellules dysfonctionnelles et la mort cellulaire. À noter qu'une trop grande présence de ROS peut générer le stress du réticulum endoplasmique et par le fait même, accentuer la réponse inflammatoire (88).

1.3.2 Mécanismes de défense immunologiques

La majorité des mécanismes immunitaires intestinaux se produisent au niveau de la muqueuse. Le système immunitaire doit s'adapter pour maintenir l'homéostasie et offrir des réponses appropriées aux menaces potentielles (46). Normalement, les microorganismes dans la lumière intestinale ne provoquent pas d'inflammation directement. Ils peuvent toutefois induire un effet indirect en modifiant la composition de microorganismes étant en contact plus rapproché avec la muqueuse (par exemple via l'action de métabolites) (89). De plus, les microorganismes qui parviennent à atteindre l'épithélium et qui arrivent au niveau de la lamina propria induisent d'abord une réponse inflammatoire locale (90).

Les CEIs peuvent induire des réponses immunologiques. Par ailleurs, des lymphocytes T et des cellules dendritiques sont situés au niveau de l'épithélium. La lamina propria contient des cellules immunitaires de la réponse innée pouvant interagir rapidement avec les pathogènes qui ont traversé la barrière épithéliale. On y retrouve les cellules dendritiques, les macrophages et les mastocytes (91, 92). De plus, la lamina propria comprend des structures organisées d'organes lymphoïdes, tels que le MALT, ainsi que les ganglions lymphatiques drainants, où sont principalement générées les réponses immunitaires adaptatives (46).

1.3.2.1 La réponse immunitaire innée

Les cellules du système immunitaire inné reconnaissent les agents pathogènes pour initier une réponse de défense immédiate et éventuellement mener à une réponse adaptative. Elles possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRRs). Ceux-ci sont capables de reconnaître des structures spécifiques aux pathogènes, soit les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs). Ils peuvent comprendre des glycolipides, des polysaccharides et des lipoprotéines (90).

La liaison des pathogènes aux cellules induit des mécanismes de défense et peut mener à la sécrétion de cytokines et de chimiokines inflammatoires. Ces dernières vont faciliter le recrutement de leucocytes circulant dans le sang, tels que les monocytes, les neutrophiles et les basophiles. L'arrivée rapide de leucocytes au site d'infection permet de limiter les dommages

pouvant être causés par les pathogènes. Les cellules immunitaires de la réponse innée peuvent induire la phagocytose, la sécrétion de granules toxiques, ainsi que la lyse des pathogènes et des cellules infectées (90).

1.3.2.2 La réponse immunitaire adaptative

La reconnaissance de microbes par les cellules présentatrices d'antigènes, telles les cellules dendritiques, conduit à l'activation des lymphocytes T et B (90). Ces derniers induisent une réponse de longue durée et gardent en mémoire les pathogènes rencontrés, ce qui permet l'immunité adaptative. Les lymphocytes T sont associés à l'immunité à médiation cellulaire, alors que les lymphocytes B sont reliés à l'immunité humorale qui comprend la production d'immunoglobulines (Igs), aussi appelées anticorps.

Les lymphocytes T et B possèdent un récepteur unique pour chaque antigène rencontré, soit respectivement, le *T-cell receptor* (TCR) ou le *B-cell receptor* (BCR). Cette spécificité est possible grâce à la recombinaison des segments de gènes V (gènes variables), D (gènes de diversité) et J (gènes de jonction). Pour les Igs, la chaîne lourde est composée des segments V, D, J alors que la chaîne légère est composée des segments V et J. En ce qui concerne les récepteurs des lymphocytes T, la chaîne β est composée des segments V, D et J et la chaîne α de V et J (93). Les lymphocytes fonctionnels qui expriment un TCR ou un BCR unique deviennent des lymphocytes naïfs matures, qui circulent dans le sang, à la recherche d'antigènes pathogéniques. Ils lieront une partie précise de l'antigène appelée épitope. Suite à l'exposition primaire à un antigène, des lymphocytes mémoires seront produits et seront prêts à réagir rapidement face à une éventuelle exposition (94).

1.3.2.2.1 *Lymphocytes T*

De façon générale, les lymphocytes T se différencient en deux types principaux, soit les lymphocytes T auxiliaires (Th) et les lymphocytes T cytotoxiques (Tc). Les Th de l'intestin comprennent différents sous-types, tels que Th1, Th2 et Th17 (95). Le type de Th dans lequel les lymphocytes se différencient dépend de signaux envoyés par les cellules présentatrices d'antigènes et par les CEIs (46). Ils libèrent plusieurs cytokines et dirigent une réponse immunitaire contre les

agents pathogènes. Il existe deux sous-types de Tc (Tc1 et Tc2) qui sécrètent des cytokines similaires à Th1 et Th2. Aussi, les Tc induisent la mort des cellules infectées avec des molécules pro-apoptotiques, telles que les perforines et les granzymes. Ils peuvent aussi induire l'apoptose, via la cascade de signalisation induite, suite à l'interaction du récepteur Fas avec FasL, au niveau de la membrane cellulaire (96). D'autres lymphocytes T, les cellules T régulatrices (Treg), régulent négativement les réponses immunitaires et aident à prévenir l'activation de lymphocytes pouvant agir contre le soi. Ils contribuent également à rendre l'environnement tolérable face aux antigènes alimentaires ou aux microorganismes commensaux (95).

Par ailleurs, les lymphocytes T intestinaux sont regroupés en deux classes, dépendamment du lieu où ils se développent, soit les lymphocytes T conventionnels et non conventionnels. Ces derniers peuvent présenter des fonctions et des phénotypes différents. Les conventionnels se forment dans le thymus et sont retrouvés à la fois dans la lamina propria et l'épithélium intestinal. Ils circulent et migrent vers le MALT où ils sont activés par des antigènes. Quant à eux, les non conventionnels se développent et atteignent leur maturité dans l'intestin. Ils sont essentiellement localisés dans l'épithélium (95).

1.3.2.2.2 *Lymphocytes B*

Suite au contact avec des antigènes solubles ou avec une cellule présentatrice d'antigènes, les lymphocytes B se différencient en plasmocytes qui produisent des Igs en grande quantité. Les Igs peuvent neutraliser les pathogènes de façon spécifique et attirent éventuellement d'autres cellules immunitaires (94). Les lymphocytes T ou les cellules présentatrices d'antigène influencent le type d'anticorps sécrété par les plasmocytes. Les IgA, IgG et IgM sont les anticorps les plus présents dans le sérum. Les IgG et les IgA sont généralement en concurrence avec les IgM pour les antigènes peptidiques ou protéiques, alors que les IgM compétitionnent avec les IgG et les IgA pour plusieurs antigènes glycaniques (97). Les plasmocytes du petit intestin sécrètent majoritairement des IgAs (90, 98). La concentration d'IgAs à cet endroit est également élevée en condition d'homéostasie, soit en l'absence d'inflammation. L'humain exprime deux sous-types d'IgAs : les IgAs1 retrouvés principalement dans le sérum et les IgAs2 qui sont davantage situés dans l'intestin distal (99). Des IgMs et des IgDs sont également sécrétés au niveau de la muqueuse intestinale, mais en quantité moindre (100). La protéine pIgR retrouvée du côté basolatéral, sur la

membrane des CEIs, lie les Igs, les internalise et les transporte par transcytose afin de les libérer du côté apical (101). Plusieurs études ont rapporté une interaction entre les Igs (IgAs, IgMs ou IgGs) et certains microorganismes du microbiote intestinal humain *in vivo* (99). Par exemple, les IgAs pourraient avoir des effets bénéfiques et/ou négatifs sur le microbiote. Il semblerait que certaines bactéries prennent avantage de la liaison avec les IgAs pour se rapprocher de la couche de mucus et s'y ancrer. De cette façon, l'accès à des espèces concurrentes serait limité. De plus, la liaison des Igs avec le microbiote pourrait également impacter la motilité des microorganismes, moduler l'expression génique, neutraliser les microbes, etc. (102).

1.3.2.2.3 *Les cellules Natural Killers*

Les cellules *Natural Killers* (NK) représentent une autre classe de lymphocytes et elles peuvent être impliquées, à la fois dans l'immunité innée et adaptative (103). Elles sont dispersées dans la lamina propria ou l'épithélium intestinal et elles ne sont pas associées aux agrégats de lymphoïdes (103, 104). Elles interagissent avec diverses cellules immunitaires incluant les macrophages et les lymphocytes T, ainsi qu'avec les CEIs et les fibroblastes (103). Elles contribuent au maintien de l'homéostasie intestinale et sont importantes contre les infections bactériennes, principalement en produisant des IFNs- γ . Ces derniers permettent le recrutement de cellules NK périphériques afin d'amplifier la réponse antibactérienne (105). Par ailleurs, ces cellules possèdent plusieurs récepteurs leur permettant de reconnaître des virus et d'induire une réponse immunitaire appropriée (103).

1.3.3 **Système immunitaire inné des cellules épithéliales intestinales**

Les IFNs sont sécrétés par une grande variété de cellules et ils interviennent dans l'immunité innée. Lors d'infections virales, les IFNs de type I et III sont essentiels pour la protection des CEIs (106). Chez l'humain, les IFNs de type I comprennent 13 sous-types d'IFN- α , ainsi qu'un seul sous-type d'IFN- β , d'IFN- ϵ , d'IFN- κ et d'IFN- ω (107). Ils interagissent tous avec le récepteur de l'IFN α/β (IFNAR). Les IFNs α et β sont les plus étudiés (100, 108). Les protéines associées aux IFNs de type I sont largement exprimées dans les cellules du corps, soulignant l'importance de ce type d'IFNs pour la protection systémique (100, 108). Chez l'humain, les IFNs de type III comprennent

quatre molécules d'IFN- λ (λ 1 (IL29), λ 2 (IL28A), λ 3 (IL28B), λ 4). Leur récepteur est composé du complexe protéique comprenant le récepteur de l'IFN lambda 1 (IFNLR1) et de la sous-unité bêta du récepteur interleukine 10 (IL10RB). Il est spécifiquement exprimé sur les cellules épithéliales, ainsi que sur certaines cellules immunitaires, tels que les cellules dendritiques plasmacytoïdes (107, 109). Cette localisation restreinte suggère que les IFNs de type III sont particulièrement importants pour la protection de la barrière épithéliale du système gastro-intestinal (107, 110). Les IFNs de type I et III présentent plusieurs similarités. Ils conduisent à la production du même groupe de gènes ayant diverses propriétés antivirales, soient les gènes stimulés par les IFNs (ISGs), mais avec des temps d'induction et des concentrations différentes (106). Une mauvaise régulation par les IFNs peut résulter en une dérégulation du système immunitaire intestinal, ainsi que conduire à de l'inflammation et à des pathologies immunologiques (111).

1.3.3.1 Reconnaissance virale et induction des IFNs

Les virus peuvent être reconnus par différents types de PRRs, tels que les *cytosolic RIG-I-like receptors* (RLRs), les *Toll-like receptors* (TLRs), les *Nod-like Receptors* (NLRs), etc. La liaison de ces derniers avec des PAMPs (souvent représentés par de l'ARN ou de l'ADN pour les virus) mène à la production d'IFNs de type I (112). Par ailleurs, de récentes études suggèrent un rôle pour les RLRs, les TLRs et les NLRs dans l'induction des IFNs de type III, bien que les mécanismes restent à être mieux compris (113-117).

Les RLRs sont présents de façon ubiquitaire et ne sont pas fortement exprimés lorsqu'ils ne sont pas stimulés (118, 119). Ils sont divisés en trois protéines pouvant présenter des affinités variables pour les virus : *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5), *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I) et *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) (120). De façon générale, les RLRs et TLR3 peuvent être activés par des types de virus similaires.

1.3.3.1.1 RLRs : MDA5 et RIG-I

MDA5 et RIG-I sont des protéines intracellulaires qui ont en commun, au niveau du domaine N-terminal, un domaine de recrutement des caspases (CARDs). Ce dernier interagit avec la protéine de signalisation antivirale mitochondriale (MAVS) située au niveau de la mitochondrie ou sur les membranes associées aux mitochondries (MAMs) (121). MAVS activée permet l'interaction de *l'inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon* (IKK ϵ) et de la protéine *TANK-binding kinase 1* (TBK1), qui peuvent ensuite phosphoryler les facteurs de régulation de la transcription 3 et 7 (IRF3 et IRF7). Le dimère formé de p-IRF3 et p-IRF7 se déplace au niveau du noyau, et lie les sites de liaisons des facteurs de transcription pour engager la transcription d'IFNs de type I (122). Les mécanismes exacts expliquant la transcription d'IFNs de type III restent à être mieux compris, mais il semblerait qu'IRF3 et/ou IRF7 les induisent également (123). RIG-I et MDA5 interviennent aussi dans la voie de signalisation associée au facteur nucléaire- κ B (NF- κ B), mais avec des mécanismes distincts. RIG-I agirait en amont de la voie canonique, ce qui permet la translocation dans le noyau de deux sous-unités de NF- κ B, soit p50 et p65, alors que MDA5 agirait sur l'expression de NF- κ B indépendamment de cette voie (122, 124). NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans les réponses inflammatoires et dans des réponses liées au stress cellulaire (125). Il intervient, entre autres, dans l'activation des promoteurs des IFNs de type I et III et peut mener à leur transcription (123, 126). Les IFNs sécrétés peuvent activer les cellules environnantes de façon autocrine ou paracrine (122).

RIG-I et MDA5 interagissent généralement avec des virus distincts. MDA5 reconnaît préférentiellement des virus à ARNdb positif ou l'ARNdb résultant de produits de réplication de virus à ARNsb (127-129). De plus, il lie les ARNdb de hauts poids moléculaires (130), tels que les virus de la famille des *Picornaviridae*, comprenant le virus encéphalomyocarditis (EMCV) (131). RIG-I est davantage activé par l'ARNdb de virus de bas poids moléculaire avec la fin 5' triphosphorylée, tels que les réovirus (122, 132). Par ailleurs, MDA5 et RIG-I reconnaissent l'acide polyribonoinosinique : polyribocytidylique (poly (I:C)), une molécule analogue d'ARNdb synthétique. Il est couramment utilisé dans les contextes expérimentaux pour mimer les infections avec les virus à ARNdb (133). RIG-I et MDA5 lieraient respectivement le poly (I:C) de bas et de haut poids moléculaire (134, 135). Or, plusieurs études ont rapporté des distinctions dans des réponses immunitaires suite à des stimulations avec du poly (I:C) commercial, et même entre

différents lots d'un même produit (136, 137). Ces différences pourraient être expliquées par la faible stabilité de l'ARNdb qui pourrait facilement être dégradé et ainsi affecter sa longueur (138). Ceci constitue un inconvénient important à prendre en considération lors de l'utilisation du poly (I:C) en condition expérimentale (137).

Dans certains cas, tels que pour le rotavirus et le virus de la rougeole, MDA5 et RIG-I peuvent agir simultanément et reconnaître différentes régions génomiques d'un même virus (139, 140). Ceci pourrait être expliqué par la présence de variations structurelles au niveau de l'ARN viral, ce qui augmenterait l'affinité de liaison de certaines régions pour MDA5 ou RIG-I (140).

1.3.3.1.2 RLR : LGP2

LGP2 possède une structure similaire à RIG-I et MDA5 et peut lier certains ARNdb viraux. Cependant, il ne possède pas de domaine CARD, ce qui ne lui permet pas d'interagir avec les protéines MAVS et d'induire les mécanismes associés aux IFNs (141). LGP2 peut être un régulateur positif de MDA5, alors qu'il peut être un régulateur négatif de MDA5 et de RIG-I (141-143). Normalement, plusieurs protéines MDA5 formant un oligomère s'associent en longs filaments sur l'ARNdb viral, améliorant ainsi l'interaction avec ce dernier (122). Bruns *et al.* proposent que LGP2 favorise la régulation des filaments de MDA5, au contact de certains ARNdb. (144). Une autre étude suggère que LGP2 inhibe la réponse antivirale générée par MDA5 et RIG-I, en compétitionnant avec les kinases IKKi pour interagir avec les protéines MAVS (145). L'identité des virus pourrait avoir un impact sur l'effet de régulation positive ou négative. Par exemple, la délétion de Lgp2 chez la souris accompagnée d'une infection avec le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), un virus principalement reconnu par RIG-I, aurait pour effet de restreindre l'activité de Rig-I (146, 147). À l'opposé, dans les cas d'infection par l'EMCV, un virus connu pour activer MDA5, LGP2 aurait un rôle de régulateur positif pour conduire à une réponse antivirale (146).

1.3.3.1.3 TLR3

Chez l'humain, les TLRs regroupent onze protéines différentes, capables de reconnaître certains PAMPs et d'engendrer une réponse immunitaire contre les infections (148). Les TLRs sont composés d'un domaine de répétitions riches en leucine (LRR) pouvant lier les PAMPs, ainsi qu'un récepteur toll/IL-1 (TIR), permettant la transmission du signal pour engendrer une réponse inflammatoire (148). TLR3 est activé par les ARNdb viraux ayant un poids moléculaire supérieur à 40 paires de bases (pb), tels que les rotavirus et le Coxsackievirus B3 (149, 150). Il est également induit par le poly (I:C), notamment dans les CEIs (37, 151). TLR3 se situe au niveau des endosomes, pour les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques conventionnelles, alors qu'il est intracellulaire et extracellulaire pour les cellules épithéliales, les cellules NK et les fibroblastes (152). La plupart des TLRs activent un mécanisme dépendant de la réponse primaire de différenciation myéloïde 88 (MYD88), alors que TLR3 agit via un mécanisme indépendant de MYD88. Il utilise la protéine *TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β* (TRIF) et IRF3 pour mener à la transcription d'IFNs de type I et III (153, 154). Ces derniers peuvent également être produits par NF- κ B (154).

1.3.3.1.4 NLRs

Les NLRs jouent un rôle important dans des réponses immunitaires face aux microorganismes. La reconnaissance de PAMPs peut mener à la formation d'inflammasomes qui sont représentés par des complexes protéiques multimériques, comprenant normalement un senseur (NLR), un adaptateur et la *zymogen procaspase 1* (155). Certains NLRs tels que *nucleotide binding oligomerization domain containing 2* (NOD2), *Nod-like receptor family pyrin domain containing 3* (NLRP3), NLRP9 et NLRP6 interviennent dans des réponses antivirales (156, 157). NLRP6 est particulièrement exprimé dans les CEIs et il reconnaît principalement les virus à ARNdb de haut poids moléculaire. Il active la protéine MAVS via la protéine DHX15 et mène à la production d'IFNs de type I et III, et éventuellement à l'induction d'ISGs. Par ailleurs, NLRP6 peut induire des réponses antibactériennes (158).

1.3.3.2 Mécanismes induits par les IFNs

Bien que les IFNs de type I et III lient différents récepteurs, ces derniers mènent à l'activation de plusieurs mécanismes similaires menant à la production d'ISGs. Les IFNs de type I lient d'abord avec une grande affinité la protéine IFNAR2, ce qui lui permet de lier IFNAR1. L'association IFNAR1-IFNAR2 forme le récepteur IFNAR. Quant à lui, l'IFN- λ lie la protéine IL-28R α , ce qui permet un changement de conformation et la liaison de la protéine IL-10R2. Une fois ces deux récepteurs adéquatement formés, il y a dimérisation de la janus kinase 2 (JAK2) et de la tyrosine kinase 2 (TYK2) qui phosphorylent par la suite les protéines STAT1 et STAT2. Ces dernières formeront un hétérodimère. Ce complexe peut ensuite lier la protéine IRF9 pour former un complexe trimérique appelé ISG Factor 3 (ISGF3) qui se rend au noyau et lie le *interferon-stimulated response element* (ISRE), dans les promoteurs des ISGs, ce qui permet leur transcription. Ces molécules sont représentées à la Figure 2 (107).

Par ailleurs, les IFNs de type I et III peuvent mener à l'activation d'autres voies de signalisation cellulaire comme la voie de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), bien qu'il semblerait qu'elle ne soit pas régulée de la même façon par ces deux classes d'IFNs (159). Cette voie joue entre autres un rôle dans la régulation des gènes antiprolifératifs et antiviraux associés aux IFNs (159). Par ailleurs, dans certains types cellulaires, JAK2 serait impliqué dans la signalisation associée aux IFNs de type III uniquement (114, 160).

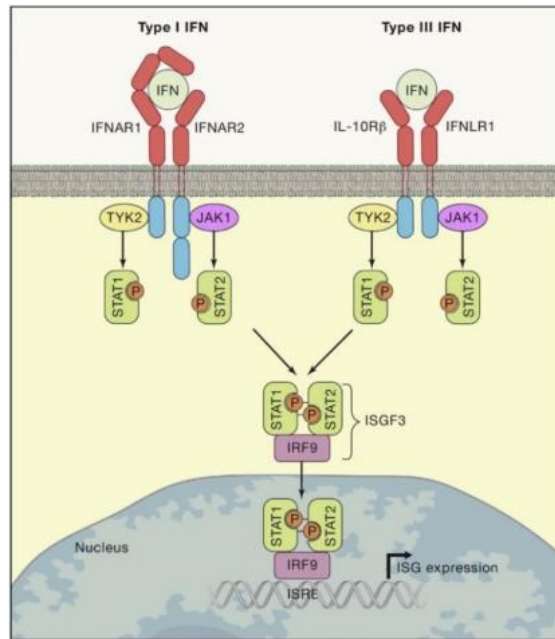


Figure 2. Signalisation des IFNs de type I et III.

Les IFNs de type I et III interagissent respectivement avec récepteurs IFNAR1/IFNAR2 et IL-10Rβ/IFNLR1, ce qui active les protéines STAT1 et STAT2 qui induisent alors IRF9 (formation du complexe ISGF3). ISGF3 lie l'ADN pour mener à la transcription d'ISGs. IFN : interféron, IFNAR : récepteur de l'IFN α/β , TYK2 : tyrosine kinase 2, JAK1 : janus kinase 1, STAT : transducteur de signal et activateur de la transcription, IRF9 : facteurs de régulation de la transcription 9, IL-10Rβ : sous-unité β du récepteur interleukine 10, IFNLR1 : récepteur de l'IFN lambda 1. (107)

1.3.3.3 Les gènes stimulés par les IFNs

Les ISGs représentent un groupe de plusieurs protéines avec diverses fonctions, mais ayant un but commun : restreindre l'infection (161, 162). MDA5, RIG-I, TLR3, NLRP6, IFN- β , *Interferon Induced Transmembrane Protein 1* (IFITM1) et protéine 6 inductible par l'interféron α (IFI6) font partie des protéines codées par les ISGs. Certains d'entre eux interviennent dans le recrutement de cellules immunitaires innées tels que les cellules dendritiques, les neutrophiles et les macrophages (161). Ils peuvent également conduire à l'apoptose, arrêter la traduction et la réplication, inhiber l'entrée des virus, etc. (161, 162). Les IFNs de type I et III induisent différents profils de production d'ISGs. Une étude réalisée dans des organoïdes intestinaux et dans des CEIs aurait démontré qu'en condition d'infection avec le VSV, l'expression des IFNs de type I serait associée à une plus grande relâche d'ISGs et à une induction de la réponse antivirale plus rapide, comparativement à l'expression des IFNs de type III (106).

1.3.3.4 Effet de la polarité cellulaire sur les réponses aux IFNs

Selon l'étude de Bhushal *et al.*, la polarité cellulaire serait importante pour observer une hausse de l'activité des IFNs de type III, ce qui ne semblerait pas être le cas pour les IFNs de type I (163). Il a été démontré que les organoïdes intestinaux dérivés de cellules souches imitent la polarité retrouvée dans l'intestin *in vivo* (164). Dans une étude comparant l'expression d'IFNs- λ avec les modèles d'organoïdes intestinaux ou de CEIs cultivées en monocouche polarisée, la polarité aurait amplifié la cinétique de la réponse induite par les IFNs- λ , ainsi que la sensibilité aux IFNs- λ (163). De plus, la polarité de l'épithélium intestinal aurait également pour effet d'augmenter l'expression du récepteur des IFNs de type III, mais pas d'IFNAR (165).

1.4 Réponse des cellules épithéliales intestinales aux virus entériques

Les CEIs peuvent reconnaître des virus entériques et activer des mécanismes de réponses antivirales, lorsqu'elles perçoivent une menace. De ce fait, elles induisent une réponse immunitaire innée, entre autres en menant à la production d'IFNs de type I et III.

Par exemple, ces deux types d'IFNs sont importants lors d'infection de CEIs par du rotavirus, un virus entérique largement connu pour causer la gastroentérite (166-170). Plus spécifiquement, l'infection avec du rotavirus d'organoïdes intestinaux humains et de Caco-2, un modèle de CEIs bien établi, serait associée à une plus grande transcription d'IFNs de type III et à une plus faible transcription d'IFNs de type I (166, 167). L'induction de l'un ou l'autre de ces deux types d'IFNs ne permettrait pas l'arrêt de la réplication virale (166, 167). Par contre, l'ajout d'IFN- β et d'IFN- λ exogènes inhiberait la réplication du rotavirus dans les cellules intestinales, en amplifiant la production d'ISGs (166, 167). Par ailleurs, Lin *et al.* ont démontré que la régulation des IFNs de type I et III peut varier au cours de la vie. En effet, chez des souris nouveau-nées infectées par du rotavirus, les CEIs auraient mené à une réponse antivirale via les IFNs de type I ou III, mais les CEIs des souris adultes répondraient préférentiellement aux IFNs de type III (168). Dans une autre étude menée par Pott *et al.* l'absence du récepteur des IFNs de type III chez des souris les rendrait plus susceptibles à l'infection par le rotavirus, comparativement à l'absence du récepteur pour les IFNs de type I. De plus, le traitement des souris avec l'IFN de type III avant l'infection avec du

rotavirus empêcherait l'infection virale, à l'opposé du traitement avec les IFNs de type I (169). Dans le cas d'infection de CEIs par du mammalian reovirus (MRV), un virus pouvant activer à la fois MDA5 et RIG-I, la transcription d'IFNs de type I et III serait augmentée (171). Ceci ne serait pas reflété dans le surnageant, où il n'y aurait qu'une hausse d'IFNs de type III (159). Toutefois, ces cellules seraient parvenues à induire l'expression d'ISGs et à engager une réponse antivirale suite à l'ajout d'IFNs de type I ou III exogènes (159). Aussi, ces deux types d'IFNs pourraient suffire indépendamment pour restreindre l'infection (159). Nice *et al.* auraient également attribué un rôle prépondérant pour les IFNs de type III, suite à une infection de souris avec du norovirus, un virus entérique, et suggèrent que les IFNs de type III pourraient constituer un traitement contre les infections virales du tube gastro-intestinal (172).

L'EMCV, est transmis par la route fécale-orale et peut infecter à la fois les animaux (mammifères, oiseaux, insectes) et les humains (157, 173). La pathologie chez les individus infectés diffère entre les espèces et dépend de la souche. Par exemple, les humains et les rongeurs sauvages présentent une faible morbidité lorsqu'ils sont infectés, alors que les rongeurs en laboratoire infectés présentent souvent des encéphalites ou à des myocardites fatales. L'infection oro-nasale avec l'EMCV de 24 porcelets a permis d'isoler le virus dans divers organes, tel que l'intestin, ainsi que dans les selles. Au niveau des cryptes intestinales des porcelets infectés, il y avait de la desquamation des CEIs, ainsi que la présence de neutrophiles (174). Il est largement reconnu que MDA5 interagit avec ce virus. Or, selon l'étude de Wang *et al.*, la protéine NLRP6 interagirait également avec l'EMCV, particulièrement au niveau de l'intestin, et ce, de façon indépendante à MDA5. La charge virale dans les CEIs de souris *knock-out* (KO) pour *Mda5* ou *Nlrp6* serait similaire, mais supérieure à celle de souris *wild type* (wt). À l'opposé, l'infection systémique n'aurait pas d'impact chez des souris *Nlrp6* KO. De façon intéressante, le traitement de souris KO pour NLRP6 ou wt avec de l'IFN- λ , avant une infection avec l'EMCV aurait pour effet de prévenir la mort, ainsi que de réduire significativement la virulence (157).

Enfin, les IFNs de type I et III sont nécessaires pour protéger les CEIs des virus entériques. La réponse aux IFNs de type III semble avoir une fonction essentielle pour protéger les CEIs contre ces infections (166, 167, 172). À l'opposé, les IFNs de type I sont primordiaux pour protéger les cellules immunitaires de la lamina propria, contre les virus entériques et pour éviter la propagation systémique des virus (106, 169, 175).

1.5 Maintien de l'homéostasie via les interactions intestinales

L'organisation structurelle de la muqueuse intestinale et les échanges moléculaires à cet endroit assurent l'absorption efficace des aliments et limitent le passage de microorganismes ou de métabolites potentiellement pathogènes. Afin de conserver l'homéostasie et une réponse inflammatoire adéquate face au microbiote commensal et pathogènes, les différents éléments de la muqueuse doivent communiquer entre eux de façon dynamique. L'épithélium intestinal coordonne les relations entre les microorganismes de la lumière et les cellules immunitaires de la lamina propria. Les CEIs interagissent avec les microbes ou leurs métabolites et peuvent induire la production et la relâche de cytokines qui, entre autres, causent une augmentation de la production de mucus, ainsi qu'une plus grande relâche de peptides antimicrobiens. Des signaux immunitaires et des éléments de la lumière peuvent également être transmis du côté basolatéral des CEIs, et atteindre les cellules immunitaires de la lamina propria, ce qui engendre des réponses de défense appropriées (176). Une stimulation constante et à faible niveau des cellules de l'hôte par le microbiote commensal via les PRRs permettrait de maintenir l'homéostasie dans la réponse immunitaire, ainsi que l'intégrité de l'épithélium (68, 177).

Le dérèglement d'un des éléments mentionnés ci-haut peut induire d'importantes conséquences sur l'homéostasie. Par exemple, l'élimination des IgAs aurait pour effet de moduler l'expression génique de certains microorganismes du microbiote, par exemple en faisant en sorte que les *Bacteroides thetaiotaomicron* expriment davantage de molécules pro-inflammatoires (178, 179). Fait intéressant, dans le cas de de l'immunodéficiences variable commune (CVID) qui regroupe plusieurs désordres cliniques et génétiques, les patients présentent une diminution importante d'IgG, d'IgA et parfois d'IgM dans le sérum et ils sont souvent affectés par des infections bactériennes récurrentes au niveau des voies respiratoires et gastro-intestinales (180). Par ailleurs, des souris sans microbiote présenteraient une muqueuse intestinale amincie, une moins grande quantité de mucus, ainsi qu'une plus faible prolifération des CEIs (13).

1.6 Les maladies inflammatoires de l'intestin

Les MII regroupent principalement la colite ulcéreuse (CU) et la maladie de Crohn (MC). Elles sont des maladies chroniques du tube digestif et résultent d'une réponse anormale du système immunitaire intestinal. Elles se caractérisent par de l'inflammation et des ulcérations au niveau du tube gastro-intestinal (2). Dans certains cas, il est difficile de distinguer cliniquement la MC et la CU, il est alors question de colite indéterminée.

Les pays occidentaux de l'hémisphère nord, comprenant le Canada, ont la plus grande prévalence de MII, soit le nombre total de personnes affectées. En 2018, 270 000 Canadiens étaient atteints de MII, dont 135 000 avec la MC, 120 000 avec la CU et 15 000 avec une colite indéterminée, représentant près de 7 Canadiens sur 1000. La MC touche légèrement plus les femmes que les hommes, alors que la CU les atteint au même titre (181).

1.6.1 Qualité de vie et impacts économiques

Le diagnostic des MII a souvent lieu à l'adolescence et chez les jeunes adultes (182). Ces maladies se caractérisent principalement par des répétitions de crises aiguës, séparées par des périodes de rémission qui peuvent durer des mois, voire même des années. La rémission permet souvent la guérison du tissu endommagé et le retour à une qualité de vie normale (183). L'apparition des MII tôt au cours de la vie est associée à une extension de la maladie et à un pronostic plus sévère qu'une manifestation tardive (184).

Les MII peuvent avoir de lourdes conséquences sur la qualité de vie. En effet, certains patients sont confrontés à des difficultés dans leurs activités professionnelles, à de la stigmatisation sociale, à des problèmes liés à l'intimité physique, à l'accès parfois limité aux toilettes, etc. (182). Par ailleurs, ils ont plus de risque de développer d'autres maladies comme l'ostéoporose, des maladies du foie, des thromboembolies veineuses, des maladies mentales, des cancers colorectaux, des maladies cardiaques, etc. (185, 186). Il est rare que les MII soient directement responsables du décès prématuré des patients, mais des facteurs externes peuvent diminuer l'espérance de vie (187).

À chaque année au Canada, les MII coûteraient 1,28 milliard de dollars au système de santé et elles induiraient aussi des coûts indirects de 1,29 milliard de dollars à la société. Ces frais indirects seraient, entre autres, reliés à la diminution de la productivité au travail, à la couverture invalidité, aux retraites prématurées ou aux décès (181).

1.6.2 Présentations cliniques

Colite ulcéreuse

La CU se caractérise par une inflammation et des ulcérations de la muqueuse du côlon. Elle débute souvent au niveau du rectum, avant de se répandre de façon continue dans le côlon (2). Elle se caractérise par des selles fréquentes, parfois accompagnées de sang et de mucus. Les symptômes sévères comprennent des diarrhées importantes, des crampes abdominales douloureuses, une perte de poids, la fièvre, la dénutrition, la déshydratation, etc. Il arrive que les patients présentent des hémorragies dues à des ulcérations profondes ou à une perforation de l'intestin (2, 188).

Maladie de Crohn

Les patients avec la MC peuvent présenter de l'inflammation intestinale transmurale, signifiant que les différentes couches de l'intestin peuvent être affectées. L'inflammation ne débute pas à un endroit spécifique du tube digestif et peut se répandre de façon discontinue. Dans la majorité des cas, l'iléon et/ou le côlon sont atteints et lors de situations plus rares, l'estomac, l'œsophage et la bouche le sont aussi (2).

Les patients ont des diarrhées fréquentes et ont régulièrement des douleurs abdominales. Des saignements apparaissant dans les selles peuvent provenir d'ulcères intestinaux. La MC conduit souvent à une inflammation sténosante qui est caractérisée par un rétrécissement de la lumière intestinale pouvant mener à l'obstruction. Par ailleurs, la perforation de l'intestin est une complication de la maladie qui peut causer une péritonite, des abcès ainsi que des fistules avec des organes voisins. Il arrive qu'une pullulation, soit la prolifération anormale de bactéries anaérobiques de la famille des *Enterobacteriaceae*, tel que l'*E. coli*, soit observée chez les patients atteints de MII et ceci peut nuire aux mécanismes d'absorption. (2, 188-190).

1.6.3 Traitements

À ce jour, aucun traitement n'existe pour guérir les MII. Les thérapies actuelles ont pour principaux objectifs l'élimination de l'inflammation anormale et le contrôle des symptômes. Elles interviennent dans le contrôle des épisodes aigus ou pour prévenir des récives. De plus, l'évolution des MII est variable et imprévisible, ce qui complique la prise en charge et le traitement (191). La CU et la MC requièrent des interventions similaires, avec certaines distinctions, qui seront décrites dans les sections suivantes.

Colite ulcéreuse

Les patients atteints de la CU avec des symptômes légers répondent normalement bien aux 5-Aminosalicylates (5-ASA). Ceux-ci sont des dérivés de l'aspirine et agissent comme anti-inflammatoires locaux, au niveau de la muqueuse intestinale (192). Lorsque les symptômes sont de modérés à sévères, les corticostéroïdes s'avèrent performants. Ceux-ci ne peuvent pas constituer un traitement à long terme, puisqu'ils sont associés à d'importants effets secondaires, tels que l'obésité, l'acné, l'hypertension artérielle, le faciès lunaire, etc. De plus, ils ne sont pas particulièrement efficaces dans le maintien de la rémission (193). Lorsque l'inflammation est maîtrisée, des immunosuppresseurs tels que l'azathioprine peuvent remplacer les corticostéroïdes. Ils inhibent ou préviennent l'activité du système immunitaire. Toutefois, ils prennent souvent plusieurs mois avant d'induire des effets thérapeutiques (2).

Les thérapies moléculaires ciblées qui comprennent des agents biologiques (anticorps monoclonaux), ainsi que les petites molécules ciblant les kinases JAK, sont administrées lorsque les traitements énumérés ci-dessus ne sont pas efficaces. Ils sont pertinents pour le contrôle à long terme, mais sont extrêmement dispendieux (194). Parmi ces agents, on retrouve des *anti-tumor necrosis factor* (anti-TNF) des anti-intégrines et des anti-IL-12/23 (195). Enfin, lorsqu'aucune thérapie ne fonctionne, la chirurgie est considérée. L'excision totale du côlon permet généralement d'éradiquer la CU (196).

Maladie de Crohn

Pour les patients avec la MC, les 5-ASA sont moins performants (192). Les corticostéroïdes constituent l'approche classique pendant les phases modérées à aiguës de la maladie, ainsi que pour induire la rémission. Les immunosuppresseurs peuvent prendre la relève des corticostéroïdes.

Les antibiotiques (métronidazole) sont également efficaces pour le traitement de pathologies anorectales ainsi que d'infections, tels que des abcès (2).

En remplacement des corticostéroïdes, l'alimentation entérale exclusive est un traitement de première ligne pour les enfants atteints de la MC et qui ont des symptômes de légers à modérés. Elle est axée sur la nutrition et n'inclue pas de médication. Elle comprend une diète uniquement liquide, introduite oralement ou par une sonde d'alimentation, pendant six à huit semaines. Elle aide à diminuer l'inflammation de l'intestin et conduit parfois à la rémission de la maladie. Les effets bénéfiques de l'alimentation entérale exclusive chez les enfants, ne sont généralement pas retrouvés chez l'adulte. Les mécanismes expliquant cette différence restent à être mieux compris (197).

Lorsqu'aucun traitement ne fonctionne pour la MC, la chirurgie est considérée. La partie affectée est retirée et les deux extrémités restantes sont jointes. Cette connexion est appelée une anastomose. Les risques de récurrences sur d'autres segments intestinaux sont élevés, et la plupart des patients ont besoin d'une deuxième chirurgie et parfois même d'une troisième chirurgie. De plus, la récurrence revient souvent près du site de l'anastomose. Ceci suggère que des processus microscopiques/moléculaires auraient déjà été entamés dans la partie de l'intestin qui semblait saine et qui n'avait pas été retirée. Une stomie (iléostomie ou colostomie) peut être nécessaire s'il n'y a pas d'extrémités saines pouvant être connectées. Cette chirurgie implique que l'extrémité intestinale restante soit reliée à l'abdomen et que les selles puissent être collectées dans un sac, à l'extérieur du corps (2).

1.6.4 Étiologie

Les causes responsables des MII ne sont pas clairement définies, bien qu'il existe plusieurs facteurs de risque pour leur développement. Plus précisément, elles sont des maladies complexes, pour lesquelles des mutations génétiques ont été associées comme étant des facteurs de risque, sans toutefois être suffisantes à elles seules pour causer leur développement. Ainsi, des susceptibilités génétiques additionnées de facteurs environnementaux seraient responsables de leur apparition (198).

1.6.4.1 Facteurs environnementaux

Les populations des pays occidentaux sont les plus touchées par les MII. Cependant, des immigrants ne venant pas de pays occidentaux et qui arriveraient au Canada tôt au cours de leur vie, ainsi que leurs enfants, auraient plus de chance de les développer, comparativement aux immigrants arrivés à un âge plus avancé. Ceci pourrait être expliqué par le fait que des facteurs environnementaux influencent le développement des MII chez certains groupes ethniques installés dans les pays occidentaux, pour lesquels l'incidence est faible dans leur pays d'origine (199).

Hygiène

Une hypothèse courante concernant l'hygiène est que les individus ayant grandi dans un environnement trop stérile, et ayant donc été exposés à peu de microbes, puissent développer une immunité anormale. Le système immunitaire altéré aurait alors tendance à s'attaquer aux organes, plus tard dans la vie de ces individus, lorsqu'ils rencontrent des microorganismes pathogènes (200). Ceci va de pair avec le fait que les individus ayant été élevés sur une ferme ou dans des zones rurales, ayant une plus grande famille ou ayant eu des animaux, ont moins de chance de développer les MII (201).

Mode de vie

L'activité physique préviendrait l'apparition de la MC, mais ne semblerait pas prévenir la CU (202). L'alimentation jouerait aussi un rôle important. En effet, la consommation de fibres alimentaires semblerait protectrice (203), alors qu'une déficience en vitamine D constituerait un facteur de risque pour les MII (204).

Enfin des individus qui fument la cigarette auraient moins de chance d'être atteints de la CU. À l'opposé, les personnes qui fument sont plus susceptibles d'avoir la MC et celle-ci serait associée à une évolution défavorable de la maladie (198). Cet effet apparaîtrait plus particulièrement chez les populations caucasiennes, non juives (205).

Facteurs génétiques

L'importance de la génétique dans le développement des MII a entre autres été mise en évidence par une étude réalisée chez des jumeaux. En effet, il y a une plus grande concordance de MII chez

des jumeaux homozygotes (environ 50%), comparativement à des jumeaux hétérozygotes (environ 10%) (206, 207). Par ailleurs, certaines populations sont plus à risque de développer les MII. Par exemple, les Juifs ashkénazes sont porteurs de plusieurs variants connus pour augmenter la susceptibilité au développement des MII, ainsi que d'autres variants spécifiques à leur population (208, 209). À ce jour, plus de 230 loci (régions spécifiques sur un chromosome) ont été identifiés comme étant associés aux MII. La plupart d'entre eux sont responsables à la fois de l'apparition de la MC et de la CU (210). Plusieurs de ces loci sont liés à d'autres traits ou maladies complexes, tels que le diabète de type 1, le psoriasis et la spondylarthrite ankylosante (211). Plusieurs méthodes d'analyse génétique existent pour identifier des variants responsables de traits ou de maladies.

1.6.4.1.1 Études d'association pangénomique (GWAS)

Les études d'association pangénomiques (GWAS) analysent le génome en entier et comparent des variations de séquences connues, tels que les *single-nucleotides polymorphisms* (SNPs) entre deux groupes (maladie et témoin). Ceci fait ressortir les régions du génome qui sont significativement différentes entre les cohortes. Les SNPs sont caractérisés par un changement d'un seul nucléotide à une position donnée du génome. Lorsqu'un SNP est significativement plus fréquent dans le groupe malade, il y a une association entre le locus (région chromosomique) où il est localisé et la maladie. Les GWAS permettent, entre autres, de mesurer la fréquence allélique mineure (MAF) et le rapport de cotes (OR). La MAF informe sur la rareté de l'allèle dans la population. Ainsi, un MAF situé entre 5 et 50% fait référence à un allèle très commun, un MAF entre 1 et 5% représente un allèle moins commun alors qu'un allèle inférieur à 1% est rare (212). Le rapport de cotes (OR) fait référence à l'effet génétique d'un variant et représente le rapport de la cote de la maladie chez les individus porteurs de l'allèle à risque sur la cote de la maladie chez les individus qui ne portent pas l'allèle. La cote réfère à la probabilité qu'un événement se produise sur la probabilité qu'il ne se produise pas. Bref, un OR supérieur à 1 indique que l'allèle à risque est plus fréquent chez les individus malades. Aussi, dans le cas des maladies rares, le OR se rapproche du risque relatif, soit le risque qu'un individu porteur d'un allèle à risque soit malade, comparativement à un non porteur (213).

1.6.4.1.2 Découverte de variants dans le gène IFIH1

En 2012, Jostins *et al.* ont réalisé une méta-analyse regroupant 15 GWAS et totalisant plus de 75 000 individus d'ascendance européenne. Cette étude a révélé l'existence de 163 loci associés aux MII, parmi lesquels 53% comprendraient des gènes candidats (facteurs de risque pour les MII). Ces loci peuvent également contenir plusieurs gènes et plusieurs variants (211). Un SNP associé à la fois à la CU et à la MC, dans le gène *Interferon Induced With Helicase C Domain 1 (IFIH1)* (rs2111485, MAF = 40,4%, OR = 1,07 et Pval = $1,93 \times 10^{-8}$) a été identifié. Ce variant révélé par GWAS ne constitue pas nécessairement un facteur de risque pour les maladies. Il représente plutôt un haplotype (région chromosomique pouvant contenir plusieurs allèles transmis ensemble), où il est en fort déséquilibre de liaison avec des SNPs voisins. Le déséquilibre de liaison est une mesure de corrélation et rapporte une association préférentielle et non-aléatoire entre deux allèles (214). Ainsi, le ou les SNPs qui sont en déséquilibre de liaison avec le SNP ressortis par GWAS constituent les marqueurs causals pour la maladie.

La cartographie fine ou *fine-mapping* permet de localiser, avec précision et avec une forte puissance statistique, des marqueurs (constituant des facteurs de risque) dans des régions déjà connues comme étant associées aux MII (215). En 2017, Huang *et al.* ont analysé 94 loci liés aux MII par cartographie fine à haute résolution, chez 65 852 individus d'ascendance européenne (essentiellement les mêmes individus que la cohorte analysée par Jostins *et al.*). Ils ont ressorti 45 variants, dont la mutation rs35667974 d'*IFIH1* (I923V) avec plus de 95% de certitude comme étant causale pour la CU (MAF = 2,1%, OR = 1,3, Pval = $5,5 \times 10^{-09}$) (216).

Par ailleurs, une étude de séquençage d'exome ciblé a été réalisée sur des régions préalablement associées aux MII, chez des individus d'origine européenne. L'exome fait référence à la totalité des exons du génome, soit les parties codantes pouvant être traduites en protéines. L'analyse a fait ressortir deux variants d'épissage dans *IFIH1*, associés aux MII, soit : rs35337543 (*IFIH1**IVS8+1, Splice 1, (Sp1)) (MAF = 0,9%, OR = 1,41, valeur de P (Pval) = 0,03) qui est associé à la MC et rs35732034 (*IFIH1**IVS14+1, Splice 2) (Sp2)) (MAF = 0,8%, OR = 1,44, Pval = 0,005) qui est associé à la MC et à la CU (données non publiées). Pour simplifier la lecture du texte, la nomenclature Sp1 et Sp2 sera utilisée. Cette étude a également identifié un autre variant

rare dans *IFIH1*, rs35744605 (E627X) (MAF = 0,5%, OR=1,47, Pval = 0,06) qui tend à être associé à la CU, sans que ça ne soit significatif. Or, les analyses à l'échelle du phénomène (*phenome-wide analyses*) de DeBoever *et al.* ont identifié l'allèle E627X (MAF = 0,7%, OR=1,47, Pval=0,001), ainsi que l'allèle Sp2 (MAF=0,67%, OR = 1,34, Pval = 0,004) comme étant significativement associés aux MII. Dans cette étude, les variants Sp1 et I923V n'ont pas été associés aux MII (217). La non significativité pour certains de ces variants dans le cas de ces études pourrait être due à la grande rareté de ces allèles dans la population.

1.6.4.1.3 *Structure de la protéine MDA5*

IFIH1 est situé sur le chromosome 2, à la position 2q24.2 et possède 16 exons. Sa protéine, MDA5, est localisée dans le cytoplasme (218). MDA5 possède deux domaines CARD, suivi de deux domaines hélicases séparés par le domaine *helicase-insert 2* (Hel2i) et enfin d'un domaine C-terminal. MDA5 reconnaît l'ARN viral dans les régions C-terminal et hélicases. Les hélicases ont une fonction catalytique avec une activité ATPase (219, 220). L'hydrolyse de l'ATP permet la formation d'un oligomère comprenant plusieurs protéines MDA5 qui s'associent en long filaments sur l'ARN viral. Cet ologomère se lie et se dissocie à l'ARN de façon dynamique et ceci induit un changement de conformation de MDA5, ce qui libère les domaines CARDS. Ces derniers peuvent alors interagir avec MAVS et mener à la transcription d'IFNs (tel qu'expliqué à la section 1.3.3.1.1) (122).

1.6.4.1.4 *Impacts des variants dans IFIH1 sur la structure du transcrit et de la protéine*

Le SNP I923V est une mutation faux-sens, faisant référence à une substitution d'un nucléotide. Dans ce cas-ci, l'isoleucine est remplacée par une valine à la position 923 de la protéine, dans le domaine C-terminal (216, 220). Cette isoleucine est conservée chez plusieurs espèces, tels que l'humain, le cochon, le singe, la souris et la vache, mais sa fonction demeure inconnue (221). En ce qui concerne les variants Sp1 et Sp2, ils entravent l'épissage adéquat des exons. L'épissage se définit par l'élimination des introns de l'ARNm, ce qui permet d'obtenir un produit final contenant que des exons. Le variant Sp1 résulte en une délétion de l'exon 8, sans induire de décalage de cadre de lecture. Ceci conduit à la perte de 39 acides aminés situés à la fin du domaine hélicase 1.

Le variant Sp2 se caractérise par le saut de l'exon 14, ce qui est associé à un décalage du cadre de lecture et à l'apparition d'un codon d'arrêt précoce en C-terminal. Ainsi, il cause une délétion des 153 derniers acides aminés de la protéine. Enfin, la mutation E627X se définit par un changement de nucléotide dans l'exon 10 et résulte en une protéine tronquée. La perte des 399 derniers acides aminés induit la délétion complète du domaine C-terminal, ainsi que d'une partie du domaine hélicase 2 et de l'*helicase-insert 2* (222). L'effet de ces variants sur la protéine est représenté à la Figure 3.

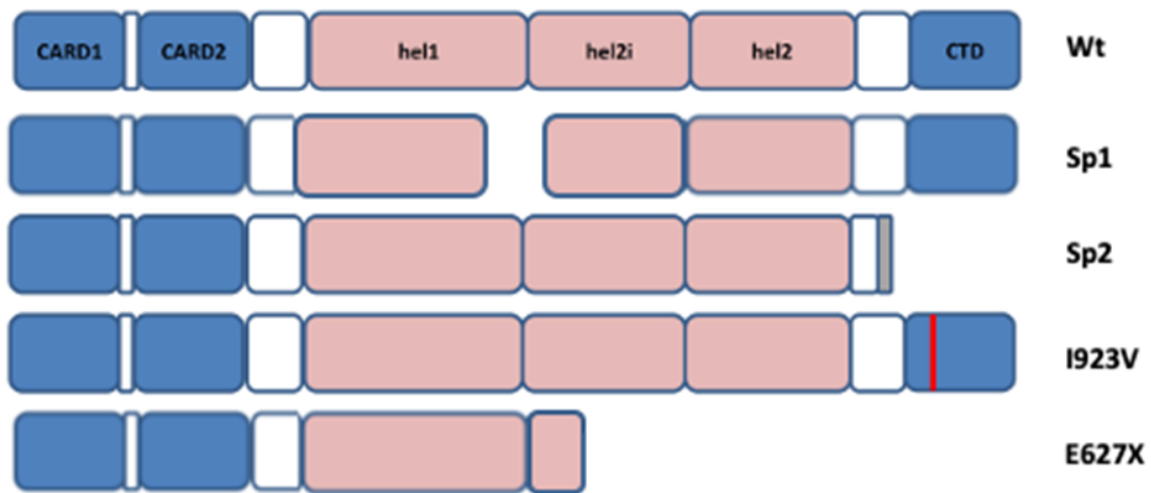


Figure 3. Impact des variants dans *IFIH1* sur la structure de la protéine.

Représentation de la protéine associée à l'allèle wt, ainsi que des allèles avec les variants Sp1 (délétion dans le domaine hélicase 1), Sp2 (délétion du domaine C-terminal), I923V (en C-terminal) et E627X (délétion des domaines hélicase 2, *helicase insert-2* et C-terminal). CARD : domaine de recrutement des caspases, hel : hélicase, hel2i : *helicase insert-2*, CTD : domaine C-terminal, Wt : wild type, Sp1 : IFIH1*IVS8+1, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

1.6.4.1.5 Variants dans *IFIH1* en conditions expérimentales

Ces quatre variants dans *IFIH1* (I923V, Sp1, Sp2 et E627X) ont déjà été associés à d'autres pathologies. En effet, ils représentent des facteurs protecteurs pour le diabète de type 1, mais augmentent la sévérité d'infections respiratoires chez les enfants (216, 222, 223).

Quelques études ont tenté de comprendre leurs effets sur l'intégrité de la protéine. De façon générale, ils sont associés à une perte de fonction, ainsi qu'à une diminution de sa capacité à induire une défense antivirale (222). D'abord, Shigemoto et son équipe ont étudié l'interaction entre MDA5 et le poly (I:C) dans des HEK293T qui surexprimaient de façon transitoire *IFIH1* wt ou les variants E627X et I923V. La surexpression de l'allèle wt aurait permis à la protéine de former un complexe avec le poly (I:C), au même titre que la protéine recombinante avec le variant I923V. Ceci est intéressant, comme cette mutation est située dans le domaine C-terminal de la protéine, suggérant alors que la mutation aurait une autre fonction que la perte de reconnaissance de l'ARN. Les auteurs ont proposé que cette isoleucine (wt) interagisse avec des protéines régulatrices, ou avec d'autres régions de MDA5, pour induire des changements de conformation. À l'opposé, aucune interaction avec le poly (I:C) n'aurait été détectée pour le variant E627X. Si la protéine n'était pas en mesure de reconnaître l'ARN, elle serait biologiquement inactive et ne pourrait pas induire la production d'IFNs (221). Une étude menée par Asgari *et al.* a fait intervenir des HEK293T, qui surexprimaient cette fois les variants Sp1, Sp2 et E627X. La surexpression d'*IFIH1* wt uniquement mènerait à l'activation du promoteur d'IFN- β , mesuré par *luciferase assay*. La co-transfection d'allèle wt avec un ou l'autre des trois variants ferait en sorte que ceux-ci interfèrent avec l'allèle wt pour qu'il produise moins d'IFN- β . Par ailleurs, dans ce modèle cellulaire, la surexpression de l'allèle wt induirait une augmentation de l'hydrolyse de l'ATP qui serait amplifiée suite à l'ajout du poly (I:C). À l'inverse, il n'y aurait pas d'activité ATPase avec la surexpression des trois variants dans *IFIH1*, et ce, même après l'ajout de poly (I:C). De plus, la co-transfection des mutants avec l'allèle wt diminuerait l'activité ATPase, par rapport à la surexpression du wt seul. Ainsi, l'effet de la co-transfection sur l'allèle wt suggère que les allèles mutants auraient un effet négatif dominant. Ceci pourrait expliquer pourquoi des patients hétérozygotes sont à risque de complications suite à une infection respiratoire virale, au même titre que des individus homozygotes. Les mécanismes associés restent à être mieux compris, mais il se pourrait que les protéines altérées interagissent avec la forme wt, en empêchant la formation normale de l'oligomère de MDA5 en filaments (222).

De manière intéressante, une étude menée en Russie a mis en lumière un lien entre les variants E627X ou I923V et la présence d'entérovirus dans le sang, dans le contexte du diabète de type 1. Ce dernier est une maladie auto-immune caractérisée par une destruction des cellules β du

pancréas. L'étude a été réalisée avec 1615 patients ayant développé le diabète de type 1 à l'enfance ou à l'adolescence, ainsi qu'avec 1330 témoins, sans maladie complexe ou systémique. Comme d'autres études l'ont démontré, une association est ressortie entre les variants E627X et I923V et l'effet protecteur pour la maladie (216, 220, 223). Aussi, des tests sanguins ont révélé une fréquence des infections à entérovirus 3,5 fois supérieure chez les sujets atteints de diabète de type 1 ($P_{\text{val}} < 1 \times 10^{-8}$). Par ailleurs, les individus ayant développé ce type de diabète moins d'un an avant l'expérience présentaient 2,1 fois plus fréquemment des infections à entérovirus que ceux atteints depuis plus longtemps (220). Cette analyse souligne ainsi l'importance de considérer les infections virales chez les patients porteurs de variants dans *IFIH1*, compte tenu du rôle de sa protéine dans la réponse antivirale.

1.7 Association microbiote-MII

Différentes études métagénomiques ont mis en évidence une altération du microbiote intestinal chez les patients atteints d'une MII (224, 225). Il n'est pas encore clair si celle-ci consiste en une cause ou en une conséquence de la maladie. Les bactéries et les virus du microbiote intestinal s'influencent mutuellement et il est suggéré qu'ils soient analysés simultanément, afin de mieux comprendre leur rôle sur la santé et les pathologies (226).

1.7.1 Déséquilibre des bactériophages

Plusieurs analyses ont fait ressortir une augmentation du nombre, mais une plus faible diversité de virus chez des patients atteints des MII, comparativement à des individus sains (225, 226). Par ailleurs, il est largement admis, qu'il y a davantage de bactériophages dans des échantillons de selles et de muqueuse intestinale de ces patients, à l'opposé de groupes témoins (224, 227-229). Les phages de l'ordre des Caudovirales comprenant les familles des *Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Potoviridae* seraient les plus abondants (224, 228).

L'équilibre dans la communauté de bactériophages est important à conserver pour éviter l'apparition de pathologies (230). En effet, l'activation de prophages latents peut mener à la lyse de bactéries commensales, à l'initiation des mécanismes inflammatoires, à la libération de

cytokines, à l'infiltration cellulaire et à l'apparition de lésions tissulaires (231). Bien que les mécanismes restent à être mieux compris dans le cas des MII, il se pourrait que l'expansion spécifique des Caudovirales chez les patients soit associée à la diminution des populations bactériennes. Les bactériophages perturberaient et modifieraient alors les composants et la diversité des communautés bactériennes au sein du microbiote, ce qui mènerait à la dysbiose. Ainsi le déséquilibre entre les microorganismes protecteurs ou nocifs, pourrait mener à des réponses immunitaires anormales et promouvoir une inflammation intestinale incontrôlée (225, 231).

Il semblerait qu'à court terme, les antibiotiques puissent affecter la densité et l'efficacité des bactériophages. Or, l'effet précis des antibiotiques sur ces derniers reste à être mieux élucidé. De manière intéressante, il a été proposé que les bactériophages agissent de favorablement pour contrecarrer le phénomène de résistance aux antibiotiques (232, 233). Compte tenu de sa capacité à s'attaquer aux bactéries, ils constituent alors une approche intéressante pour compléter ou pour servir d'alternative aux antibiotiques (232). À noter que le traitement de patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec des antirétroviraux n'aurait pas d'impact sur la diversité et la richesse des bactériophages du microbiote intestinal, comparativement à des patients atteints du VIH qui ne sont pas traités, ainsi qu'à des individus non infectés. D'autres études demeurent toutefois nécessaires pour mieux comprendre l'effet des antiviraux sur les bactériophages (234). Enfin, les stéroïdes qui peuvent jouer un rôle immunomodulateur sembleraient avoir peu d'impact sur les bactériophages, tels que le phage phiX174, un membre de la famille des *Microviridae* (235).

Une étude a mis en lumière quelques associations entre les populations de virus et de bactéries du microbiote, dans le cas des MII. Celle-ci a impliqué des analyses de métagénomique virale chez des individus britanniques et américains atteints ou non d'une MII. Par exemple, chez les Britanniques, la famille des *Bacteroidaceae* serait inversement corrélée avec les *Caudovirales* chez les patients atteints de la MC, ce qui ne serait pas le cas chez les individus sains et ceux souffrant de la CU. D'autres études demeureront nécessaires pour mieux comprendre la corrélation entre ces populations. En outre, ces découvertes pourraient permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs pour les MII et aider à la distinction entre la MC et la CU (231).

Par ailleurs, des associations entre des infections virales et le diabète de type 1 ont déjà été rapportés. Ceci est le cas pour une étude ayant impliqué la collecte mensuelle de selles d'une cohorte pédiatrique à risque de développer le diabète de type 1, à partir de la naissance jusqu'au développement d'auto-immunité. De façon générale, le virome des témoins était plus diversifié que celui des individus à risque. Aussi, il y avait un enrichissement des virus eucaryotes *Circoviridae* et une plus grande diversité et richesse du bactériophage Shannon chez les témoins, comparativement aux enfants susceptibles de développer la maladie. Ces changements dans le virome ont précédé l'auto-immunité chez les enfants à risque. Ils ont tous développé des auto-anticorps dans leur sérum et certains d'entre eux ont développé le diabète avant la publication de l'article. Ainsi, il semblerait qu'une variation du virome, y compris des bactériophages puisse moduler les bactéries et éventuellement mener à une dysbiose bactérienne. Ces changements seraient précurseurs à la maladie (236).

Dans la quête de traitements potentiels pour les MII, il a été suggéré que des approches thérapeutiques visant la reconstitution de l'homéostasie entre les bactéries et les virus du microbiote soient explorées (229). Dans un ordre d'idée similaire, l'administration d'un cocktail de bactériophages à des souris transgéniques CEABAC10 colonisées par la bactérie LF82 (un modèle de souris permettant d'étudier la MC) aurait eu pour effet de diminuer la quantité d'*Escherichia coli* *adhérent-envahissant*. Ces derniers sont anormalement prédominants dans la muqueuse de certains patients atteints de la MC. De plus, une seule dose aurait permis d'atténuer les symptômes de colite reliés au Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez ces souris (237). Une étude clinique en cours fait d'ailleurs intervenir l'administration de divers bactériophages (EcoActive) à des patients avec la MC inactive, dans le but d'attaquer des *Escherichia coli* *adhérent-envahissant* (238). Par ailleurs, Chehoud *et al.* ont mené une étude chez trois patients pédiatriques avec la CU. Ces derniers ont reçu des transplantations de microbiote fécal provenant d'un même individu adulte sain (22 à 30 traitements, entre 6 à 12 semaines). L'analyse métagénomique des échantillons du donneur et des receveurs démontre qu'une grande quantité de phages aurait été transférée. Aussi, aucun virus pathogène n'aurait été détecté (239). Les trois patients prenaient des immunosuppresseurs avant l'expérience. Ils ont eu une rémission endoscopique et histologique d'au moins deux semaines après la fin des transferts, et ont eu une période de quatre semaines sans symptôme (avec le retrait des immunosuppresseurs, mais en

poursuivant la prise de 5-ASA). Cependant, ils ont éventuellement rechuté et ont dû recommencer à prendre leurs anciens traitements (204). Il sera ainsi intéressant de mieux comprendre l'effet des traitements aux bactériophages sur l'état de santé des patients atteints des MII.

1.7.2 Virus à ARN

Les études métagénomiques qui analysent le virome se font reprocher d'uniquement prendre en compte des virus à ADN, ce qui comprend majoritairement les bactériophages, et d'ignorer les virus à ARN et les virus enveloppés. Or, plusieurs virus entériques pathogènes sont des virus à ARN (231). Pour le moment, quelques études ont fait ressortir des associations entre des virus à ARN et les MII. Par exemple, selon Zuo *et al.* la famille eucaryote Pneumoviridae serait davantage exprimée chez les patients avec la CU, alors que la famille eucaryote Anelloviridae le serait plus chez les non atteints (229). Une autre étude menée chez des patients souffrant de la MC et de la CU aurait fait ressortir que leur virome comprendrait plus de virus de la famille des Herpesviridae, par rapport à des témoins (225). Les mécanismes associés demeurent cependant incompris. De manière intéressante, l'infection intrapéritonéale de souris CD₁ avec le virus Coxsackie B (4) (entérovirus à ARN) aurait été associée à l'apparition de symptômes rappelant le diabète de type 1 (240).

Une autre hypothèse que celle du déséquilibre des bactériophages, est que l'infection par des virus à ARN, combinée à des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux pourraient mener au développement des MII (225). Une étude impliquant l'infection par un virus à ARN de souris présentant une altération dans une protéine associée à la MC (ATG16L1), démontre l'importance de considérer ce type de virus dans le cas des MII. En effet, les souris Atg16L1^{HM} présentent une fonction diminuée de la protéine qui joue un rôle dans les cellules de Paneth et dans l'autophagie (241). Il s'agit d'un modèle intéressant, puisque des patients atteints de la MC et qui sont porteurs de l'allèle à risque de *ATG16L1* ont des anomalies similaires à ces souris, en ce qui concerne les cellules de Paneth (242, 243). L'infection de ces souris par du norovirus murin mènerait à des dommages intestinaux. Par ailleurs, l'ajout de DSS dans l'eau de ces souris infectées induirait des pathologies dans le côlon, ainsi qu'un grossissement des villosités de l'iléon, ce qui donnerait l'apparence de la MC. Les molécules TNF α et IFN γ interviendraient dans ces processus,

étant donné que la neutralisation de ces deux cytokines préviendrait les atteintes anormales à l'intestin. D'ailleurs, le microbiote commensal semblerait important dans l'apparition des effets pathologiques, puisque le traitement des souris avec des antibiotiques à large spectre aurait également eu pour effet d'éviter la détérioration de l'intestin, suite à la présence du norovirus (243). Malgré le fait que, dans certains cas, le norovirus entérique puisse offrir des effets protecteurs chez l'hôte et lui éviter des blessures, de l'inflammation et des infections intestinales bactériennes, il semblerait qu'il puisse devenir nuisible chez certains hôtes vulnérables (243, 244). Enfin, ceci témoigne que plusieurs facteurs tels que le virome, la génétique, des agents toxiques, peuvent intervenir ensemble dans la pathologie des MII (243).

Le perfectionnement dans la découverte de virus associés aux MII pourrait permettre l'identification de biomarqueurs pour le dépistage précoce des MII. De plus, ces biomarqueurs permettraient peut-être d'intervenir à temps pour prévenir leur apparition. Des médicaments antiviraux spécifiques pourraient aussi être développés, afin de traiter les patients malades.

1.8 Modèles cellulaires dérivés de cellules de patients

Les cellules intestinales dérivées de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs) permettent la modélisation des maladies intestinales. Les hiPSCs peuvent être générées directement à partir de cellules somatiques adultes et ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires (245). Cette technologie permet d'obtenir des cellules possédant l'information génétique complète d'un individu et elle est avantageuse pour les thérapies personnalisées. Elle offre également de multiples possibilités tels que la réparation de tissus, la synthèse d'organes, le développement de médicaments, ainsi que la découverte de nouveaux biomarqueurs (246). Dans le cadre de ce projet de maîtrise, des lymphocytes B provenant de patients atteints de MII et porteurs des variants dans *IFIH1* et de témoins ont été immortalisés pour produire des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) qui ont été reprogrammées en hiPSCs. Ces dernières ont par la suite été différenciées en sphéroïdes/organoïdes intestinaux.

1.8.1 Les cellules lymphoblastoïdes

Les LCLs sont produites *in vitro*, suite à l'infection de lymphocytes B provenant du sang périphérique, avec le virus Epstein-Barr (EBV), ce qui a pour effet de les immortaliser (247). Le génome de l'EBV peut être maintenu en réplicon extrachromosomique. Il est également en mesure d'utiliser la machinerie de réplication d'ADN de la cellule pour sa propre réplication (248). La présence d'EBV dans les LCLs est associée à l'expression de gènes latents qui interviennent dans la prolifération et la survie *in vitro* (247).

Les LCLs représentent un modèle de choix pour l'entreposage du matériel génétique de patients, comme elles sont en mesure de produire une grande quantité d'ADN et de biomolécules, et ce, de façon illimitée. Elles ont un phénotype semblable aux lymphocytes B et certaines études soulignent qu'elles peuvent activer des voies métaboliques spécifiques aux individus dont elles dérivent, ce qui les rend pertinentes pour les études fonctionnelles et moléculaires. Toutefois, compte tenu des modifications génétiques pouvant être induites par le virus, il se pourrait que les LCLs aient des fonctions biologiques distinctes des cellules d'origine (249).

Les LCLs à bas passages sont à favoriser pour des tests expérimentaux, comme elles présentent peu de modifications du génome et une bonne stabilité (250, 251). En effet, la culture prolongée des LCLs a été associée à l'introduction de nouvelles mutations. Celles-ci peuvent résulter en des changements de structure et en des altérations au niveau de la méthylation de l'ADN (251-254). Des études ont cependant rapporté une grande concordance (> 99%) en ce qui concerne la séquence du génome de cellules B du sang périphérique et de LCLs à bas passage (moins de 20 passages), comparativement à des cellules gardées en culture plus longtemps (plus de 50 passages) (251).

1.8.2 Les cellules souches pluripotentes induites humaines

Les hiPSCs sont des cellules reprogrammées à partir de cellules somatiques. Elles ont le même potentiel de prolifération illimitée et de multidifférenciation que les cellules souches embryonnaires (CSEs) (255). Les hiPSCs présentent un avantage, en ce qui concerne l'éthique,

comme elles dérivent de cellules offertes par un adulte consentant, à l'opposé des CSEs qui dérivent d'embryons humains. Par ailleurs, les hiPSCs peuvent provenir de patients, ce qui les rend intéressantes pour modéliser la maladie *in vitro*.

Différentes méthodes existent pour reprogrammer les LCLs en hiPSCs. La reprogrammation par vecteur épisomal en représente une et elle se caractérise par l'introduction, dans les LCLs, de plasmides contenant différents facteurs de reprogrammation, tels que *octamer-binding transcription factor 3/4* (OCT3/4), *SRY-related HMG-box gene 2* (SOX2), *Kruppel-like factor 4* (KLF4), *L-Myc Proto-Oncogene Protein* (L-MYC) et *Lin-28 homolog A* (LIN28) (256, 257). Ces derniers induisent à leur tour l'expression de certains facteurs de transcription cellulaires, qui permettent de coordonner l'expression de plusieurs gènes uniques aux cellules souches. Ils permettent ainsi aux cellules de se différencier en tous les types cellulaires. Après plusieurs jours en culture dans des milieux de culture spécifiques à la reprogrammation, les cellules perdent les marqueurs propres aux LCLs, afin d'exprimer des marqueurs uniques aux cellules souches. À ce moment, les hiPSCs doivent être caractérisées afin de valider leur pouvoir de pluripotence, ainsi que leur capacité à former les trois feuillets embryonnaires (257).

Des variations génétiques ou épigénétiques peuvent être produites *de novo*, lors du processus de reprogrammation. Elles peuvent également s'introduire lorsque la culture est prolongée. La plupart de ces variations n'ont pas de conséquence sur la fonction des hiPSCs. Cependant, certains variants pourraient être associés à un phénotype inattendu ou à la disparition de phénotypes attendus liés à la maladie, chez les cellules différenciées. Il est alors important de veiller à ce que l'intégrité du génome et de l'épigénome soient maintenues, avant de les différencier en cellules somatiques (255, 257).

1.8.3 Les sphéroïdes/organoïdes intestinaux

Lors du développement d'embryons humains, trois couches germinales se forment, soient l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Certains organes internes, tel que l'intestin, dérivent de l'endoderme. Ainsi, la première étape pour former des organoïdes intestinaux à partir d'hiPSCs, est d'induire la transformation en endoderme définitif. Par la suite, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et l'exposition au facteur de croissance des fibroblastes 4 (FGF4) permettent l'expression

de gènes signatures de l'intestin moyen et postérieur, c'est-à-dire, du duodénum jusqu'au côlon (258). Au cours de cette étape, les cellules peuvent proliférer et se différencier en divers types de cellules intestinales. Elles sont cultivées avec des facteurs de croissance pro-intestinaux, dans une goutte de Matrigel, une matrice composée de protéines gélatineuses. Les cellules se développent alors sous forme de sphéroïdes tridimensionnels (259, 260).

Les sphéroïdes peuvent contenir les différentes CEIs, sans nécessairement présenter de structure définie. Lors d'une culture prolongée (1 à 3 mois), les sphéroïdes se développent en organoïdes. Ces derniers sont organisés en cryptes et villosités, au même titre que l'intestin. De plus, les CEIs sont entourées de mésenchyme (myofibroblastes et cellules musculaires lisses), qui joue un rôle de soutien, ainsi que dans le développement et l'organisation de l'intestin (260-262).

1.8.3.1 Les sphéroïdes/organoïdes intestinaux pour l'étude des MII

Les organoïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs ont plusieurs avantages par rapport aux lignées de CEIs immortalisées dérivées de cancer (ex. Caco-2, HT-29). D'abord, ils présentent des caractéristiques *in vivo* de l'intestin (tel que mentionné dans la section précédente), ce qui fait en sorte qu'ils se rapprochent plus fidèlement de la physiologie humaine. Par ailleurs, les lignées de CEIs commerciales ne reproduisent pas la diversité cellulaire de l'épithélium intestinal, à l'opposé des cellules dérivées d'hiPSCs qui ont la capacité de produire tous les types de CEIs. De plus, ce modèle permet de retrouver la communication intercellulaire qui est retrouvée chez l'humain, tel que la sécrétion de cytokines, qui permet la communication paracrine (261). Enfin, les cellules cancéreuses sont connues pour présenter de l'aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes), ce qui constitue un désavantage important pour les études génétiques voulant comparer différents génotypes (263). Afin de se rapprocher de la pathophysiologie, des modèles de co-culture sont intéressants, par exemple, avec l'interaction d'organoïdes et de microorganismes du microbiote intestinal (264, 265). Enfin, ce modèle cellulaire est avantageux pour mettre en valeur et mieux comprendre les perturbations de l'intestin et l'inflammation chronique associées aux MII.

Chapitre 2 - Hypothèses et objectifs

Les MII sont des maladies complexes qui peuvent dépendre de la génétique, ainsi que de divers facteurs environnementaux. Quatre variants dans *IFIH1* (I923V, E627X, *IFIH1*IVS8+1* (Sp1) et *IFIH1*IVS14+1* (Sp2)) ont été associés comme étant des facteurs de risque pour le développement des MII. MDA5, la protéine codée par *IFIH1* joue un rôle de récepteur intracellulaire pour certains virus à ARNdb.

Ces quatre variants sont protecteurs pour le diabète de type 1, mais seraient liés à l'aggravation de symptômes respiratoires suite à des infections virales chez de jeunes enfants. De plus, ils sont associés à une perte de fonction de la protéine, ainsi qu'à une diminution de la capacité à induire une réponse antivirale. Nous avons émis l'hypothèse que ces variants dans *IFIH1* diminueraient la réponse de défense antivirale de l'épithélium intestinal, suite à certaines infections virales, dans le cas des MII. Dans de telles conditions, on assisterait à une plus faible production de molécules induites par MDA5, tels que les IFNs de types I et III. Ainsi, suite à l'exposition à des virus pathogènes présents dans le microbiote intestinal, la barrière épithéliale intestinale pourrait être susceptible de perdre son étanchéité. L'épithélium intestinal altéré induirait un déséquilibre qui nuirait à l'équilibre des fonctions biologiques et mènerait à une réponse immunitaire inadéquate. Ceci pourrait alors constituer un élément déclencheur pour l'inflammation chronique associée aux MII.

À l'aide de LCLs, ainsi que de CEIs dérivées d'hiPSCs, ayant pour origine des lymphocytes B dérivés de patients atteints de MII et qui sont homozygote ou hétérozygotes composés pour les différents variants dans *IFIH1*, ou de témoins qui ne sont pas porteurs de ces variants, nous avons comme objectifs :

- De caractériser l'impact des variants dans *IFIH1* sur la structure et le niveau d'expression du transcrit (*IFIH1*) et de la protéine (MDA5).
- De confirmer que toutes les lignées exprimaient les gènes nécessaires aux mécanismes des IFNs, au niveau basal, pour témoigner de leur capacité à induire une réponse antivirale.
- De valider la fonction de MDA5 dans la défense antivirale.
- De déterminer l'impact des mutations d'*IFIH1* dans la défense antivirale.

Chapitre 3 - Matériel et méthodes

* La reprogrammation des LCLs en hiPSCs, la différenciation des hiPSCs en sphéroïdes intestinaux, ainsi que la caractérisation des hiPSCs (sections 3.1.3 à 3.1.5.1 et annexes) ont été réalisées par Marie-Ève Rivard et Jean Paquette, des membres du laboratoire du Dr. Rioux.

3.1 Lignées cellulaires et milieux de culture

3.1.1 L929 et Caco-2

Les cellules L929 ont été généreusement offertes par le laboratoire du Dr Guy Lemay (Université de Montréal). Elles ont été cultivées dans du milieu *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM) (Cedarlane) avec 5% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS) (Sigma), 1% de L-glutamine (Wisent) et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (Wisent), ce qui constituait le milieu complet. Les cellules Caco-2 provenaient de la compagnie ATCC et elles ont été cultivées dans du milieu EMEM complémenté par 20% de FBS et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine. Toutes les cellules ont été maintenues dans un incubateur réglé à 37°C, avec 5% de CO₂.

3.1.2 LCLs

Les LCLs dérivées d'individus porteurs d'allèles wt ou mutants pour *IFIH1* (Tableau 1), provenaient de la biobanque du National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) du IBD Genetics Consortium (IBDGC) qui regroupe 6 centres Nord-Américains collectant du matériel génétique, ainsi que des informations phénotypiques sur des patients atteints de MII et d'autres individus non atteints (informations sur les patients dans le Tableau supplémentaire 1). Le projet a été approuvé par le Comité d'éthique de la recherche et du développement des nouvelles technologies (CERFNT) de l'Institut de Cardiologie de Montréal et le consentement éclairé de tous les participants a été obtenu.

Les LCLs ont été cultivées dans des flacons de culture cellulaire T25 (Corning) en position verticale, dans 15 mL de milieu RPMI 1640-GlutaMAX (Thermo Fisher) complété avec 20% de

FBS et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (RPMI complet). La concentration des LCLs était maintenue entre 2×10^5 et 1×10^6 cellules/mL. Les cellules étaient incubées à 37°C, avec 5% de CO₂.

Tableau 1. Génotype *IFIH1* des différentes lignées de LCLs provenant de la biobanque NIDDK.

Lignée NIDDK	Génotype <i>IFIH1</i>
K89368	Sp2/E627X
K75975	Sp1/I923V
K96276	Sp2/Sp2
K74786	Sp1/Sp2
K00096	I923V/I923V
K02201	Wt
K30281	Wt
K83994	Wt
K14797	Wt
K17945	Wt

Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1, Wt : wild type.

3.1.3 Reprogrammation des LCLs en hiPSCs

La reprogrammation des 10 LCLs en hiPSCs a été basée sur le protocole de Kumar *et al.* (257). Au jour 1, environ 1×10^6 LCLs ont été nucléofectées avec 2,5 µg de mélange, à quantité égale, de plasmides épisomiques de la compagnie Addgene (pCE-hOCT3/4 (#41813), pCE-hSK (#41814), pCE-hUL (#41855), et le pCE-mp53DD (#41856)) qui codent pour les facteurs de reprogrammation OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, ainsi que le *mouse p53 carboxy-terminal dominant-negative fragment (mouse p53DD)* (inhibiteur d'apoptose). La nucléofection a été faite avec le *Amaya® Human Monocyte Nucleofector® Kit* (Lonza) et le *Nucleofector® II Device*, selon le protocole du fabricant. Du milieu RPMI complet a été ajouté aux cellules qui ont été incubées entre 8 à 12 heures, à 37°C et avec 5% de CO₂. Ensuite, elles ont été transférées dans une plaque 6 puits recouverte de Matrigel, dans du milieu *TeSR™-E7 xeno-free reprogramming* (STEMCELL Technologies). Aux jours 3 et 5, 0,5 mL de milieu TeSR™-E7 a été ajouté à chaque puits et aux jours 7 et 9, le milieu a été remplacé par 1 mL de TeSR™-E7. Au jour 11, le milieu a

été remplacé par 2 mL de TeSR™-E7. Les colonies ont commencé à apparaître entre les jours 13 et 15, puis le milieu a été changé pour le milieu de maintien des hiPSCs, soit le mTeSR™-1 (STEMCELL Technologies). À partir de ce moment, il a été changé quotidiennement. Après 20-22 jours, les cellules ont été marquées avec un anticorps spécifique aux cellules pluripotentes, le Tra-1-81 (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant. Les photos ont été prises à l'aide du microscope Nikon Eclipse Ti-S (Figure supplémentaire 1). Quatre colonies positives pour ce marqueur ont été collectées et les cellules ont été cultivées jusqu'au passage 5. À ce moment, l'ADN génomique a été extrait pour valider l'absence de l'intégration des plasmides et des clones unicellulaires ont été formés.

L'absence d'intégration des plasmides épisomiques dans les cellules a été validée par électrophorèse sur gel d'agarose de produits de réaction de polymérisation en chaîne (PCR). De plus, le potentiel de pluripotence a été démontré par PCR quantitative (qPCR), pour des facteurs de reprogrammation (*Nanog Homeobox* (NANOG), SOX2 et OCT4). Aussi, les hiPSCs ont été différenciées en feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) à l'aide de la trousse *Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit* (R&D system), selon les instructions du fabricant. Afin de valider la capacité des cellules à former les 3 feuillets, la proportion de cellules positives pour des marqueurs spécifiques (OTX2 (ectoderme), Brachyury (mésoderme), SOX17 (endoderme)) a été évaluée par immunofluorescence. Enfin, l'absence d'aberrations chromosomiques a été confirmée par caryotype et les variants dans *IFIH1* ont été séquencés. Les méthodes et les résultats associés à la caractérisation des hiPSCs sont présentés dans l'annexe.

3.1.4 Différenciation des hiPSCs en endoderme définitif

Tout d'abord, une première différenciation permettant la formation de l'endoderme définitif à partir des hiPSCs a été faite grâce au *StemDiff Definitive Endoderm Differentiation Kit* (SemCell Technologies), selon le manuel du fabricant (méthode 2D). Les lignées wt K17945 et Sp2/E627X ont été différenciées par cette méthode. Afin de valider l'efficacité de la différenciation (pour la méthode 2D), la perte des marqueurs de pluripotence (*POU Class 5 Homeobox 1* (POU5F1) et

NANOG), ainsi que le gain des marqueurs d'endoderme (SOX17, OTX2 et *C-X-C chemokine receptor type 4* (CXCR4)) ont été analysés par qPCR (Figure supplémentaire 7).

En deuxième lieu, une deuxième différenciation permettant d'obtenir un meilleur taux de conversion de hiPSCs en sphéroïdes intestinaux a été faite à partir des corps embryonnaires des hiPSCs (méthode 3D), selon le protocole de Corning (266). Les corps embryonnaires sont caractérisés par des amas de cellules qui constituent les trois feuillets et qui sont formés naturellement. Les lignées wt K83994, wt K14797, wt K02201, wt K30281, Sp2/Sp2, Sp2/E627X, Sp1/I923V, Sp1/Sp2 et I923V/I923V ont été différenciées par cette méthode. Plus spécifiquement, 2000 cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à fonds ronds, sans adhérence (Corning 7007, VWR). 24 heures plus tard, la différenciation en endoderme définitif a été induite, selon le même protocole que la méthode 2D, en ajustant le volume à 100 µl par puits. Toutes les cellules ont été maintenues dans un incubateur à 37°C et avec 5% de CO₂. Nous n'avons pas analysé la perte des marqueurs de pluripotences et les marqueurs d'endoderme pour cette différenciation, car tous les corps embryonnaires ont été utilisés pour poursuivre la différenciation en sphéroïdes.

3.1.5 Différenciation de l'endoderme définitif en sphéroïdes/organoïdes intestinaux

Basé sur le protocole de Tamminen *et al.* (259), l'endoderme définitif a été différencié en cellules de l'intestin moyen et postérieur (pour les protocoles 2D et 3D). Brièvement, la méthode fait intervenir la signalisation de la voie Wnt/ β -caténine et l'exposition au FGF4, qui permettent l'expression de gènes signatures de l'intestin.

Les cellules ont été cultivées pendant 9 jours dans une plaque 12 puits (Corning #35-3043) (protocole 2D) ou 9 jours dans une plaque 96 puits (protocole 3D), afin d'obtenir des sphéroïdes qui ont ensuite été transférés dans une goutte de Matrigel alimentée par 500 µl (protocole 2D) ou 100 µl (protocole 3D) de milieu de croissance intestinal (IGM), tel que décrit dans Takahashi *et al.* (267). Ce milieu était remplacé aux 2-3 jours, pendant 14 jours. Les cellules ont par la suite été passées dix fois (protocole 2D) ou trois fois (protocole 3D) dans une aiguille 26G (Insulin seringues BD329652, VWR) et maintenues dans du milieu de culture organoïde humain (HOCM) (tiré du même article) (267). Les sphéroïdes ont une capacité d'autorenouveau et après quelques

semaines en culture, ils contiennent les principaux types de cellules intestinales spécialisées. Ces différentes étapes sont illustrées à la Figure 4 (268).

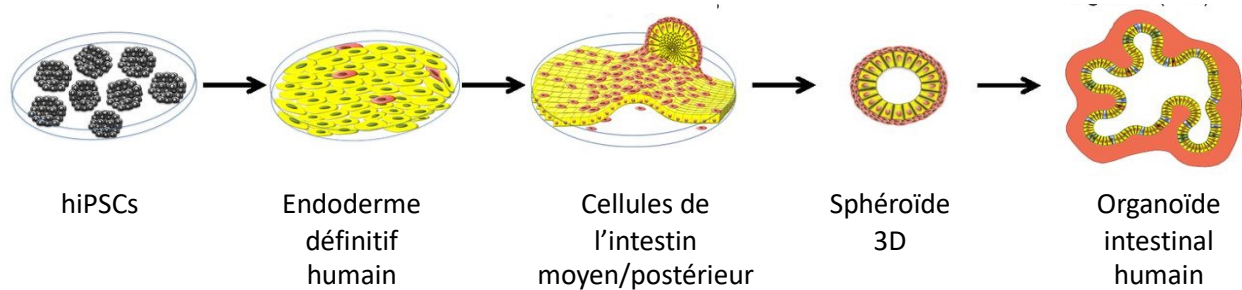


Figure 4. Les différentes étapes de différenciation pour obtenir des organoïdes intestinaux humains, à partir d'hiPSCs.

Les hiPSCs sont reprogrammés en endoderme définitif humain, puis différenciés en cellules de l'intestin moyen/postérieur. Ces dernières forment éventuellement des sphéroïdes tridimensionnels, puis des organoïdes intestinaux. hiPSCs : human induced Pluripotent Stem Cells. Adaptée de Wells *et al.* (268).

3.1.5.1 Dissociation des sphéroïdes et culture en monocouche

Afin de faciliter les tests expérimentaux, les sphéroïdes ont été dissociés pour former des monocouches de CEIs. Celles-ci ont été cultivées sur des chambres *Transwell PTFE collagen coated* (Corning) ou dans des plaques multipuits (Corning (24 puits), VWR (12 puits)). Le collagène de type 1 (Millipore) dilué à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS pH 7,2 a été ajouté aux puits des plaques multipuits, afin de recouvrir leur surface, suivi d'une incubation de 10-30 minutes à température ambiante. Tel que décrit dans l'article de Takahashi *et al.* (267), les sphéroïdes ont été dissociés suite à 10 passages dans une aiguille 29G (Insulin syringes CA10799-006, VWR) suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 450 xg. Pour les chambres Transwell, $1-2 \times 10^5$ cellules ont été resuspendues dans 100 μL de milieu HOCM, avant qu'elles soient ajoutées sur la membrane de la chambre Transwell, du côté apical. Pour les plaques 12 puits et 24 puits, 6×10^5 cellules et 3×10^5 cellules étaient ajoutés par puits, respectivement. Le milieu de culture (HOCM) était remplacé aux 2-4 jours.

3.2 Mesure de la résistance électrique transépithéliale

Les CEIs ont été cultivées pendant une vingtaine de jours sur les chambres Transwell, afin d'obtenir un épithélium étanche et polarisé. La TEER a été mesurée avec l'appareil *Epithelial Voltohmmeter (EVOM²)* (World Precision Instruments), 2 fois par semaine au début des cultures, puis aux 2 jours (à partir du moment où les cellules étaient plus confluentes et que le milieu HOCCM s'épuisait plus rapidement et devenait plus acide (à ce moment, le rouge phénol devenait jaunâtre)). La résistance (Ω) a été multipliée par la surface de la chambre Transwell pour obtenir une valeur de résistance ($\Omega \cdot \text{cm}^2$). Lorsque la valeur de TEER était stable pour 3 lectures consécutives, l'épithélium intestinal pouvait être infecté par l'EMCV.

3.3 Production et titrage d'EMCV

Pour la propagation du virus, 4×10^6 cellules L929 ont étéensemencées dans un Pétris 10 cm. Elles ont d'abord été lavées 1 fois au DPBS (Thermo Fisher), avant d'être infectées par l'EMCV (M-variant) (VR-1479, ATCC) avec une multiplicité d'infection (MOI) de 5, ce qui représente le nombre d'unités de virus par cellule. Le virus a été dilué dans du EMEM avec 1% de L-glutamine. Les cellules ont été incubées avec le virus 1 heure à 37°C, puis 5 mL de milieu complet a été ajouté. Après 24 heures, le Pétris a été directement congelé à -80°C et a subi 3 cycles de congélation-décongélation, avant d'effectuer la titration.

Le virus a été titré par la technique DICT50 (dose infectieuse 50% en culture de tissus). Pour chaque puits d'une plaque 96 puits (Cell-BIND, Corning), 30 000 cellules L929 ont étéensemencées, puis 24 heures plus tard, des dilutions en séries (1:10) faites à partir de la production de virus, commençant à 10^{-3} et allant jusqu'à 10^{-9} ont été préparées dans du milieu EMEM avec 1% L-glutamine. 50 μl de ces dilutions ont été ajoutés aux cellules (n=12 puits par dilution). Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 7 jours, ce qui a permis d'observer au microscope un effet cytopathique pour tous les puits infectés. Afin de faciliter la visualisation des cellules lysées, elles ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% (Fisher) pendant 1 heure à température pièce, puis les cellules vivantes ont été colorées par du bleu de méthylène 1% avec 90% de méthanol et 10% de

NaCl 1.5M (offert par le laboratoire du Dr Guy Lemay, Université de Montréal) pendant 1 heure. Chaque puits a ensuite été lavé à l'eau 3 fois et la plaque a séché pendant la nuit. Du HCl 0,1 N a été ajouté, facilitant la visualisation des puits contenant des cellules lysées (puits d'une couleur plus pâles, car sous sa forme réduite, le bleu de méthylène devient incolore, alors que sous sa forme oxydée, il est bleu). Pour déterminer le titre, il faut d'abord identifier les deux dilutions qui chevauchent le point où il y a 50% des cellules lysées (dégénérescence) dans le puits. Ensuite le pourcentage de puits avec de la dégénérescence pour ces deux dilutions identifiées doit être déterminé. Ces pourcentages permettent alors de calculer :

$$\frac{\% \text{ dégénérescence à la dilution causant plus de 50\% de dégénérescence}}{50\%}$$

$$\frac{\% \text{ dégénérescence à la dilution causant plus de 50\% de dégénérescence}}{\% \text{ dégénérescence à la dilution causant moins de 50\% de dégénérescence}}$$

Comme le titre correspond au DICT50/mL, la valeur obtenue par le calcul ci-haut doit être multipliée par le facteur permettant de la rapporter sur 1 mL (ex. s'il y a 50 µl de dilution par puits, il faut multiplier par 20). Basé sur une loi de Poisson, ce résultat est ensuite ajouté à l'inverse de la dilution qui représente un pourcentage supérieur à 50% de dégénérescence, ce qui donne le titre final. Par exemple, si le résultat du calcul est de 0,4 et que la dilution à considérer est de 10^{-8} , le titre serait $10^{8,4}$ DICT50/mL.

3.4 Infection avec l'EMCV

Pour l'infection des LCLs, 1 million de cellules a été centrifugé (244 xg, 5 minutes) dans des tubes 1,5 mL. Les surnageants ont été jetés et les culots de cellules ont été lavés une fois au DPBS calcium, magnésium (Thermo Fisher). Ces derniers ont par la suite été resuspendus dans du virus dilué dans le DPBS calcium, magnésium (MOI de 1). Ceux-ci ont été incubés à 37°C et ont été remués à chaque 15 minutes, pendant 1 heure. Par la suite, une centrifugation de 5 minutes à 244 xg a permis d'obtenir les culots de cellules qui ont été lavés 3 fois avec du DPBS calcium, magnésium. Les cellules infectées ont été transférées dans les flacons de culture cellulaire T25 et

maintenues dans leur milieu de culture habituel pendant 24 heures, avant d'être récoltées dans 200 μ L de RLT (pour extraction d'ARN).

Les monocouches de CEIs dérivées d'hiPSCs et les Caco-2 ont été infectés dans des plaques 24 puits (sur plastique) (confluence 95-100%). Les cellules ont été rincées au DPBS calcium, magnésium, puis l'EMCV a été ajouté (MOI de 1 ou 5 pour les CEIs, MOI de 2 pour les Caco-2), et incubées pendant 1 heure à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées 1 fois avec du DPBS calcium, magnésium (pour les CEIs) et au DPBS (pour les Caco-2), avant d'être cultivées dans le milieu complet respectif des cellules, pendant 24 heures. Les cellules ont été collectées dans 300 μ L de TRizol et congelées à -80°C (pour l'extraction d'ARN).

Les CEIs dérivées d'hiPSCs formant un épithélium étanche sur chambre Transwel et ayant une TEER stable ont d'abord été rincées avec du DPBS calcium, magnésium. Ensuite, l'EMCV (MOI de 5) a été ajouté du côté apical de la chambre, alors que du milieu HOCM sans hormone a été ajouté du côté basal. Les cellules ont été incubées avec le virus pendant 1 heure à 37°C, puis elles ont subi 1 lavage avec DPBS calcium, magnésium avant que du milieu HOCM complet soit ajouté du côté apical et basal. À 24 heures, les cellules ont été collectées avec 200 μ L de TRizol (Invitrogen), et congelés à -80°C (pour l'extraction d'ARN).

3.5 Nucléofection / Transfection avec le poly (I:C)

En ce qui concerne les LCLs, 1,5 μ g de *poly (I:C) HMW Vaccigrade* (InvivoGen, Vac-Pic) a été ajouté à 1×10^6 de cellules par nucléofection. Ceci a été fait avec le *Amaza® Human Monocyte Nucleofector® Kit* (Lonza) et le *Nucleofector® II Device*, selon le protocole du manufacturier. Les LCLs ont été incubées 1 heure et demie avec le poly (I:C), avant la lyse des cellules pour la collecte d'ARN.

Les monocouches de CEIs dérivées d'hiPSCs cultivées dans des plaques 24 puits (confluence d'environ 70%) ont été soumises à une transfection transitoire avec 1 μ g poly (I:C), 2,5 μ L de

Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Thermo Fisher) et 22,5 µL d'Opti-MEM (Thermo Fisher), pendant 1 heure 30, 3 heures ou 6 heures, en suivant les recommandations du fabricant.

3.6 Extraction et dosage d'ARN

La lyse des CACO-2 et des LCLs pour l'extraction d'ARN a été faite avec 200 µL de tampon *RLT* contenant 10% de β-mercaptoéthanol (Invitrogen), puis le lysat a été homogénéisé dans une colonne *QIAshredder* (Qiagen) et centrifugé à 21 000 xg pendant 15 secondes. L'extraction d'ARN s'est fait grâce au *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), selon le protocole du fabricant. L'étape du protocole incluant normalement l'ajout de 700 µL de RW1 a été remplacée par l'ajout de 350 µL de RW1, suivi d'une centrifugation de 15 secondes à 21 000 xg, puis d'une incubation de 15 minutes avec 30U de DNase (Qiagen), à température ambiante. Par la suite, 350 µL de RW1 a été ajouté sur la membrane puis la colonne a été centrifugée (15 secondes à 21 000 xg). Enfin, le reste du protocole s'est effectué selon les recommandations du fabricant.

La lyse des CEIs dérivées d'hiPSCs a été faite avec 200 ou 300 µL TRIzol additionné de chloroforme (Sigma) (1:5), suivi d'une incubation de 5 minutes à température pièce et d'une centrifugation de 12 000 xg, à 4°C, pendant 15 minutes. La phase supérieure aqueuse a été transférée dans un nouveau tube et un volume égal d'éthanol 70% a été ajouté. Le mélange a été transféré dans une colonne *RNeasy MiniElute spin column* du *RNeasy Micro Kit* (Qiagen), puis l'extraction d'ARN s'est effectuée selon le protocole du fabricant.

Enfin, la concentration d'ARN et la pureté (absorbance 260/280) ont été mesurées avec l'appareil Nanodrop2000 (Thermo Fisher). L'ARN a été conservé à -80°C.

3.7 Transcription inverse

La transcription inverse s'est effectuée à partir de 1 µg d'ARN et de la trousse *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher) et l'appareil *Eppendorf MasterCycler 5345 EP*

Gradient PCR Thermal Cycler, selon les recommandations du fabricant. L'ADNc a été conservé à -20°C.

3.8 PCR quantitative (qPCR)

Le qPCR a été fait à partir de 2 ng d'ADNc, ainsi que 10 µM d'amorces sens et 10 µM d'amorces anti-sens. L'ADNc a été amplifié avec le réactif *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher). L'amplification a été générée et contrôlée par l'appareil *Quant Studio Real-Time PCR et le logiciel associé V1.3*. Le programme utilisé correspondait à 2 minutes à 50°C, 2 minutes à 90°C, suivi de 40 cycles de 15 secondes à 95 °C, 30 secondes à 55°C et 1 minute à 72°C, puis finalement 15 secondes à 95 °C, 1 minute à 55 °C et 15 secondes à 95 °C. Les données d'expressions relatives ont été normalisées par rapport à un gène rapporteur, *HPRT* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*). Les amorces utilisées sont représentées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Liste des amorces de qPCR.

Gène	Espèce	Amorces	Séquence 5' - 3'
<i>HPRT1</i>	<i>H. sapiens</i>	HPRT-01-sens	TGG CGT CGT GAT TAG TGA TG
		HPRT-01-anti	CAG AGG GCT ACA ATG TGA TGG
<i>EMCV 2A/2B</i>	<i>H. sapiens</i>	EMCV-2A-2B-sens	AAT GCC CAC TAC GCT GGT
		EMCV-2A-2B-antisens	GTC GTT CGG CAG TAG GGT
<i>IFN-β</i>	<i>H. sapiens</i>	FH1_IFNB1	ATT CTA ACT GCA ACC TTT CG
		RH1_IFNB1	GTT GTA GCT CAT GGA AAG AG
<i>IFIH1</i>	<i>H. sapiens</i>	FH1_IFIH1	GAT TAA GTG GTG ATA CCC AAC
		RH1_IFIH1	GTC TGA CAA TTG AAC ACC AG
<i>CDX2</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-qPCR-CDX2-01 sens	GGA ACC TGT GCG AGT GGA T
		Hum-qPCR-CDX2-02 antisens	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
<i>VIM</i>	<i>H. sapiens</i>	FH1_VIM	GGA AAC TAA TCT GGA TTC ACT C
		FH1_VIM	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
<i>LYZ</i>	<i>H. sapiens</i>	FH1_LYZ	AGC TAC AAA CTA CAA TGC TG
		RH1_LYZ	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
<i>CHGA</i>	<i>H. sapiens</i>	FH1_CHGA	GAA TAA AGG GGA TAC CGA GG

		RH1_CHGA	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
ALPI	<i>H. sapiens</i>	FH1_ALPI	ATC TCA TGG GCC TCT TTG
		RH1_ALPI	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
MUC2	<i>H. sapiens</i>	FH1_MUC2	GAT TCG AAG TGA AGA GCA AG
		RH1_MUC2	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
SI	<i>H. sapiens</i>	FH1_SI	ATA GAC ACC TAT GAA AGA GAC C
		RH1_SI	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
VIL	<i>H. sapiens</i>	FH3_VIL1	CAT TAC CTG CTC TAC GTT TG
		RH3_VIL1	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
RIG-I	<i>H. sapiens</i>	FH1_DDX58	GGT ATA GAG TTA CAG GCA TTT C
		RH1_DDX58	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
TLR3	<i>H. sapiens</i>	FH1_TLR3	AGA TTC AAG GTA CAT CAT GC
		RH1_TLR3	TCC GTG TAC ACC ACT CGA TAT T
IFNAR	<i>H. sapiens</i>	FH1_IFNAR1	CAG TTG AAA ATG AAC TAC CTC C
		RH1_IFNAR1	ACT TGA AAG GTC ATG TTT GC
IL29	<i>H. sapiens</i>	IL29-ACC# NM_172140.2 FWD Set 3	CTC ACG CGA GAC CTC AAA TA
		IL29-ACC# NM_172140.2 REV Set 3	TAA GGA AGG AGT AGG GCT CA
IL10RB	<i>H. sapiens</i>	FH1_IL10RB	CTC CCG AAA ATG TCA GAA TG
		RH1_IL10RB	TAA CTT AGG TAC TGA GCT GTG
ADAM9	<i>H. sapiens</i>	FH3_ADAM9	CTC TGA AAT GTG GAG TTT CC
		RH3_ADAM9	TTC TTC GAA GTA GCT GAG TC

3.9 PCR et migration de l'ADN sur gel d'agarose

Les PCR ont été réalisées avec 1 µg d'ADNc obtenu des LCLs et des CEIs, les amorces décrites dans le Tableau 3, ainsi que la trousse *HotStarTaq Plus DNA Polymease* (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. L'ADNc a été amplifié avec l'appareil *Eppendorf MasterCycler 5345 EP Gradient PCR Thermal Cycler* et le programme suivant : 5 minutes à 95°C, suivi de 35 cycles comprenant 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C et 1 minute 30 secondes à 72°C, puis finalement 10 minutes à 72°C. Les produits PCR ont migré dans un gel d'agarose 2% (*GelRed*

Nucleic Acid Gel Stain 10 000X (VWR), 100 mL de tampon Tris-Acétate EDTA (TAE) (0,2M Tris base (Fisher), 0,1M d'acide acétique glacial (VWR), 0,005M EDTA (BD Biosciences), complété avec de l'eau), pendant 2 heures, à 100V et dans le tampon TAE. Les séquences d'ADN amplifiées ont été révélées aux UV, avec l'appareil Universal Hood II, Gel Doc System (Bio-Rad).

Tableau 3. Liste des amorces de PCR.

Gène	Espèce	Amorces	Séquence 5' - 3'
<i>IFIH1</i> (exons 6-10)	<i>H. sapiens</i>	Hum-PCR-IFIH1-exons6-10-sens-01	ATG GAG AAG ATG CTG GTG TTC
		Hum-PCR-IFIH1-exons6-10-anti-01	CAT CAC CAC CCT CAT CAC TAT C
<i>IFIH1</i> (exons 12-16)	<i>H. sapiens</i>	Hum-PCR-IFIH1-exons12-16-sens-01	TAC CAC AGT GGC AGA AGA AG
		Hum-PCR-IFIH1-exons12-16-anti-01	GTC AAG ATT GGG AAA TGT GAT AGG

3.10 Extraction et dosage de protéines

Les protéines ont été extraites dans 250 µL de tampon d'analyse de radioimmunoprécipitation (RIPA) (150 mM de sodium chloride (Fisher), 1% de Triton x-100 (Sigma), 0,5% de sodium déoxycholate (Sigma), 0,1% de sodium dodécyle sulfate (Sigma) et 50 mM de Tris pH 8), additionné de 10 µg/mL de *Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail* (Thermo Fisher). Le lysat cellulaire a été transféré dans un tube et centrifugé 20 minutes à 20 000 xg, à 4°C. Le surnageant contenant les protéines a été conservé à -80°C. Le dosage protéique s'est effectué à partir de la trousse *Pierce™ BSA Proteins Assay Kit* (Thermo Fisher), selon les instructions fournies par le fabricant. L'absorbance, à une longueur d'onde de 562 nm, a été mesurée par spectrophotométrie avec l'appareil *Synergy 2* (BioTek) et le logiciel *Gen5.1.11*.

3.11 Immunobuvardage de type Western et révélation

Les échantillons de protéines ont été dilués dans du tampon Laemmli 4X (Bio-Rad) contenant 2,5% de β-mercaptoéthanol, puis dénaturées à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines ont migré dans le gel de concentration, puis dans un gel de séparation (6%) à 30 mA/gel, pendant 2 heures et demie, dans un tampon de migration (1,5 mM Tris·Cl à pH 8,8). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose ayant une porosité de 0,2 µm (BioRad) et dans un

tampon de transfert (25 mM Tris·Cl, 225 mM glycine et 20% méthanol), à 25V pendant 12 heures. La membrane a été bloquée dans une solution à base de TBS (*tris buffer saline* 100 mM Tris·Cl à pH 7,5 et 150 mM NaCl), avec 0,1% Tween-20 et 10% de lait écrémé en poudre, pendant 30 minutes. Les protéines totales ont ensuite été colorées par du rouge Ponceau. La membrane a été incubée avec les anticorps primaires dilués dans du tampon de blocage, à 4°C pendant 12 heures et sous agitation constante. Ces anticorps ciblaient la partie N-terminale de la protéine MDA5 (*IFIH1/MDA5 Antibody*, ProteinTech, #21775-1-AP, 1 :1500), ainsi que la protéine *Elongation Factor 2* (Anti-EF2, Cell Signaling Technology, #2332S, 1:2500), utilisée comme contrôle de chargement. La membrane a été lavée 10 minutes avec la solution TBS et 0,1% Tween-20 (TBS-T), puis incubée avec un anticorps anti-lapin (Anti-Rabbit IgG (H+L), HRPO, goat IgG, Cedarlane, CLCC42007, 1 :5000), pendant 2 heures à température pièce. La membrane a été lavée 3 fois 10 minutes avec le TBS-T, puis rincée à l'eau, avant d'être révélée par luminescence avec la trousse *Western Lightening Plus-ECL* (PerkinElmer), selon les instructions du fabricant, ainsi que les pellicules *Kodak BioMaxLightfilm* (Sigma) et le développeur *Economax XRAY Film Processor*.

Chapitre 4 - Résultats

4.1 Expression génique et protéique des différents allèles d'*IFIH1* dans les LCLs

En premier lieu, nous avons voulu valider le génotype des différentes lignées de LCLs et caractériser l'impact des variants génétiques (Sp1, Sp2, I923V et E627X) sur la structure du transcrit (*IFIH1*) et de la protéine (MDA5).

Les variants d'épissage (Sp1 (*IFIH1**IVS8+1) et Sp2 (*IFIH1**IVS14+1)) pour les LCLs ont été mis en évidence par la migration sur gel d'agarose (Figure 5A et 5B) des produits d'amplification (RT-PCR) de régions contenant les exons 6-19 ou 12-16 d'*IFIH1*, respectivement. Le variant Sp1 se trouve à la position +1 du site donneur d'épissage dans l'intron 8, conduisant à un saut de l'exon 8. La délétion ne modifie pas le cadre de lecture et conduit à une suppression dans le premier domaine hélicase. Le variant Sp2 se trouve à la position +1 du site donneur d'épissage dans l'intron 14, menant à la délétion de l'exon 14. Ce variant conduit à la troncation du domaine C-terminal. Le variant E627X est très peu visible sur le gel, pour la lignée Sp2/E627X (Figure 5B), suggérant qu'il affecte la stabilité de l'ARNm. Les bandes supplémentaires qui apparaissent pour les lignées Sp1/I923V et Sp1/Sp2 (Figure 5A) et Sp1/Sp2 (Figure 5B) sont probablement des hétéroduplexes. Ceux-ci seraient causés par l'hybridation des produits PCR de séquences similaires, mais de longueurs différentes, provenant des allèles mutants avec des délétions.

L'effet des différents variants dans *IFIH1* sur l'expression protéique des LCLs a été mis en évidence par immunobuvardage de type Western (Figure 5C). Les différents allèles présentent les poids moléculaires attendus, à l'exception du variant E627X qui n'apparaît pas sur la membrane (poids moléculaire attendu à 68 kDa). Par ailleurs, certains variants, tel que le Sp1 présentent un niveau de protéine inférieur. Une expression plus faible ou absente de la protéine pourrait être due à une instabilité de celle-ci.

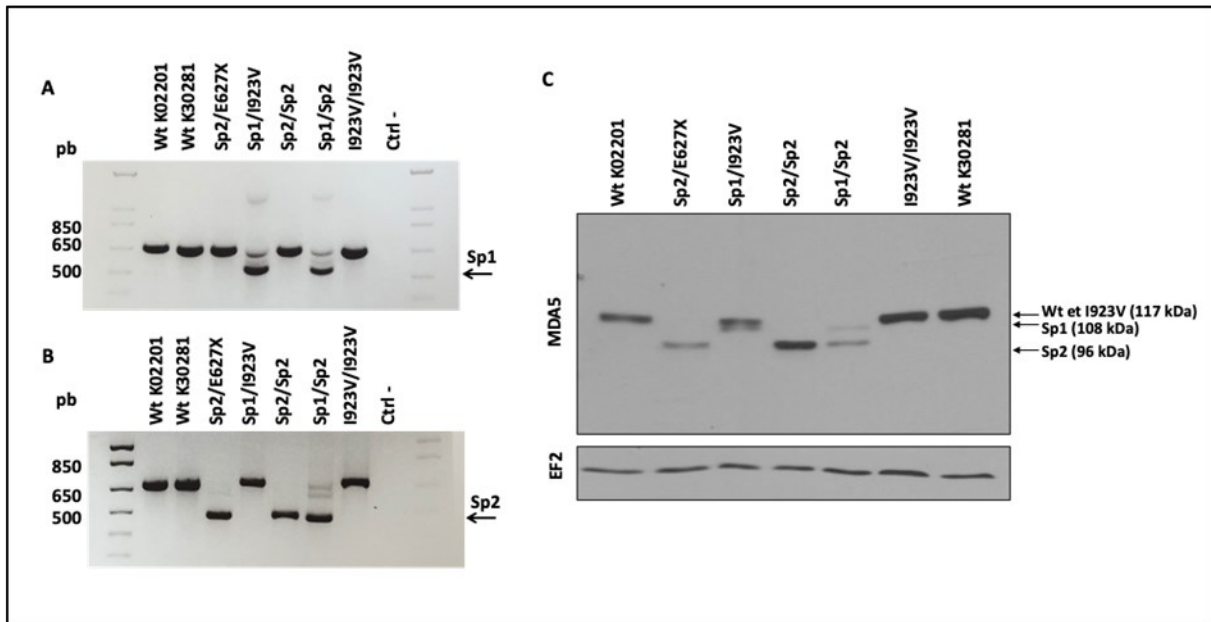


Figure 5. Impact des variants rares d'*IFIH1* sur la structure du transcrite (*IFIH1*) et de la protéine (MDA5) dans les LCLs d'individus homozygotes ou hétérozygotes composés.

(A) Représentation du variant Sp1 (*IFIH1**IVS8+1) associé à la délétion de l'exon 8, avec l'amplification des exons 6 à 10 de l'ADNc d'*IFIH1*, par PCR (LCLs). (B) Identification du variant Sp2 (*IFIH1**IVS14+1) caractérisé par la délétion de l'exon 14, avec l'amplification des exons 12 à 16 de l'ADNc d'*IFIH1*, par PCR (LCLs). (A et B) Les contrôles négatifs (ctrls -) comprennent les réactifs de la PCR mélangés à de l'eau, sans ADNc. (C) Les protéines ont été extraites des différentes lignées de LCLs et MDA5 a été révélé par immunobuvardage de type Western. EF2 a été utilisé comme contrôle de chargement. Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1, pb : paires de bases, kDa : kilodalton.

4.2 Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs dans les LCLs

Étant donné que MDA5 intervient dans les mécanismes de défense antivirale, nous avons voulu tester l'impact des génotypes sur celle-ci. Tout d'abord, avant d'induire une réponse antivirale dans les LCLs, nous avons voulu nous assurer qu'elles exprimaient les gènes *IFIH1*, *RIG-I*, *TLR3* et *IFNAR*, qui sont associés aux mécanismes des IFNs (tel que décrit à la section 1.3.3). Ces derniers ont été analysés par qPCR (Figure 6). Ils sont en effet tous exprimés pour les différentes lignées, signifiant qu'elles possèdent un bagage similaire pour induire ce mécanisme.

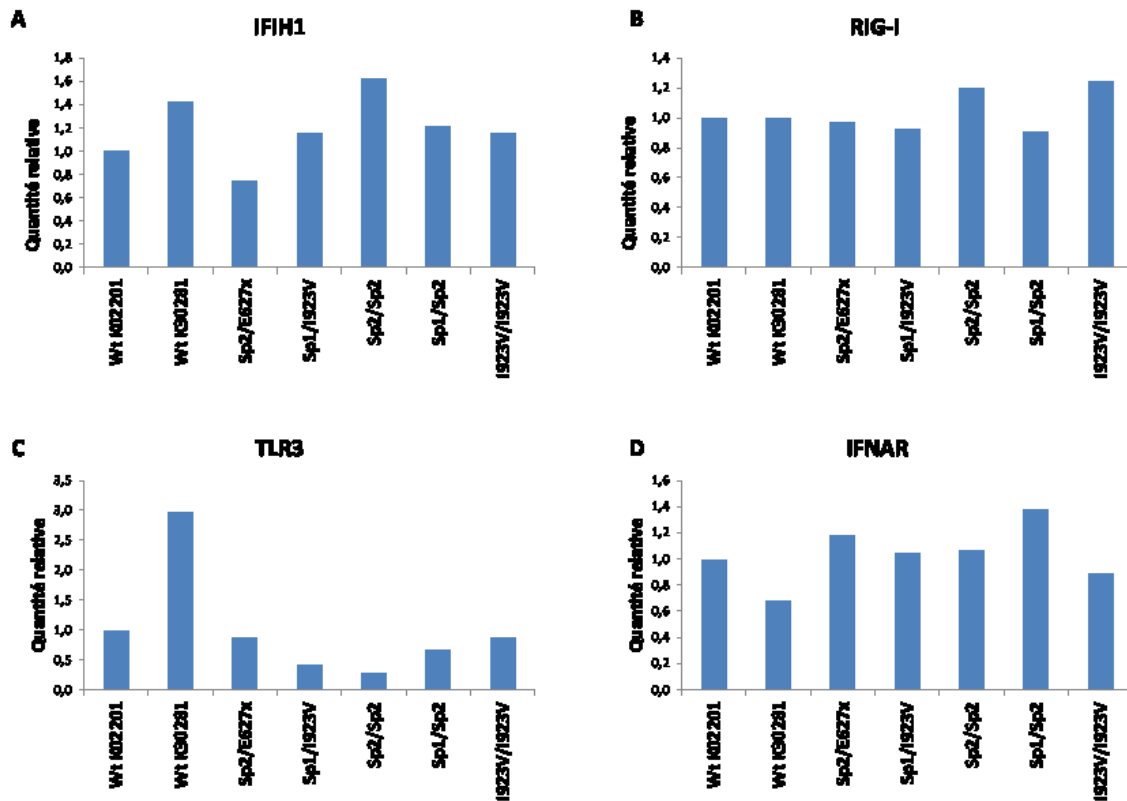


Figure 6. Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, dans les LCLs porteurs de variants rares d'*IFIH1*.

Analyse par qPCR des gènes *IFIH1* (A), *RIG-I* (B), *TLR3* (C) et *IFNAR* (D) pour l'ADNc de toutes les lignées de LCLs. Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1.

4.3 Induction de la réponse antivirale avec le poly (I:C) dans les LCLs

Afin d'induire la réponse antivirale pour nos différentes lignées de LCLs, nous les avons stimulées avec du poly (I:C) de haut poids moléculaire, une molécule d'ARNdb synthétique pouvant activer spécifiquement MDA5. Ainsi, les LCLs ont été nucléofectées avec 1,5 µg de poly (I:C), pendant 1 heure 30, puis l'expression génique d'*IFN-β* (IFN de type I) a été mesurée par qPCR (Figure 7). L'ajout du poly (I:C) est associé à une forte induction d'*IFN-β*, comparativement à la condition sans traitement. De plus, la lignée wt K02201 présente une plus forte expression d'*IFN-β*, comparativement aux lignées avec les variants Sp2/E627X, Sp2/Sp2 et Sp1/Sp2 ($p \leq 0,05$). La lignée Wt K30281 exprime significativement plus d'*IFN-β* que la lignée Sp1/Sp2 ($p \leq 0,05$). En ce qui concerne les deux lignées avec l'allèle I923V (Sp1/I923V et I923V/I923V), elles tendraient

à induire moins l'*IFN-β* que les lignées contrôles (*IFIH1* wt), mais les différences ne sont pas significatives. Il s'agit des résultats auxquels nous nous attendrions. En effet, il est connu que la mutation I923V (un seul changement d'acide aminé) est associée à la conservation d'une plus grande activité résiduelle de la protéine, comparativement aux mutants E627X, Sp1 et Sp2 qui sont associés à des délétions de la protéine (220, 222).

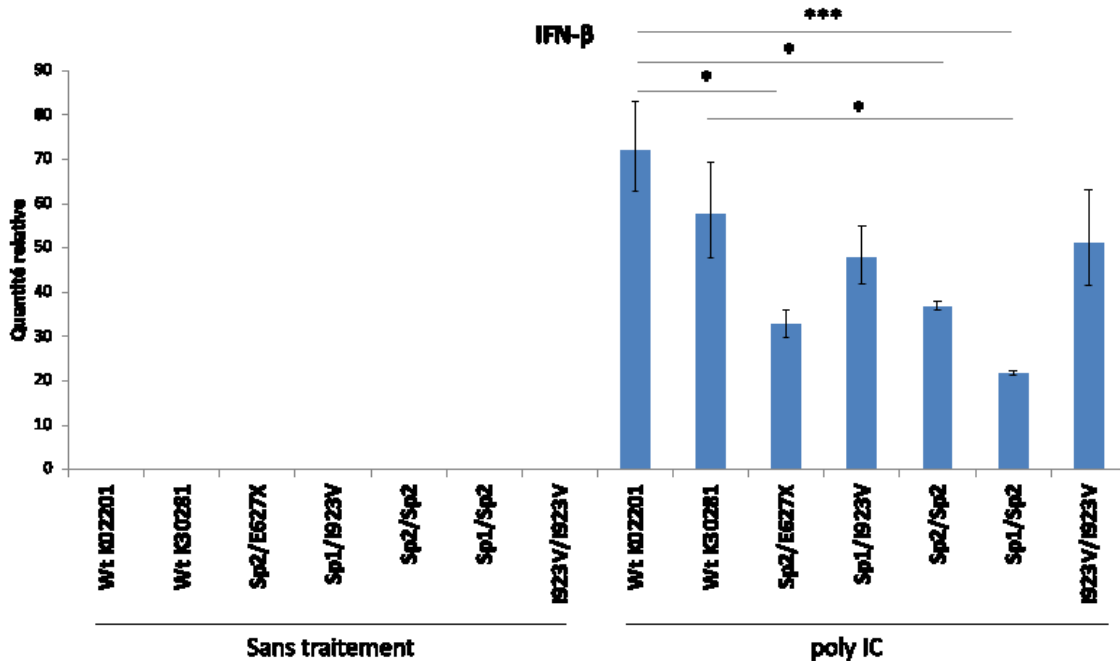


Figure 7. Effet du poly (I:C) sur l'expression génique d'*IFN-β* dans les LCLs porteurs de variants rares d'*IFIH1*.

Les LCLs ont été nucléofectées avec 1,5 µg de poly (I:C) pendant 1 heure 30 et l'expression génique (ADNc) d'*IFN-β* a été mesurée par qPCR. Les valeurs de quantité relative sont rapportées sur *HPRT*. Moyenne géométrique ± SEM, n=1 pour les LCLs sans traitement et n=2 pour les LCLs traitées au poly (I:C). Les valeurs de p ont été obtenues par un test d'analyse de variance univariée (ANOVA) avec une correction pour variances inégales (erreurs standard Huber-White). Les étoiles représentent une différence significative entre les lignées (* : p < 0,05, ** : p < 0,01, *** : p < 0,001). Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1.

4.4 Production d'EMCV et titrage

Le poly (I:C) présente certains inconvénients, compte tenu de la faible stabilité de l'ARNdb qui peut affecter la longueur de la molécule et ainsi induire de la variabilité entre les études (voir section 1.3.3.1.1) (136, 137). L'EMCV est un virus couramment utilisé dans les études analysant MDA5 et constitue une avenue intéressante pour étudier l'effet de nos différents génotypes (173). Avant de pouvoir infecter les cellules, nous avons produit une grande quantité de ce virus dans des cellules L929. Cette production a par la suite été titrée par la méthode DICT50, tel que décrit à la section 3.3. Le titre obtenu est de 2×10^7 DICT50/mL (Figure 8). La capacité d'infection des virus de notre production a été comparée à celle de l'EMCV obtenu de la compagnie ATCC. Plus précisément, les cellules Caco-2 ont été infectées avec ces deux sources d'EMCV (MOI de 2) pendant 24 heures, puis l'expression génique d'*EMCV 2A/2B*, (représentant l'ARN codant les protéines 2A et 2B de l'EMCV), d'*IFN-β* et d'*IFIH1* a été mesurée par qPCR (Figure 9). L'*EMCV 2A/2B* a été mesurée en plus grande quantité pour les cellules infectées avec l'EMCV d'ATCC, comparativement à celles infectées avec notre production. Or, l'expression d'*IFN-β* et d'*IFIH1* varie de façon proportionnelle à l'*EMCV 2A/2B*, pour notre production d'EMCV et pour l'EMCV d'ATCC, suggérant que les deux sources d'EMCV contiennent des particules virales infectieuses. Il est possible que le titre de l'EMCV de la nouvelle production ait été surestimé, ce qui ferait en sorte que la concentration de virus ajoutée représenterait une MOI inférieure à 2. Il est également possible que le titre de l'EMCV d'ATCC soit sous-estimé. En effet, nous avons procédé au titrage de l'EMCV d'ATCC et nous avons obtenu un titre supérieur ($4,28 \times 10^7$ DICT50/mL) au titre donné par la compagnie ($1,36 \times 10^7$ DICT50/mL). Cette différence peut être due au fait que la compagnie a procédé au titrage par une méthode différente de la nôtre (par *plaque-forming unit*), ainsi que par des variabilités techniques. Si nous avons calculé la quantité de virus (ATCC) à ajouter pour avoir une MOI de 2 selon le titre mesuré par la méthode DICT50, nous aurions mis un moins grand volume de virus sur les cellules et aurions peut-être pu obtenir des niveaux d'infections similaires à notre nouvelle production.

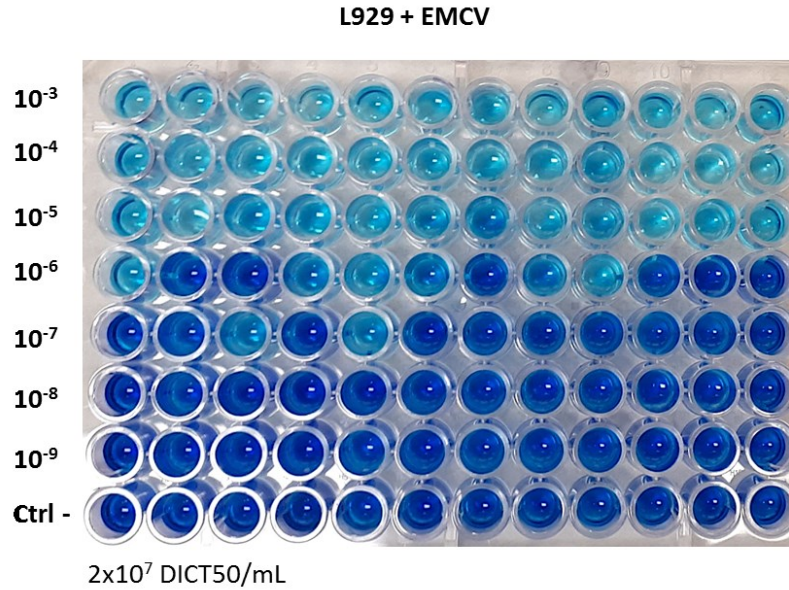


Figure 8. Titrage de la production d'EMCV par la méthode DICT50.

Des cellules L929 ont été infectées avec le virus dilué en série (facteur 10). Le contrôle négatif (ctrl -) fait référence aux cellules avec le milieu dans lequel a été produit le virus, mais sans virus. Les cellules ont été fixées et colorées au bleu de méthylène, 6 jours post-infection. Les puits pâles représentent les puits où il y a eu de la lyse cellulaire, ce qui est associé à l'infection.

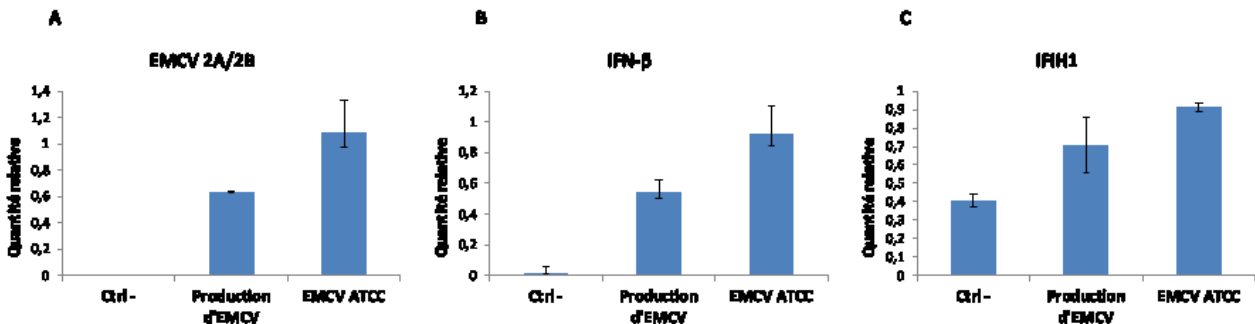


Figure 9. Évaluation de la capacité d'infection de la nouvelle production d'EMCV, comparativement à l'EMCV de la compagnie ATCC.

Des cellules Caco-2 ont été infectées avec l'EMCV nouvellement produit et l'EMCV obtenu de la compagnie ATCC (MOI de 2), pendant 24 heures. Les contrôles négatifs (ctrls -) font référence aux cellules avec du milieu dans lequel a été produit le virus uniquement. L'expression d'ARNm d'*EMCV 2A/2B* (A), d'*IFN-β* (B) et d'*IFIH1* (C), a été quantifiée par qPCR. Les données d'expression ont été rapportées sur *HPRT*. Moyenne géométrique ± erreur standard de la moyenne (SEM), n=2.

4.5 Efficacité d'infection dans les LCLs et les CEIs dérivées d'hiPSCs

Nous avons tenté d'infecter les LCLs, mais l'infection était très peu détectable (très peu d'ARN EMCV 2A/2B mesuré), comparativement à l'infection des Caco-2. Ainsi, nous avons décidé de comparer la réponse à l'EMCV entre les LCLs et les CEIs dérivées d'hiPSCs, un modèle avec lequel nous avons déjà prévu travailler. Ainsi, l'infection de la LCL (wt K02201) avec l'EMCV (MOI de 1) a été associée à une plus faible expression génique de l'*EMCV 2A/2B* et d'*IFN-β*, comparativement à la lignée de CEIs dérivées d'hiPSCs (wt K17945) infectée avec la même MOI (Figure 10A et 10B). Le mécanisme d'adsorption de l'EMCV (comment il entre dans la cellule), reste à être mieux compris. Or, il est connu que la protéine ADAM9 joue un rôle important dans ce processus (269). L'ARNm d'ADAM9 a été mesuré par qPCR pour la LCL (wt K02201), ainsi que pour la lignée de CEIs (wt K17945) non infectée ou infectée (Figure 10C). Il s'est avéré plus fortement exprimé dans la lignée de CEIs, comparativement à la LCL. Par ailleurs, la faible expression d'ADAM9 dans la LCL est généralisée pour l'ensemble des LCLs (Figure 10D). À la lumière de ces résultats, nous avons choisi de poursuivre l'étude de l'impact des variants rares d'*IFIH1* sur la réponse antivirale dans le modèle de CEIs dérivées d'hiPSCs.

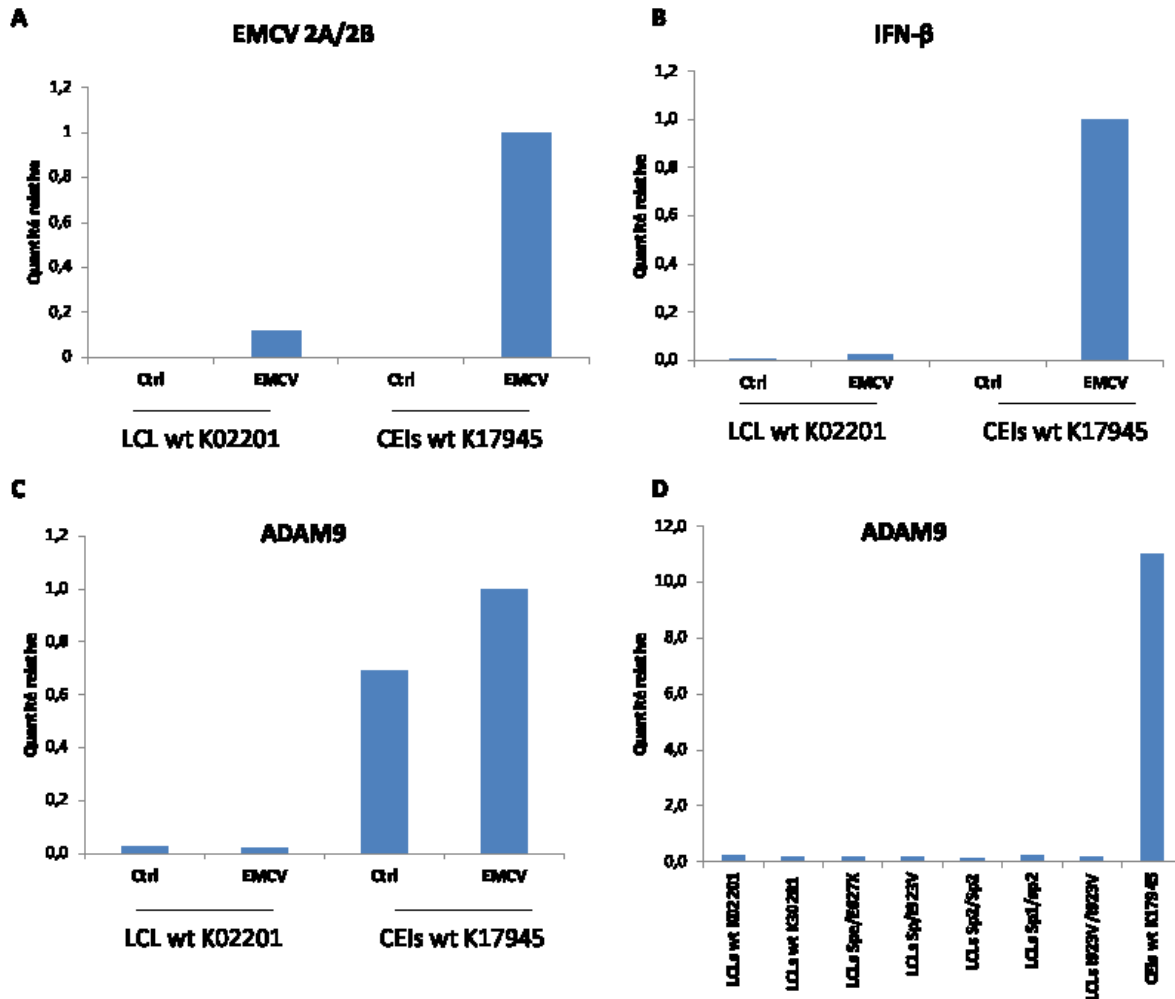


Figure 10. Infection avec l'EMCV (MOI de 1) de LCLs ou de CEIs (*IFIH1* wt).

La LCLs (wt K02201) et la lignée de CEIs dérivées d'hiPSCs (wt K17945) ont été infectées avec l'EMCV (MOI de 1), puis les niveaux d'expression en ARN de l'*EMCV 2A/2B* (A), de l'*IFN-β* (B) et d'*ADAM9* (C) ont été mesurés par qPCR. Les niveaux d'expression génique d'*ADAM9* pour toutes les LCLs et la lignée de CEIs wt K17945 non stimulée ont été comparés par qPCR (D). Les contrôles font référence aux cellules avec du milieu dans lequel a été produit le virus, mais sans virus. Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1*IVS8+1*, Sp2 : *IFIH1*IVS14+1*.

4.6 Expression génique et protéique des différents allèles d'*IFIH1* dans les sphéroïdes dérivés d'hiPSCs

Avant d'aller plus loin avec les CEIs dérivées d'hiPSCs, nous avons d'abord voulu valider que les sphéroïdes intestinaux exprimaient les bons génotypes, en plus de caractériser l'impact des variants sur la structure du transcrit (*IFIH1*) et de la protéine (MDA5). Tel que cela a été fait pour les LCLs (section 4.1), nous avons réalisé des RT-PCR pour identifier les variants d'épissages et un immunobuvardage de type Western pour les protéines des différents allèles.

Au même titre que pour les LCLs, les variants d'épissage (Sp1 (*IFIH1*IVS8+1*) et Sp2 (*IFIH1*IVS14+1*)) pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs ont également été mis en évidence sur gel d'agarose (Figure 11A et 11B). Le variant E627X n'est pas visible à la Figure 11B pour la lignée Sp2/E627X. Celui-ci était très peu visible pour les LCLs (Figure 5B), soulignant le fait que ce variant soit associé à de l'instabilité de l'ARNm. Les bandes supplémentaires apparaissant pour les lignées Sp1/I923V et Sp1/Sp2 (Figure 11A) et Sp1/Sp2 (Figure 11B) qui étaient également observées pour les LCLs, sont probablement des hétéroduplexes.

L'effet de variants dans *IFIH1* sur l'expression protéique pour certaines lignées de sphéroïdes intestinaux a été mis en évidence par immunobuvardage de type Western (Figure 11C). Au même titre que pour les LCLs, les poids moléculaires attendus ont été obtenus pour les différents variants, à l'exception du variant E627X qui est absent et qui serait attendu à 68 kDa, soulignant encore une fois que la stabilité de la protéine associée à cet allèle soit affectée.

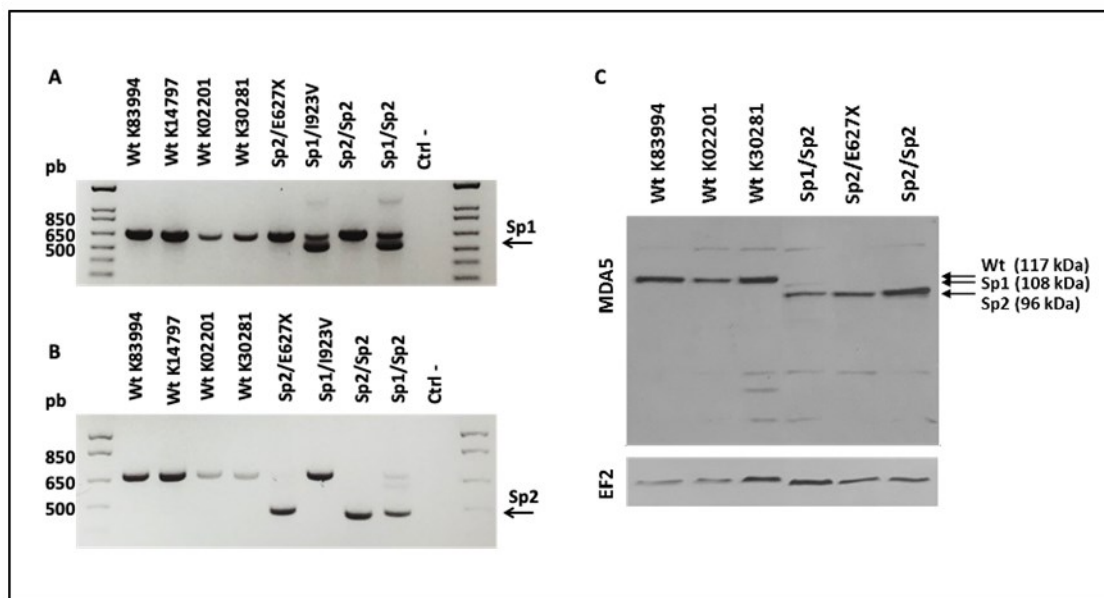


Figure 11. Validation de la structure génétique et protéique d'*IFIH1*/MDA5 pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs.

L'ARN total des sphéroïdes intestinaux obtenus à partir des porteurs homozygotes ou hétérozygotes composés pour des variants rares d'*IFIH1* ou de témoins (*IFIH1* wt) a été extrait, puis l'ADNc a été amplifié par PCR pour faire ressortir les variants Sp1 et Sp2. (A) Représentation du variant Sp1 (*IFIH1**IVS8+1) associé à la délétion de l'exon 8, avec l'amplification par PCR des exons 6 à 10. (B) Identification du variant Sp2 (*IFIH1**IVS14+1) caractérisé par la délétion de l'exon 14, avec l'amplification par PCR des exons 12 à 16. Les contrôles négatifs (ctrls -) comprennent les réactifs du PCR, sans ADNc. (C) Les protéines ont été extraites des différentes lignées de sphéroïdes intestinaux et MDA5 a été révélé par immunobuvardage de type Western. EF2 a été utilisé comme contrôle de chargement. Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1, pb : paires de bases, kDa : kilodalton.

4.7 Composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs

Après avoir validé les génotypes, nous avons voulu valider que tous les sphéroïdes dérivés d'hiPSCs étaient composés de cellules intestinales. Ainsi, des marqueurs spécifiques à la composition cellulaire et à la structure de l'intestin ont été mesurés par qPCR et ce, pour les protocoles 2D (Figure 12) et 3D (Figure 13) (protocoles décrits à la section 3.1.5). Le marqueur *Caudal-Type Homeobox Protein 2* (CDX2) représente les CEIs et plus spécifiquement, le

lysozyme (LYZ), les cellules de Paneth, la *chromagranine A* (CHGA), les cellules entéro-endocrines, l'*Alkaline Phosphatase Intestinal* (ALPI), les entérocytes et mucine 2 (MUC2), les cellules caliciformes. Enfin, la vimentine (VIM) est un indicateur de mésenchyme (joue un rôle de support, ainsi que dans la prolifération des tissus intestinaux), la sucrase isomaltase (SI) représente les bordures en brosse et la villine (VIL) est spécifique aux microvillosités. Les sphéroïdes découlant de ces deux protocoles présentent effectivement ces marqueurs intestinaux (Figures 12 et 13). Pour le protocole 3D, la lignée wt K30281 exprime la majorité de ces gènes plus faiblement que les autres lignées, laissant présager qu'elle est moins bien différenciée que les autres lignées. Or, il ne s'agit que de résultats préliminaires, avec un N de 1, ne permettant pas une conclusion robuste.

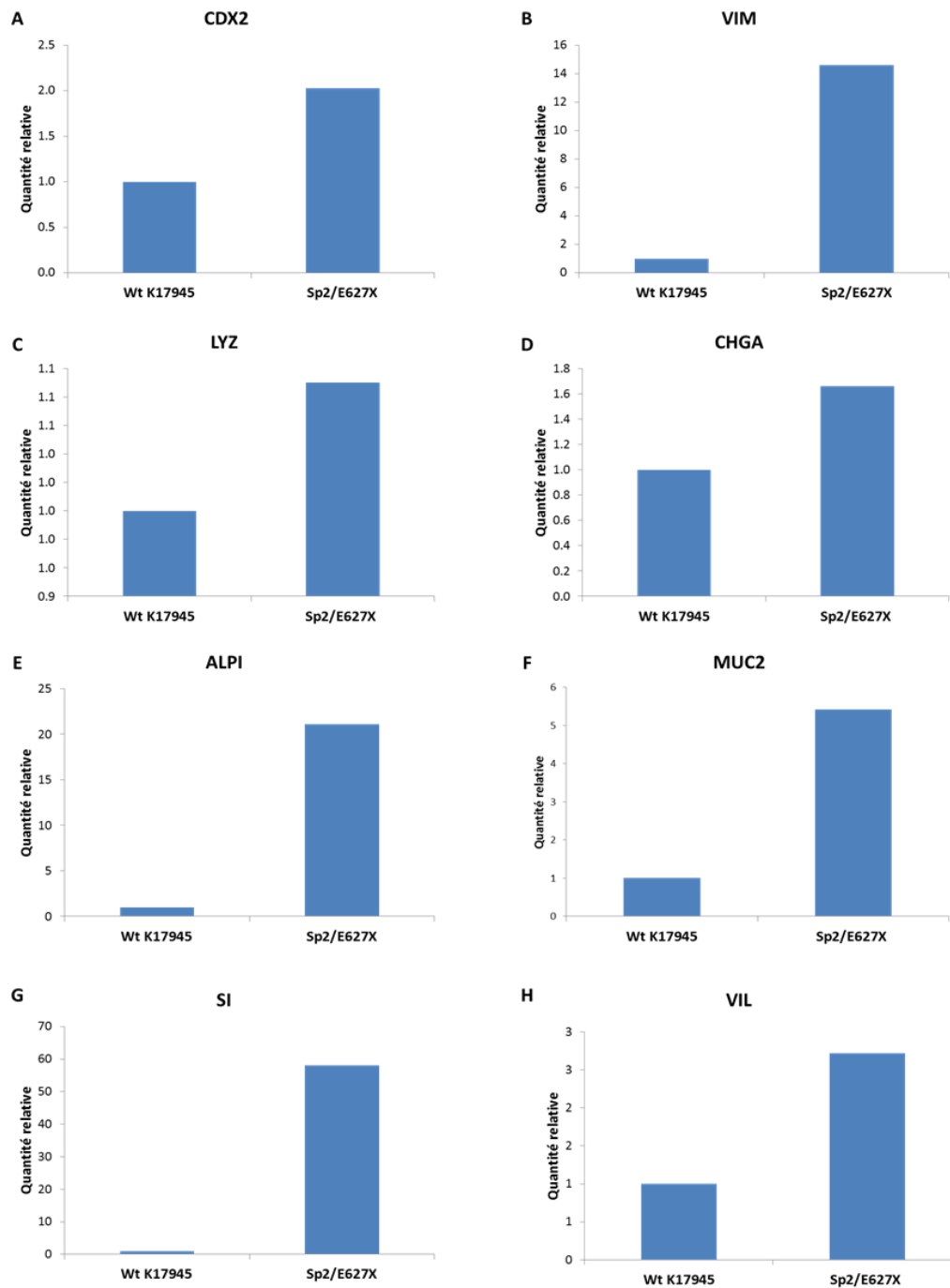


Figure 12. Profil d'expression de gènes témoinnant de la composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 2D).

Analyse par qPCR de l'expression génique (ADNc) de *CDX2*, *VIM*, *LIZ*, *CHGA*, *ALPI*, *MUC2*, *SI* et *VIL*, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 2D). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

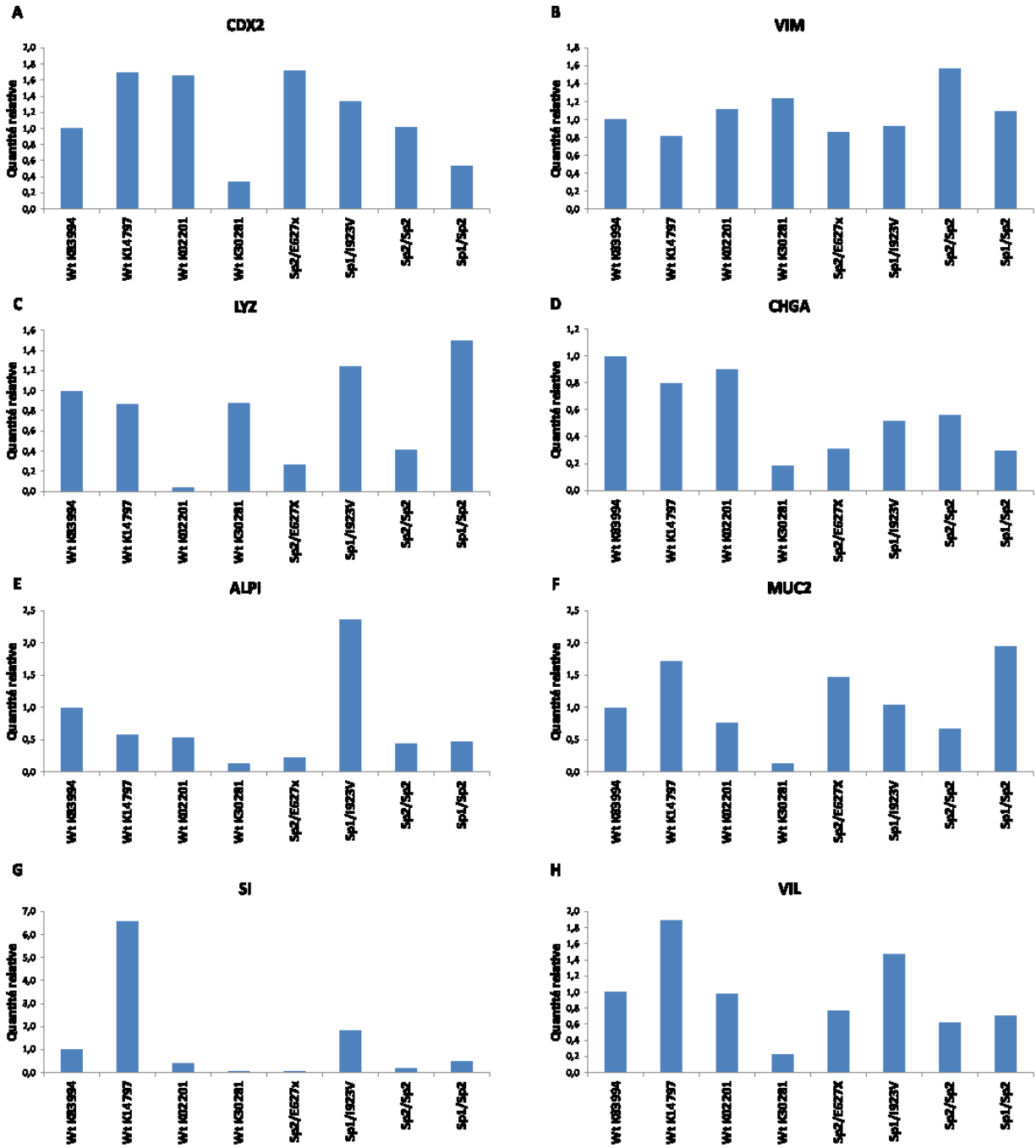


Figure 13. Profil d'expression de gènes témoin de la composition cellulaire et structurale des sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 3D).

Analyse par qPCR de l'expression génique (ADNc) de *CDX2*, *VIM*, *LIZ*, *CHGA*, *ALPI*, *MUC2*, *SI* et *VIL*, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 3D). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp1 : IFIH1*IVS8+1, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

4.8 Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs dans les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs

Avant de stimuler MDA5 pour étudier la réponse antivirale dans nos sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs, nous avons voulu valider qu'ils étaient tous en mesure d'exprimer des gènes associés aux mécanismes des IFNs. Ainsi, nous avons mesuré l'expression des gènes *IFIH1*, *RIG-I*, *TLR3*, *IFNAR*, *IL10RB* et *ADAM9* par qPCR, pour les protocoles 2D (Figure 14) et 3D (Figure 15). Ces derniers sont effectivement exprimés pour toutes les lignées et les deux protocoles, signifiant que tous les sphéroïdes possèdent les molécules nécessaires à l'induction du mécanisme des IFNs.

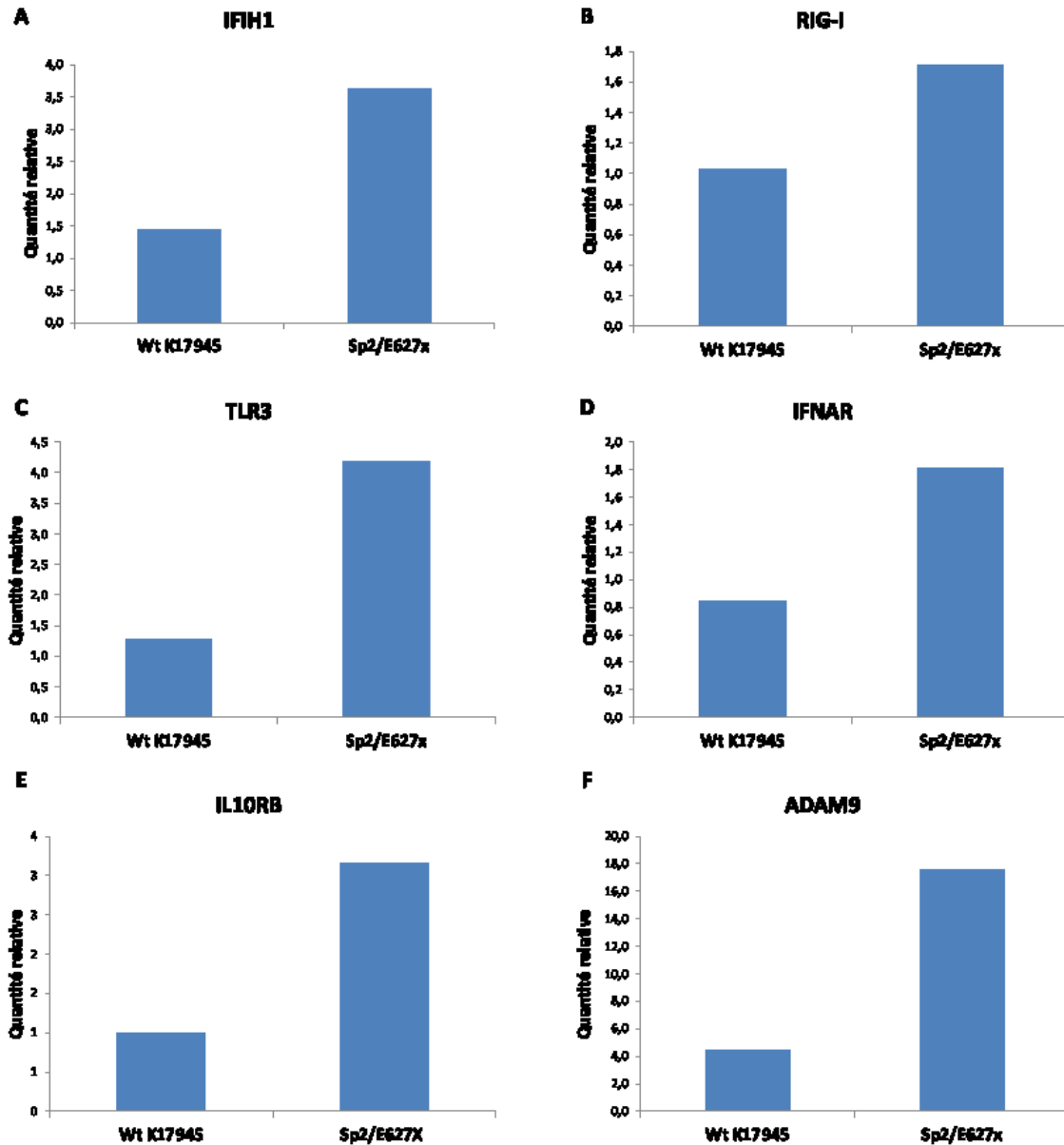


Figure 14. Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 2D).

Analyse par qPCR de l'expression génique (ADNc) d'*IFIH1*, *RIG-I*, *TLR3*, *IFNAR*, *IL10RB* et *ADAM9* (protocole 2D). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp2 : *IFIH1***IVS14+1*.

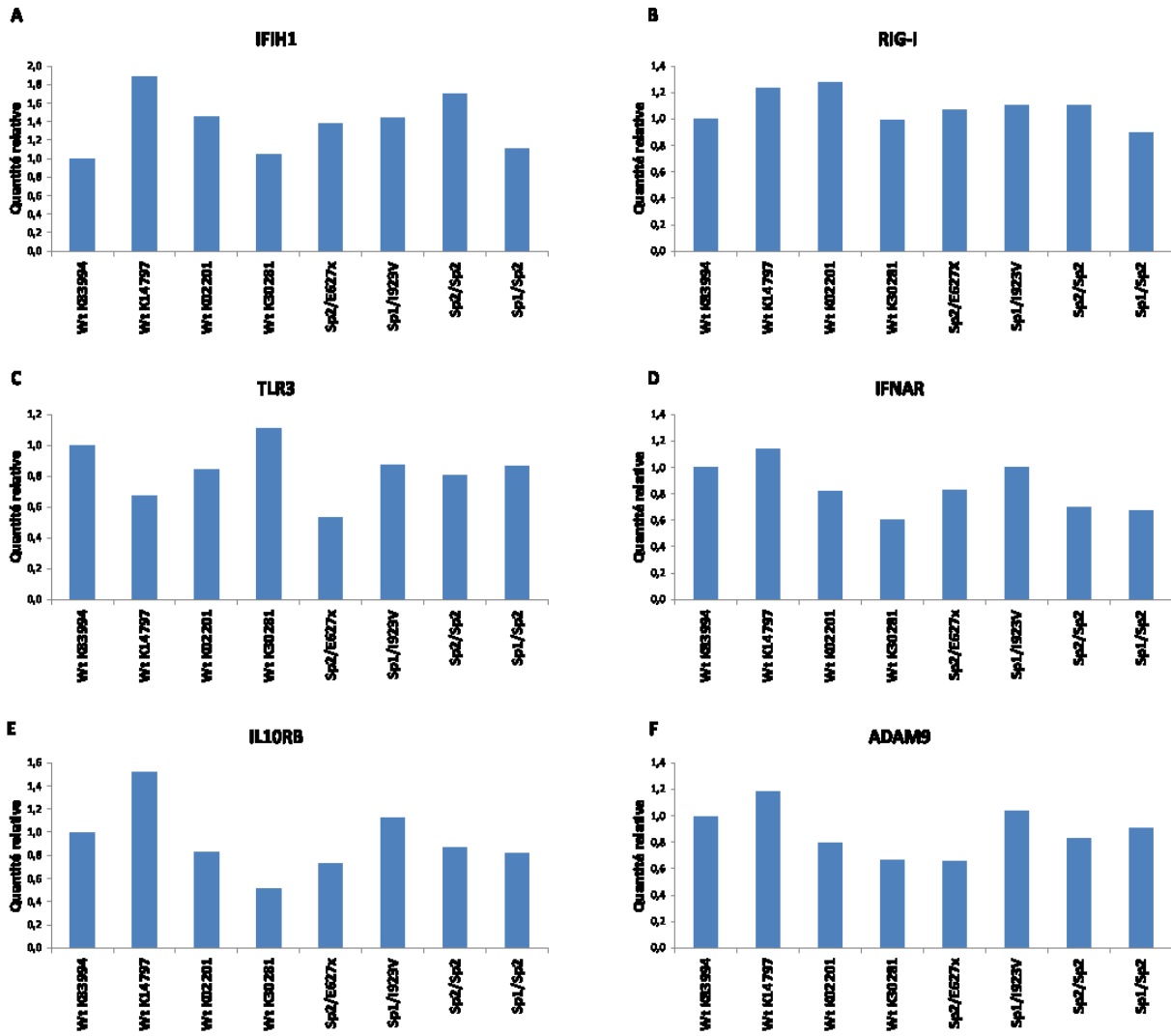


Figure 15. Profil d'expression de gènes associés aux mécanismes des IFNs, pour les sphéroïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs (protocole 3D).

Analyse par qPCR de l'expression génique (ADNc) d'*IFIH1*, *RIG-I*, *TLR3*, *IFNAR*, *IL10RB* et *ADAM9* (protocole 3D). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Wt : wild type, Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1.

4.9 Induction de la réponse antivirale avec le poly (I:C) dans les CEIs dérivées d'hiPSCs

Dans l'objectif de déterminer les meilleures conditions pour obtenir une réponse antivirale optimale par transfection des CEIs dérivées d'hiPSCs avec le poly (I:C), les temps 1 heure 30, 3 heures et 6 heures ont été testés avec la lignée wt K17945 (Figure 16). L'*IFN-β* et l'*IL29* (IFN de type III) ont été mesurés par qPCR, et ceux-ci augmentaient proportionnellement avec le temps de transfection (poly (I:C) avec lipofectamine). Pour la condition poly (I:C) sans lipofectamine, les IFNs sont peu exprimés. Lorsque la lipofectamine n'est pas ajoutée, le poly (I:C) demeure à l'extérieur de la cellule et peut interagir avec des récepteurs extracellulaires (TLR3 par exemple). Tel que décrit à la section 1.3.3.1.3, TLR3 peut mener à la production d'IFNs, au même titre que les RLRs. En ce qui concerne les ISGs mesurés (*IFITM1* et *IFIH1*), ceux-ci s'avèrent davantage transcrits à 6 heures, pour le poly (I:C) tant avec que sans lipofectamine. En effet, les autres temps ne semblent pas avoir d'effet notable sur la production d'ISGs. À noter qu'à 6 heures, le poly (I:C) sans lipofectamine induit, de façon légèrement moins forte qu'avec la lipofectamine, l'expression d'*IFITM1* et d'*IFIH1*. Il se pourrait qu'un mécanisme ne passant pas par les IFNs et qui nous est inconnu induisent la production d'ISGs pour la conditions poly IC sans lipofectamine. La transfection de 6 heures a alors été retenue pour tester le poly (I:C) sur les lignées wt K17945 et mutante Sp2/E627X (Figure 17). Pour cette expérience, tel qu'attendu, la transfection a induit une plus grande expression d'*IFN-β* et d'*IL29* pour la lignée wt comparativement à la lignée Sp2/E627X, suggérant ainsi que les variants nuisent à la réponse antivirale dans les CEIs.

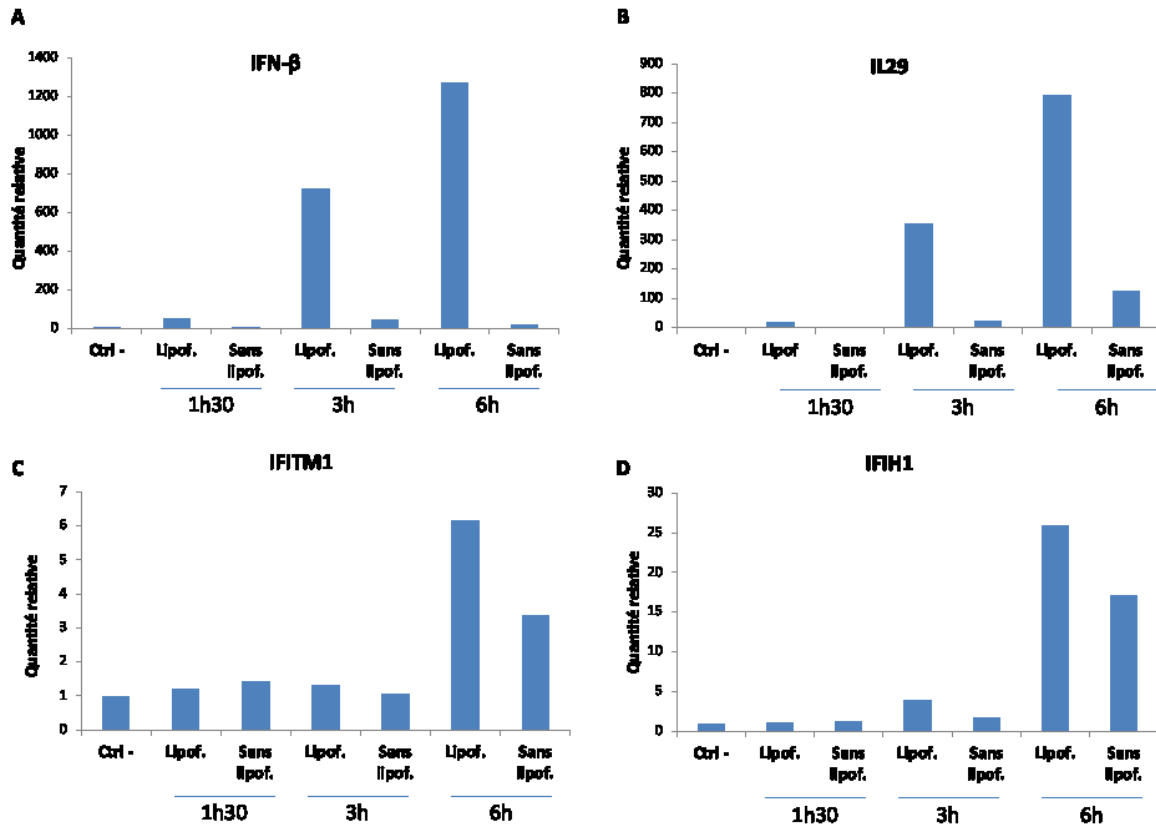


Figure 16. Évaluation de la réponse au poly (I:C) au cours du temps, des CEIs dérivées d’hiPSCs.

La lignée wt K17945 (CEIs dérivées d’hiPSCs) a été transfectée avec 1 µg de poly (I:C) pendant 1 heure 30, 3 heures et 6 heures. L’expression en ARNm d’*IFN-β* (A), d’*IL29* (B), d’*IFITM1* (C) et d’*IFIH1* (D) a été évaluée par qPCR. Les contrôles négatifs (ctrls -) comprennent l’ajout de la lipofectamine sur les cellules, sans poly (I:C). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. Lipof. : poly (I:C) avec lipofectamine, Sans lipof. : poly (I:C) sans lipofectamine.

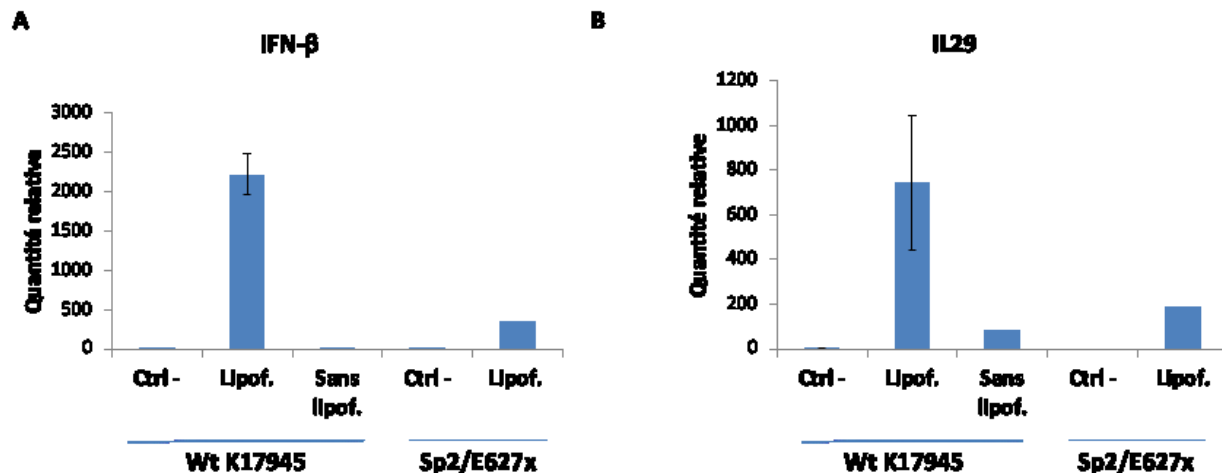


Figure 17. Évaluation de la réponse au poly (I:C) pour les CEIs dérivées d'hiPSCs avec les génotypes wt K17945 et Sp2/E627X.

Les lignées wt K17945 et Sp2/E627X ont été transfectées avec 1 µg de poly (I:C) pendant 6 heures. L'expression génique d'*IFN-β* (A) et d'*IL29* (B) a été évaluée par qPCR. Les contrôles négatifs comprennent l'ajout de la lipofectamine sur les cellules, sans poly (I:C). Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*. Moyenne géométrique ± erreur standard de la moyenne (SEM), n=2 pour le contrôle négatif et la condition poly (I:C) avec lipofectamine (wt), et n=1 pour la condition sans lipofectamine (wt) et pour la lignée Sp2/E627X. Ctrl - : contrôle négatif, Lipof. : poly (I:C) avec lipofectamine, Sans lipof. : poly (I:C) sans lipofectamine, wt : wild type, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

4.10 Induction de la réponse antivirale avec l'EMCV dans les CEIs dérivées d'hiPSCs

Compte tenu du fait que le poly (I:C) ne constitue pas l'approche idéale pour étudier MDA5 et que l'EMCV est connu pour être spécifique à cette protéine, nous avons poursuivi avec ce virus pour mieux comprendre la réponse antivirale associée. Les lignées wt K17945 et Sp2/E627X sous forme de monocouches de CEIs obtenues par le protocole 2D ont d'abord été infectées avec l'EMCV pendant 24 heures sur chambres Transwell (Figure 18 A,B,C). L'efficacité d'infection a été évaluée par la mesure d'ARN viral (*EMCV 2A/2B*) qui s'est révélée supérieure pour la lignée mutante (environ 9 fois plus) comparée à la lignée wt. Les CEIs mutantes expriment davantage d'*IFN-β* (environ 5 fois plus) et une quantité similaire d'*IL29*, en comparaison avec les cellules wt. Cette expression d'IFNs serait inattendue, mais si nous corrigeons ces résultats par rapport au niveau d'infection, la lignée mutante exprime moins d'IFNs que la lignée wt.

Les mêmes conditions d'infection avec l'EMCV ont été reproduites sur ces cellulesensemencées sur plastique. Cette fois, l'efficacité d'infection était supérieure pour la lignée wt, en comparaison avec la lignée mutante (environ 2,5 fois plus d'EMCV 2A/2B) (Figure 18 D,E,F). L'*IFN-β* serait cependant 4,3 fois supérieur et *IL29* 10 fois supérieur pour la lignée wt. Ainsi, en corrigeant pour les niveaux d'infection, la lignée wt exprime davantage d'IFNs, au même titre que l'expérience précédente.

Afin de valider ces résultats, d'autres lignées de CEIs, soit wt K30281 et Sp2/Sp2, obtenues par le protocole 3D ont également été infectées avec l'EMCV, sur chambres Transwell. La transcription d'IFNs (*IFN-β* et *IL29*) était supérieure pour la lignée wt que pour la lignée mutante et il y avait plus d'ARN viral mesuré pour la lignée mutante (Figure 18 G,H,I). Ces résultats sont cohérents avec les deux autres infections, soulignant le fait que les lignées wt induisent davantage d'IFNs que les lignées mutantes. Il sera toutefois important de répéter ces infections sur ces lignées, ainsi que sur les autres lignées, afin d'appuyer ces résultats.

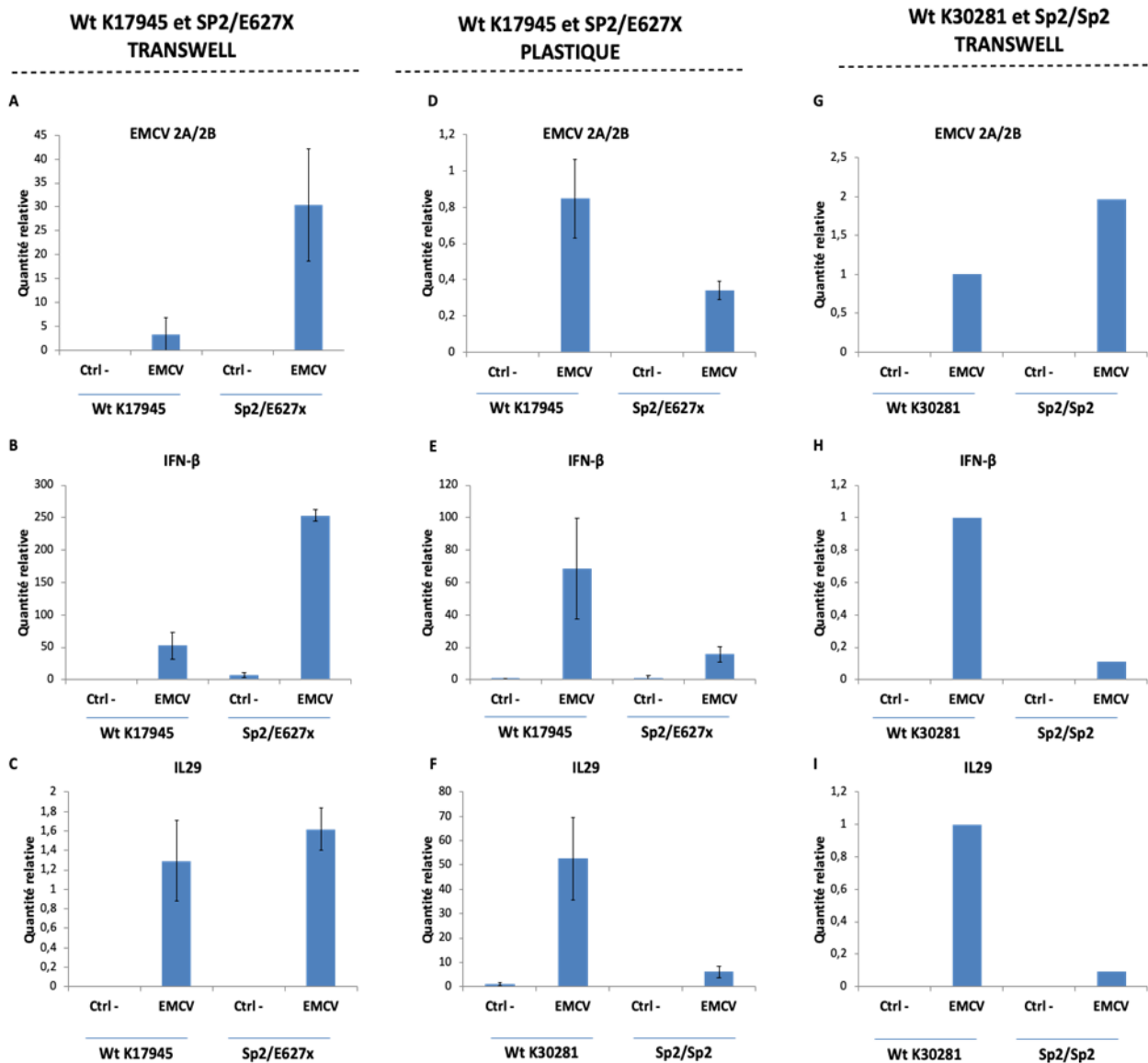


Figure 18. Évaluation de la réponse à l'EMCV pour les CEIs dérivées d'hiPSCs.

Les CEIs dérivées d'hiPSCs ont été infectées avec l'EMCV (MOI de 5) pendant 24 heures. L'expression génique de l'*EMCV 2A/2B*, de l'*IFN-β* et de l'*IL29* a été mesurée par qPCR, pour les lignées wt K17945 et Sp2/E627X (protocole 2D) sur chambres Transwell (A, B, C), pour les lignées wt K17945 et Sp2/E627X (protocole 2D) sur plastique (D, E, F) et pour les lignées wt K30281 et Sp2/E627X (protocole 3D) sur chambres Transwell (G, H, I). Les contrôles négatifs (ctrl -) correspondent au milieu dans lequel a été produit le virus, mais sans virus. Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*. Moyenne géométrique ± erreur standard de la moyenne (SEM), n=2 pour A, B, C, D, E, F et n=1 pour G, H, I. Wt : wild type, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

Chapitre 5 - Discussion

***IFIH1* et ses variants associés aux MII**

Des études génétiques ont permis d'identifier quatre variants rares (rs35337543 (Sp1), rs35732034 (Sp2), rs35667974 (I923V), rs35744605 (E627X)) dans le gène *IFIH1* qui représentent des facteurs de risque pour les MII. Ceux-ci ont déjà été associés à d'autres pathologies, tels que le diabète de type 1 pour lequel ils constituent des facteurs protecteurs, ainsi qu'à des complications suite à des infections respiratoires. De façon générale, ces variants diminuent la fonction de la protéine (MDA5), et réduisent ainsi la réponse antivirale associée aux IFNs. Pour les étudier dans le contexte des MII, nous avons d'abord travaillé avec des LCLs dérivées de patients homozygotes ou hétérozygotes composés pour ces allèles. Ces cellules ont par la suite été reprogrammées en hiPSCs et différenciées en sphéroïdes intestinaux. Des tests de stimulations avec le poly (I:C), une molécule d'ARNdb synthétique, et d'infections avec l'EMCV (un virus spécifique à MDA5) ont été réalisés avec les LCLs et des monocouches de CEIs obtenues à partir des sphéroïdes intestinaux. De façon générale, pour ces deux modèles cellulaires, la production d'IFNs, suite à la stimulation avec ces agents, s'est révélée moins prononcée pour les lignées exprimant les variants d'*IFIH1*, comparativement aux lignées contrôles (*IFIH1* wt).

Validation/caractérisation des variants pour l'expression génique et protéique dans les LCLs et les sphéroïdes intestinaux

Une méta-analyse regroupant 15 GWAS a révélé l'existence de près de 200 loci associés aux MII (211). Plus précisément, des études de reséquençage ont permis l'identification d'un variant rare rs35667974 d'*IFIH1* (I923V) comme étant associé aux MII (216). De plus, une étude de séquençage d'exome ciblé a fait ressortir deux variants d'épissage dans *IFIH1*, associés aux MII, soit : rs35337543 (*IFIH1**IVS8+1, Sp1), qui est associé à la MC et rs35732034 (*IFIH1**IVS14+1, Sp2), qui est associé à la MC et à la CU (données non publiées). Cette étude a également identifié un autre variant rare rs35744605 (E627X) qui tendait à être associé à la CU, sans que cela ne soit significatif. Or, il peut être difficile de faire ressortir des différences significatives, lorsque des

variants sont très rares dans la population. Les analyses à l'échelle du phénotype (*phenome-wide analyses*) de DeBoever *et al.* ont quant à elles identifié l'allèle E627X comme étant significativement associé aux MII (217).

Des LCLs de la biobanque NIDDK du IBDGC qui provenaient d'individus homozygotes ou hétérozygotes composés pour les variants d'*IFIH1* ont été sélectionnées pour cette étude. Plus précisément, ces lignées contenaient les allèles d'*IFIH1* Sp2/E627X, Sp1/I923V, Sp2/Sp2, Sp1/Sp2 et Sp2/Sp2 ou wt/wt (témoins). De manière intéressante, les patients porteurs des allèles Sp1/Sp2 et Sp2/Sp2 ont reçu le diagnostic de la MC à l'enfance (9 ans et 12 ans respectivement), comparativement aux patients porteurs des autres génotypes qui ont eu le diagnostic lorsqu'ils étaient de jeunes adultes (Sp2/E627X : CU à 28 ans, Sp1/I923V : MC à 23 ans, I923V/I923V MC à 23 ans). Il est connu que les enfants ayant un diagnostic de MII développent des phénotypes différents comparativement aux adolescents et aux adultes (270). De plus, une apparition précoce des MII est associée à une extension de la maladie et à un pronostic plus sévère qu'une manifestation tardive (184).

Les variants d'épissages (Sp1 et Sp2) ont d'abord été mis en lumière avec la migration de produits RT-PCR pour les LCLs (Figure 5A,B). Le variant Sp1 (*IFIH1**IVS8+1, Sp1) est associé à une délétion de l'exon 8 (perte de 117 pb), alors que le variant Sp2 (*IFIH1**IVS14+1, Sp2) cause la délétion de l'exon 14 (perte de 191 pb). À la Figure 5B, le variant E627X n'apparaît pratiquement pas, suggérant qu'il favorise la dégradation de l'ARNm. Un mécanisme pouvant être associé à l'instabilité de l'ARNm est la dégradation des ARNm non-sens (NMD). Ceci permet de contrôler la qualité de l'ARNm, entre autres, en induisant la détérioration d'ARNm présentant un codon d'arrêt prématuré, ce qui évite l'apparition d'une protéine tronquée (271). Ainsi, compte tenu du fait que ce variant induit une protéine tronquée, il se pourrait que le NMD intervienne dans la dégradation d'ARNm. Ce phénomène pourrait également intervenir pour le variant Sp2 qui cause aussi un codon d'arrêt prématuré. Enfin, pour les lignées comprenant les variants Sp1 et/ou Sp2, des bandes supplémentaires apparaissent (pour tous les gels). Celles-ci sont probablement des hétéroduplexes causés par l'hybridation, lors de l'amplification PCR, des deux allèles de longueurs différentes, mais possédant des séquences similaires et ayant des extrémités identiques. Ceci forme

généralement un produit en ADN qui possède des pb incompatibles et une structure secondaire imprévisible en son centre, ce qui affecte la migration sur le gel (272, 273).

Par ailleurs, dans les LCLs, les protéines des lignées mutantes, ainsi que des lignées contrôles avec *IFIH1* wt ont été mises en évidence par immunobuvardage de type Western (Figure 5C). Le poids moléculaire attendu pour les différents allèles a été obtenu, à l'exception de l'allèle E627X pour lequel aucune bande n'est apparue. À noter que le laboratoire du Dre Kate Jeffrey du Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School), avec qui nous travaillons en collaboration, est parvenu à révéler ce variant par immunobuvardage de type Western, dans le contexte où des HEK293T le surexprimant étaient stimulés avec du poly (I:C). Ce dernier était cependant moins fortement exprimé que pour la surexpression de l'allèle wt (données non publiées). L'absence ou la faible expression d'allèles mutants pourraient être expliquées par une plus faible présence d'ARNm qui serait dégradé et/ou une diminution de la stabilité de la protéine. En effet, Asgari *et al.*, ont testé la stabilité de MDA5 par méthode de *pulse-chase*, où des HEK293T surexprimaient les variants Sp1, Sp2 et E627X. La stabilité de la protéine était diminuée pour les cellules surexprimant ces trois variants, comparativement aux cellules surexprimant *IFIH1* wt (222). Par ailleurs, Downes *et al.* ont développé un protocole de coloration intracellulaire pour détecter MDA5 par cytométrie en flux multicolore, ce qui leur a permis de quantifier la protéine dans des sous-ensembles de PBMCs. La quantité de MDA5 endogène mesurée s'est avérée inférieure pour trois individus hétérozygotes porteurs de l'allèle E627X (E627X/Wt), comparativement à des témoins, qui ne sont pas porteurs d'un allèle rare d'*IFIH1*(274). Ainsi, malgré le fait que l'un des deux allèles des PBMCs dérivées de l'individu comprenait un allèle wt, l'expression totale de MDA5 était diminuée, témoignant de l'impact des variants sur la stabilité de la protéine. La stabilité de MDA5 avec le variant I923V n'aurait pas été étudiée, mais il se pourrait qu'il ait un moins grand impact sur celle-ci, comparativement aux autres variants. En effet, les mutations Sp1, SP2 et E627X causent des délétions dans la protéine, alors que la mutation I923V est caractérisée par un seul changement d'acide aminé. Il se pourrait, par exemple, qu'elle affecte la liaison avec un régulateur de sa protéine, plutôt que la stabilité de celle-ci.

Les LCLs ont été reprogrammées en hiPSCs, puis le génotype a été validé par le séquençage de l'ADN génomique, pour toutes les lignées (Figure supplémentaire 4). Ces dernières ont par la suite été différenciées en sphéroïdes intestinaux. L'effet des variants sur la structure du transcrit (Figure

11A,B) et sur la protéine (Figure 11C) a alors été validé pour ces sphéroïdes, tel qu'il avait été fait pour les LCLs. Les patrons d'expression se sont révélés similaires à ceux exprimés pour les LCLs, à la fois pour les transcrits et pour les protéines (Figure 5B,C). Le variant E627X était complètement absent du gel identifiant le variant Sp2 (Figure 11B), ainsi que de la membrane d'immunobuvardage de type Western, renforçant le fait qu'il nuise à la stabilité de l'ARNm et/ou de la protéine.

Réponse des LCLs au poly (I:C)

Quelques études ont déjà testé l'effet des variants Sp1, Sp2, E627X et I923V suite à des stimulations avec le poly (I:C). Par exemple, la transfection avec du poly (I:C) de PBMCs obtenues d'individus porteurs des allèles wt d'*IFIH1* (témoins) a été associée à une plus grande expression d'*IFN- β* (IFN de type I), comparativement à des individus porteurs des variant I923V ou E627X (220). Par ailleurs, une autre étude a démontré que la surexpression des variants Sp1, Sp2 ou E627X dans des HEK293T n'induisait pas d'activité ATPase détectable lorsque les cellules étaient stimulées avec le poly (I:C), comparativement à la surexpression d'*IFIH1* wt, soulignant l'impact de la mutation sur cette dernière (222). En effet, l'activité ATPase est importante pour la formation d'un oligomère de MDA5 sur l'ARNdb, ainsi que pour le changement de conformation de la protéine permettant la libération des domaines CARDS qui peuvent alors activer MAVS (tel que décrit à la 1.6.4.2.3). Ainsi, une activité ATPase diminuée ou absente serait associée à une activation diminuée ou inexistante de la protéine MAVS qui mène normalement à la cascade moléculaire associée à la production d'IFNs (122).

Dans le cadre de ce projet, nous avons voulu tester l'effet du poly (I:C) sur ces variants exprimés de façon endogène, d'abord pour les LCLs dérivées de patients atteints des MII. À noter que toutes les lignées de LCLs (wt et mutantes) exprimaient des gènes associés aux mécanismes des IFNs (*IFIH1*, *IFNAR*, *TLR3*, etc.), selon un profil similaire, avant d'être stimulées. Ainsi, elles possédaient les mêmes molécules au niveau basal, pour induire ces mécanismes (Figure 6).

La nucléofection des LCLs avec du poly (I:C) de haut poids moléculaire a induit une expression d'*IFN- β* inférieure pour les différentes lignées mutantes, comparativement aux lignées wt (Figure

7). Cette différence d'expression d'*IFN-β* dans les LCLs stimulées est en effet significativement différente pour les lignées Sp1/Sp2, Sp2/Sp2 et Sp2/E627X, comparativement à l'une des deux ou aux deux lignées wt. Les variants E627X, Sp2 et Sp1 sont associés à des délétions dans la protéine. Ainsi, nous nous attendrions à une différence plus prononcée entre les lignées comprenant ces trois variants et lignées wt, plutôt qu'entre les lignées comprenant le variant I923V (un seul changement d'acide aminé) et les wt. La différence aurait effectivement tendance à être moins prononcée (non significative), pour les lignées Sp1/I923V et I923V/I923V, en comparaison aux deux lignées wt. Ces résultats sont cohérents avec la littérature.

Bien que le poly (I:C) soit largement utilisé pour étudier l'activité de MDA5, certaines limitations telle que la difficulté à reproduire des réponses similaires, probablement due au manque de stabilité de l'ARNdb, y sont associées (voir section 1.3.3.1.1). Nous avons donc voulu tester l'impact des génotypes sur l'induction d'*IFNs* dans des conditions plus physiologiques. Ainsi, nous avons infecté ces cellules avec l'EMCV, un virus pathologique transmis chez les animaux par la route fécale-orale et qui est couramment testé dans des études impliquant MDA5 (173). L'inhibition de la production d'*IFN-β* a entre autres été rapportée pour des MEFs de souris *IFIH1^{-/-}* (131).

Expression d'ADAM9 pour les infections avec l'EMCV

Nous avons d'abord tenté d'infecter les LCLs wt avec l'EMCV, mais nous obtenions une faible efficacité d'infection. Or, bien que les mécanismes d'adsorption de l'EMCV restent inconnus à ce jour, la protéine ADAM9 semble y jouer un rôle essentiel (269). L'ARNm d'*ADAM9* a alors été mesuré dans les LCLs et s'est avéré très peu exprimé (Figure 10C), expliquant possiblement la faible efficacité d'infection. À l'opposé, celui-ci était fortement exprimé dans des CEIs dérivées d'hiPSCs (Figure 10C), ce qui suggérait qu'il s'agissait d'un meilleur modèle pour les infections avec l'EMCV. En effet, l'infection des LCLs et des CEIs dérivées d'hiPSCs avec de l'EMCV (MOI de 1) a révélé que les CEIs exprimaient davantage d'ARN *EMCV 2A/2B* et d'*IFN-β* que les LCLs (Figure 10 A,B). Nous avons finalement décidé de ne pas infecter les différentes lignées de LCLs, jugeant que l'efficacité d'infection n'aurait pas été suffisante pour permettre une analyse rigoureuse des résultats entre les différents génotypes. Nous avons alors choisi de continuer à

travailler avec les CEIs dérivées d'hiPSCs afin d'étudier l'impact des variants dans *IFIH1* sur les mécanismes associés aux IFNs.

Validation/caractérisation sphéroïdes intestinaux

Avant de tester la fonction de MDA5 dans les CEIs dérivées d'hiPCs, le modèle a été caractérisé. Ainsi, pour les sphéroïdes, l'identité intestinale a été confirmée par l'analyse de différents marqueurs propres à l'intestin (qPCR), et ce, pour les différenciations associées aux protocoles 2D (Figure 12) et 3D (Figure 13). L'expression du gène CDX2 pour toutes les lignées des 2 protocoles témoigne de la présence de CEIs pour ces dernières. Plus spécifiquement, les marqueurs pour différents types de CEIs, soit ALPI (entérocytes), MUC2 (cellules caliciformes), CHGA (cellules entéro-endocrines) et LYZ (cellules de Paneth) étaient présents pour toutes les lignées des deux protocoles. Enfin, toutes les lignées semblaient présenter du mésenchyme (VIM), un élément intervenant dans le soutien des CEIs (275). Par ailleurs, ces cellules exprimaient différents gènes associés aux mécanismes des IFNs (ex. *IFNAR*, *IFNLRB*, *IFIH1*, etc.) de façon similaire, nous assurant que les cellules exprimaient les gènes de base pour répondre au poly (I:C) ou à l'EMCV (Figures 14 et 15).

Réponse des CEIs dérivées d'hiPSCs au poly (I:C)

Afin de déterminer un temps optimal pour transfecter les CEIs dérivées d'hiPSCs avec le poly (I:C), nous avons testé les temps 1 heure 30, 3 heures et 6 heures (Figure 16). Le temps de 6 heures a été retenu, étant donné qu'il y avait une transcription marquée d'*IFN-β* et d'*IL29* (IFN de type III). Comparativement aux autres moments, il y avait également une plus forte présence d'ISGs (*IFITM1* et *IFIH1*), comparativement au contrôle.

Fait intéressant, à 6 heures, lorsque du poly (I:C) était ajouté aux cellules sans lipofectamine, donc qu'il ne rentrait pas à l'intérieur de la cellule, la production d'*IFN-β* et d'*IL29* était faible (Figure 16). À l'opposé, elle était plus élevée pour les ISGs (*IFIH1* et *IFITM1*), sans être aussi importante que la condition avec lipofectamine. De façon générale, le poly (I:C) est reconnu pour activer TLR3, MDA5 et RIG-I. MDA5 serait plus spécifiquement activé par le poly (I:C) de haut poids

moléculaire et RIG-I, de plus petit poids moléculaire (134, 135). RIG-I et MDA5 sont des protéines intracellulaires et dans le cas des cellules épithéliales, TLR3 est extra et intracellulaire (152, 276). L'ajout de poly (I:C) sur les cellules sans lipofectamine, pourrait donc activer TLR3, qui pourrait à son tour induire la production d'IFNs (tel que décrit à la section 1.3.3.1.3). TLR3 ou une autre protéine mènerait peut-être à la production d'ISGs, sans passer par la production d'IFNs, via un mécanisme qui nous est inconnu. Afin d'explorer cette hypothèse, il pourrait être intéressant de neutraliser TLR3 extracellulaire avec un anticorps pour inhiber l'activation de ce dernier par le poly (I:C) (sans lipofectamine). Par ailleurs, il pourrait être intéressant de neutraliser les récepteurs des IFNs de type I et III, afin de mesurer plus directement la production d'IFN- β et d'IFN- λ et d'éviter la production d'ISGs qui comprennent entre autres les protéines IFN- β et MDA5 (106). Enfin, puisque l'effet du poly (I:C) extracellulaire sur les niveaux d'IFNs semble peu affecté à 6 heures, en contraste avec les ISGs où il semble y avoir une réponse, les expériences subséquentes (avec différents géotypes) ont visé les IFNs.

Les lignées wt K17945 et Sp2/E627X de CEIs ont alors été transfectées pendant 6 heures avec le poly (I:C). Une plus grande production d'*IFN- β* et d'*IL29* pour la lignée wt, comparativement à la lignée mutante a été ressortie (Figure 17). Ceci correspond aux résultats auxquels nous nous serions attendus, ils sont en effet compatibles avec les résultats pour les LCLs nucléofectées (Figure 7), ainsi qu'avec la littérature (220, 222).

Réponse des CEIs dérivées d'hiPSCs à l'EMCV

Dans une première série d'expériences, nous avons comparé la réponse à l'infection avec l'EMCV pendant 24 heures, entre une lignée de CEIs hétérozygote composée pour les mutations dans *IFIH1* (Sp2/E627X) et une lignée contrôle sans ces mutations (wt K17945). Ces expériences ont été effectuées sur des monocouches de CEIs, permettant ainsi d'obtenir des cellules polarisées et organisées et de se rapprocher de la physiologie de l'intestin (277). Dans la première expérience (Figure 18A,B,C), les cellules mutantes présentaient une plus grande transcription d'*IFN- β* (environ 5 fois plus) et une quantité similaire d'*IL29*, comparativement aux cellules wt. L'analyse de la quantité de virus faite via la mesure d'*EMCV 2A/2B* a révélé qu'elle était largement supérieure dans la lignée mutante, à l'opposé de la lignée wt (environ 9 fois plus). Ainsi,

relativement au niveau d'infection, la lignée Sp2/E627X présentait une plus faible transcription d'*IFN-β*, ce qui était d'autant plus prononcé pour l'expression d'*IL29*.

Nous avons alors répété ces infections sur ces mêmes lignées ensemencées sur plastique (Figure 18D,E,F). Cette fois, il y avait davantage d'IFNs transcrits pour la lignée wt, à l'opposé de la lignée mutante. Il y avait environ 2,5 fois plus de virus mesurés (EMCV 2A/2B) pour la lignée wt, comparativement à la lignée mutante. Toutefois, l'*IFN-β* était 4,3 fois supérieur et l'*IL29* était 10 fois supérieur pour la lignée wt. Ainsi, relativement au niveau d'infection, la production d'IFNs était supérieure pour la lignée wt, en comparaison avec la lignée mutante, ce qui valide les résultats de l'expérience précédente.

Enfin, pour déterminer si nos observations étaient maintenues avec un autre génotype dans les CEIs dérivées d'hiPSCs, nous avons étudié une lignée homozygote pour le mutant Sp2, en comparaison avec une autre lignée contrôle, sans ces mutations (wt K30281). Les cellules ont aussi été infectées avec l'EMCV, pendant 24 heures (Figure 18G,H,I). Bien que nous ayons mesuré un plus grand niveau d'infection pour la lignée Sp2/Sp2, en comparaison avec la lignée contrôle K30281, la production d'IFNs était inférieure. Enfin, les résultats de ces trois infections sont cohérents dans le sens que ces mutations d'*IFIH1* auraient pour effets d'induire une moins grande expression d'IFNs, comparativement au gène wt.

Les niveaux d'expression de gènes viraux mesurés dans les CEIs indiquent qu'il y a un taux d'infection variable entre les lignées, d'une expérience à l'autre. Bien que nous ayons contrôlé pour la variabilité observée dans nos analyses, il serait aussi important de la diminuer davantage pour les expériences futures. Un élément potentiel à considérer est lié à l'hétérogénéité cellulaire dans les cultures. En effet, il est connu que les organoïdes intestinaux présentent de l'hétérogénéité en ce qui concerne leur forme et leur taille, ce qui peut affecter le type cellulaire dans lesquels les cellules se différencient. Ainsi, ceci pourrait introduire de la variabilité dans les études (278, 279). Afin de limiter certains facteurs de confusion liés à l'hétérogénéité, il pourrait être intéressant d'opter pour un protocole favorisant la différenciation des organoïdes intestinaux vers un ou plusieurs types cellulaires spécifiques. Par exemple, la spécification en entérocytes est possible en ajoutant de l'acide valproïque et de l'inhibiteur de la production de WNT-2 (IWP-2) au milieu de

culture des organoïdes (280). Ceci pourrait être une avenue intéressante pour tenter d'uniformiser la composition des cellules et d'obtenir une efficacité d'infection similaire entre les lignées. Finalement, il sera tout de même important de répéter ces infections sur ces lignées, ainsi que sur nos autres lignées dérivées des patients, afin d'aider à diminuer l'incertitude reliée aux facteurs d'hétérogénéité. Un plus grand nombre d'échantillons permettra de valider que les variants nuisent à la production d'IFNs dans les CEIs, ce qui pourrait constituer un facteur de risque pour les MII.

Alternatives pour étudier les organoïdes intestinaux

Généralement, lorsque les microorganismes de la lumière intestinale parviennent à atteindre la barrière épithéliale, ils font un premier contact avec le côté apical des CEIs. Afin de se rapprocher des conditions physiologiques et d'infecter les organoïdes intestinaux sous leur forme 3D, il est possible d'effectuer des micro-injections afin de libérer le virus à l'intérieur de ceux-ci (281). Or, il s'agit d'une technique complexe qui nécessite beaucoup de temps. De plus, les résultats peuvent être faussés par une accessibilité de la surface apicale limitée par l'accumulation de mucus et de débris cellulaires à l'intérieur des organoïdes refermés (282).

La dissociation des sphéroïdes intestinaux en monocouches de CEIs est adaptée pour les tests fonctionnels. Elles ont l'avantage de présenter des jonctions intercellulaires, de se différencier dans les principaux types de CEIs et d'être polarisées. La culture de monocouche sur Transwell permet de contrôler séparément les côtés apical et basal, mais nécessite un grand nombre de cellules et cela prend plusieurs semaines avant d'obtenir un épithélium étanche (277). De manière intéressante, Co *et al.* ont développé un protocole permettant d'inverser la polarité d'entéroïdes (des sphéroïdes intestinaux dérivés de tissus gastro-intestinaux primaires et comprenant uniquement des CEIs), via la modification de protéines de la matrice extracellulaire (282). Ces entéroïdes conservent leur potentiel de différenciation dans les principaux types de CEIs et maintiennent leur polarité. Le côté apical fait alors face au milieu de culture et le côté basal à la lumière de l'entéroïde. Avec ce modèle, afin d'infecter les CEIs du côté apical, il serait alors possible de tout simplement ajouter les virus au milieu de culture. Ceci constitue une perspective intéressante qui permettrait d'économiser du temps et du matériel, par rapport aux monocouches de CEIs sur lesquels nous travaillons.

Régulateurs de MDA5

Dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes associés à la perte de fonction de la protéine due aux variants dans *IFIH1*, une piste intéressante à explorer serait l'interaction avec des régulateurs de la protéine. En effet, MDA5 est connu pour lier l'ARNdb avec une faible affinité. Or, ces liens peuvent être renforcés via des coactivateurs, tels que le *Tripartite motif containing 65* (TRIM65) et le *Interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase activator A* (PACT) (283). Il se pourrait qu'un ou plusieurs de nos quatre variants nuisent à la liaison de MDA5 à des régulateurs, ce qui impacterait la production d'IFNs et les mécanismes associés. Bien que plusieurs d'entre eux restent à être caractérisés, les sites de liaisons de certains régulateurs de MDA5 ont déjà été identifiés.

Par exemple, la protéine TRIM65 joue un rôle important dans l'activation et l'oligomérisation de MDA5 en ubiquitinisant sa lysine à la position 743. De plus, il a été démontré qu'elle intervient lors d'infections avec l'EMCV ou de stimulations au poly (I:C). Chez des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) et des macrophages dérivés de moelle osseuse (BMDMs) de souris *Trim65^{-/-}*, l'induction d'IRF3 et la production d'IFNs de type I associées à l'activation de MDA5 seraient abolies (284). La mutation E627X qui cause une protéine tronquée à partir de l'acide aminé de la position 618 ne possède alors pas la lysine 743, ce qui ne lui permet probablement pas d'interagir avec ce coactivateur. Ceci pourrait constituer une cause impliquée dans la perte de fonction de la protéine.

La protéine PACT qui facilite également l'oligomérisation de MDA5 est importante dans le cas d'infection avec l'EMCV ou de stimulation au poly (I:C). Cependant, elle n'a pas d'effet dans le cas où des mutants reconnus pour affecter l'oligomérisation adéquate et l'assemblage de filaments, tels que pour M570R/E572R et I841R/E842R (128, 283). La liaison de PACT avec MDA5 dans le cas de nos variants n'a pas été étudiée, mais elle pourrait potentiellement être affectée dans le cas de la mutation Sp2 qui cause une délétion dans le domaine C-terminal ou du mutant E627X qui cause aussi la délétion du domaine C-terminal, ainsi que d'une partie du domaine hélicase 2. Ceux-ci sont des domaines importants pour la liaison à l'ARNdb virale et pour l'oligomérisation.

La protéine *chromatin remodeler polybromo-1* (PBRM1) est un régulateur négatif du système immunitaire inné médié par les RLRs. Elle intervient dans la suppression de la transcription d'*IFIH1* et de *RIG-I*. Par ailleurs, elle interagirait principalement avec le domaine N-terminal de la protéine. Ainsi, outre que le fait que MDA5 présente une activité atténuée dans le cas de nos quatre variants, ce répresseur pourrait diminuer d'autant plus la production d'IFNs liée à MDA5. De manière intéressante, l'expression de *PBRM1* est inférieure dans le côlon et l'iléon terminal de patients atteints de MII, comparativement à des contrôles sains. Dans ces mêmes échantillons, *IFIH1* est d'ailleurs corrélé négativement à *PBRM1* et est donc plus fortement exprimé. Ainsi, la surexpression de MDA5 et la diminution de l'activité de celle-ci sont toutes les deux associées aux MII, ce qui souligne l'importance du maintien de l'équilibre des réponses immunitaires innées, afin d'éviter des phénomènes associés à l'inflammation chronique (285).

Il existe d'autres activateurs (DHX29, PKR, HOIL1, etc.) ou répresseurs (TRIM40, TRIM 13, RNF125, A20, USP3, etc.) de MDA5 (283, 284, 286). Pour la plupart d'entre eux, la localisation des sites de liaison avec la protéine, reste à être déterminée. Pour le futur, il serait intéressant de tester la liaison de ces différents régulateurs avec MDA5 par immunoprécipitation, pour nos différentes lignées stimulées avec l'EMCV. Dans l'éventualité où la liaison était affectée par un ou plusieurs variants, il serait alors possible de clarifier davantage les mécanismes associés à la perte de fonction de la protéine.

Hypothèses concernant la protection pour diabète de type 1 et le facteur de risque pour les MII et les complications lors d'infections respiratoires

Une hypothèse concernant la protection pour le diabète de type 1 par ces variants est qu'en condition normale, des virus s'attaqueraient à des cellules du pancréas, ce qui activerait les cellules dendritiques dérivées des monocytes. Ces dernières phagocyteraient les cellules infectées et activeraient les lymphocytes T CD4+ qui induiraient une défense antivirale. Par contre, il semblerait qu'une plus grande signalisation d'hélicases cytoplasmiques (comprennent les RLRs tel MDA5), augmente la capacité des cellules dendritiques dérivées de monocytes à stimuler la prolifération des cellules T CD4+ (287). En phagocytant les cellules infectées du pancréas, les cellules dendritiques pourraient également capturer des éléments de cellules saines. Ainsi, dans le

cas de la pathologie associée à *IFIH1* où la protéine serait fonctionnelle à sa pleine capacité (wt), il se pourrait que des cellules dendritiques présentent à leur surface des antigènes de cellules du soi, en plus d'antigènes pathogènes, et induiraient alors la prolifération d'une grande quantité de cellules T autoréactives. Ces dernières pourraient agir en s'attaquant aux cellules β du pancréas (réaction auto-immune). Il se pourrait ainsi que les mutants qui altèrent la fonction de la protéine agissent en atténuant ces mécanismes en cas d'infection virale et protègeraient l'hôte du diabète de type 1 (220). À l'opposé, dans le cas des MII ou des complications respiratoires lors d'infections, il se pourrait que ces variants dans *IFIH1* constituent des facteurs de risque, compte tenu du fait que les cellules intestinales ou pulmonaires sont plus directement exposées aux virus (présents dans le microbiote intestinal ou dans dans l'air ambiant), en comparaison avec le pancréas qui rentre seulement en contact avec les virus qui sont parvenus à atteindre la circulation sanguine. Ainsi, au niveau de l'intestin ou des poumons, il serait nécessaire que la réponse antivirale soit efficace à son plein potentiel, pour les protéger. Une faille à ce niveau qui serait due aux variants dans *IFIH1*, pourrait alors être associée à des cascades moléculaires pro-inflammatoires et/ou rendre vulnérable l'épithélium intestinal/pulmonaire. Ceci pourrait alors être associé au développement des MII et aux complications respiratoires.

Impact potentiel des variants d'*IFIH1*, entre autres dans le contexte de SARS-CoV-2

Selon une récente étude, la protéine MDA5 interagirait avec la *nonstructural protein 8* (NSP8) de SRAS-COV-2. Les domaines CARDS joueraient d'ailleurs un rôle important dans cette interaction (288). Par ailleurs, le variant rs1990760 (C>T; aaA946T) dans *IFIH1*, qui est connu pour augmenter l'activité de sa protéine, et par le fait même la production d'IFNs, pourrait être protecteur pour le coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV-2) (289). De plus, des variants causant des pertes de fonction dans certains gènes associés au mécanisme des IFNs (exemple IFNAR1, TLR3, IRF7, etc.) constitueraient des facteurs de risque pour le développement de pneumonie potentiellement mortelle, dans le cas de la COVID-19 (290). Une hypothèse pourrait que les quatre variants d'*IFIH1* qui diminuent la fonction de la protéine constitueraient des facteurs de risque pour des complications en cas d'infections virales. De manière intéressante, la présence des variants E627X, Sp1 et Sp2 a déjà été identifiée chez des

enfants hospitalisés pour des complications respiratoires suite à des infections avec le virus respiratoire syncytial et le rhinovirus humain (222).

Par ailleurs, il est connu que SARS-CoV-2 soit associé des symptômes gastro-intestinaux et de l'ARN viral du SARS-CoV-2 a été mesuré dans des selles d'individus infectés (291, 292). Les mécanismes responsables restent à être mieux compris, mais il se pourrait que le virus nuise à l'intégrité des CEIs. Dans ce contexte, il est possible de penser que l'infection avec SARS-COV-2, et de façon plus générale, avec d'autres virus pouvant infecter l'intestin, tel que le rotavirus ou le norovirus, interviennent dans le développement, la progression et la sévérité des MII chez des individus porteurs des variants causals. Étant donné que nous semblons observer une moins grande expression d'IFNs pour les CEIs avec les variants causals, comparativement à l'allèle wt, dans le cas d'infection avec l'EMCV, il se pourrait que nos quatre variants d'*IFIH1* nuisent à la clairance des virus. La clairance insuffisante du virus pourrait mener à la progression vers l'hyperinflammation (293). En effet, les mécanismes de défense antivirale ne seraient pas suffisamment efficaces pour permettre l'élimination de ceux-ci. L'omniprésence de certains virus pathogènes pourrait être associée à une libération constante de molécules pro-inflammatoires. Aussi, le virus toujours présent pourrait continuer à se diviser et à causer des dommages aux CEIs, tout en nuisant à la barrière intestinale. Rappelons que l'altération de cette dernière rend les cellules immunitaires de la lamina propria exposée à la lumière (91). La progression et la sévérité de la maladie pourraient alors être associées à des expositions répétées de l'intestin à différents virus, au cours de la vie. En effet, si la barrière intestinale est déjà affaiblie et que des mécanismes pro-inflammatoires sont en place, ces infections supplémentaires amplifieraient la boucle de réactions pro-inflammatoires associée à l'inflammation chronique. D'un autre côté, la sévérité de la maladie pourrait être due à d'autres facteurs, comme certaines infections tel que l'infection par le cytomégalovirus. En effet, une étude a démontré que ce virus pouvait rendre des patients atteints de MII réfractaires aux corticostéroïdes, aggravant alors la maladie (294). Les variants d'*IFIH1* qui diminuent la capacité de défense antivirale pourraient ainsi augmenter cet effet délétère dans le cas de certaines infections.

Enfin, dans l'optique où une plus grande production d'IFNs protègerait effectivement de la COVID-19, il a été suggéré que l'IFN- β puisse constituer un traitement potentiel pour cette dernière (289). Il s'agit d'ailleurs d'un traitement déjà approuvé, par exemple, dans le cadre de la

sclérose en plaques (295). Dans le contexte des MII, il pourrait être intéressant de tester l'effet de l'ajout d'IFN- β extracellulaire sur nos CEIs dérivées des patients porteurs des différents allèles d'*IFIH1*, en cas d'infection virale. Si les CEIs *in vitro* répondent positivement à l'IFN- β et qu'ils présentent une réponse antivirale se rapprochant aux lignées contrôles (*IFIH1* wt), il pourrait s'agir d'une avenue intéressante d'expérience *in vivo*. En effet, des souris porteuses des quatre variants d'*IFIH1* pourraient être traitées avec de l'IFN- β avant et/ou pendant une infection avec l'EMCV. Ceci pourrait servir à orienter le traitement des patients porteurs de ces variants et atteints des MII.

Virome dans le contexte des MII

Tel que décrit à la section 1.7, des études ont fait ressortir des différences au niveau du virome d'individus atteints ou non atteints de MII (225, 229). Il y aurait une plus grande quantité, mais une moins grande diversité de virus chez ces patients, à l'opposé de contrôles sains (225, 226). Par exemple, il y aurait plus de bactériophages (virus infectant les bactéries) de l'ordre des Caudovirales chez ces individus malades (228). Par ailleurs, des déséquilibres dans les communautés de bactériophages ont déjà été associés à des mécanismes inflammatoires et à l'apparition de lésions tissulaires (222). Il n'est toutefois pas encore clair si ces différences représentent une cause ou une conséquence des MII. Dans le contexte où MDA5 intervient dans les mécanismes de défense antivirale, il est intéressant d'étudier comment nos différents variants agissent spécifiquement en présence de particules virales obtenues du virome d'individus atteints ou non de MII, dans les CEIs dérivées d'hiPSCs. Ceci sera prochainement étudié en collaboration avec le laboratoire du Dre Jeffrey.

Chapitre 6 - Conclusion

En conclusion, les modèles de LCLs et de sphéroïdes intestinaux dérivés de patients MII sont intéressants pour étudier les variants dans *IFIH1* associés aux MII (I923V, E627X, *IFIH1**IVS8+1, (Sp1), (*IFIH1**IVS14+1 (Sp2)), afin de valider leur causalité et d'élucider leurs mécanismes. Tout d'abord, l'impact de ces derniers sur l'expression génique et protéique de *IFIH1*/MDA5 a été validé. Il semblerait que le variant E627X ait un plus gros impact sur ceux-ci, comme il n'est pas possible de le détecter par RT-PCR, ni par immunobuvardage de type Western. Par ailleurs, ces variants dans les deux modèles cellulaires sont associés à une moins grande expression d'IFNs, suite à une stimulation avec le poly (I:C) ou l'EMCV, comparativement aux lignées exprimant *IFIH1* wt. Ces résultats vont de pair avec la littérature et appuient notre hypothèse stipulant que ces variants nuisent à la réponse de défense antivirale des cellules intestinales. En cas d'infections virales, ceci pourrait alors déclencher l'expression de molécules pro-inflammatoires et/ou affecter l'étanchéité de la barrière intestinale, et ainsi être relié à l'inflammation chronique des patients atteints des MII. Pour l'avenir, il sera important de répéter les infections avec l'EMCV sur les CEIs dérivées d'hiPSCs et de composer avec quelques difficultés associées aux sphéroïdes intestinaux, tels que leur hétérogénéité. Le modèle de CEIs demeure cependant un modèle plus physiologique pour des études d'infection de cellules sous forme de monocouches humaines, comparativement à des lignées cellulaires immortelles provenant de cancer (HT29, CACO-2). Ces dernières sont reconnues pour présenter de la variabilité au niveau du génome, ce qui est problématique dans le cas d'études voulant comparer des génotypes précis (263). Enfin, la réalisation de ces expériences avec l'ensemble des variants dans *IFIH1* permettra une meilleure compréhension des mécanismes reliés au développement des MII, ce qui sera important dans l'optique du développement d'approches thérapeutiques personnalisées.

Bibliographie

1. Tortora GJ, Nielsen MT. Principles of human anatomy. 13th edition. ed. Hoboken, New Jersey: Wiley; 2014. xxiv, 894 pages p.
2. Poitras P, Blouin M, Bilodeau M. L'appareil digestif : des sciences fondamentales à la clinique. Troisième édition revue et augmentée. ed. Montréal: Presses de l'Université de Montréal; 2020. 1 ressource en ligne p.
3. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(11):686-96.
4. de Lau W, Kujala P, Schneeberger K, Middendorp S, Li VS, Barker N, et al. Peyer's patch M cells derived from Lgr5(+) stem cells require SpiB and are induced by RankL in cultured "miniguts". *Mol Cell Biol.* 2012;32(18):3639-47.
5. Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):19-33.
6. Klunder LJ, Faber KN, Dijkstra G, van ISCD. Mechanisms of Cell Polarity-Controlled Epithelial Homeostasis and Immunity in the Intestine. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(7).
7. Garcia MA, Nelson WJ, Chavez N. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(4).
8. Al-Ghadban S, Kaissi S, Homaidan FR, Naim HY, El-Sabban ME. Cross-talk between intestinal epithelial cells and immune cells in inflammatory bowel disease. *Sci Rep.* 2016;6:29783.
9. Forget J. Cahier de biologie cellulaire. 3e édition. ed. Outremont: Les éditions du passage; 2010. 197 pages diversement numérotées, 87 feuillets de planche diversement numérotées p.
10. Lee B, Moon KM, Kim CY. Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals. *J Immunol Res.* 2018;2018:2645465.
11. Vancamelbeke M, Vermeire S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;11(9):821-34.
12. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(3):572-87.
13. Allaire JM, Crowley SM, Law HT, Chang SY, Ko HJ, Vallance BA. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 2018;39(9):677-96.

14. Bakshi S, Sanz Garcia R, Van der Weken H, Tharad A, Pandey S, Juarez P, et al. Evaluating single-domain antibodies as carriers for targeted vaccine delivery to the small intestinal epithelium. *J Control Release*. 2020;321:416-29.
15. Hegyi P, Maleth J, Walters JR, Hofmann AF, Keely SJ. Guts and Gall: Bile Acids in Regulation of Intestinal Epithelial Function in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2018;98(4):1983-2023.
16. Ko CW, Qu J, Black DD, Tso P. Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2020;17(3):169-83.
17. Vaishnava S, Yamamoto M, Severson KM, Ruhn KA, Yu X, Koren O, et al. The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*. 2011;334(6053):255-8.
18. Allaire JM, Morampudi V, Crowley SM, Stahl M, Yu H, Bhullar K, et al. Frontline defenders: goblet cell mediators dictate host-microbe interactions in the intestinal tract during health and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018;314(3):G360-G77.
19. Cone RA. Barrier properties of mucus. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(2):75-85.
20. Pelaseyed T, Bergstrom JH, Gustafsson JK, Ermund A, Birchenough GM, Schutte A, et al. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*. 2014;260(1):8-20.
21. Birchenough GM, Johansson ME, Gustafsson JK, Bergstrom JH, Hansson GC. New developments in goblet cell mucus secretion and function. *Mucosal Immunol*. 2015;8(4):712-9.
22. Gribble FM, Reimann F. Enteroendocrine Cells: Chemosensors in the Intestinal Epithelium. *Annu Rev Physiol*. 2016;78:277-99.
23. Worthington JJ, Reimann F, Gribble FM. Enteroendocrine cells-sensory sentinels of the intestinal environment and orchestrators of mucosal immunity. *Mucosal Immunol*. 2018;11(1):3-20.
24. Latorre R, Sternini C, De Giorgio R, Greenwood-Van Meerveld B. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(5):620-30.
25. Psichas A, Reimann F, Gribble FM. Gut chemosensing mechanisms. *J Clin Invest*. 2015;125(3):908-17.

26. Chimere C, Emery E, Summers DK, Keyser U, Gribble FM, Reimann F. Bacterial metabolite indole modulates incretin secretion from intestinal enteroendocrine L cells. *Cell Rep*. 2014;9(4):1202-8.
27. Zhang JG, Cong B, Li QX, Chen HY, Qin J, Fu LH. Cholecystokinin octapeptide regulates lipopolysaccharide-activated B cells co-stimulatory molecule expression and cytokines production in vitro. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011;33(1):157-63.
28. Liu L, Tan Q, Hu B, Wu H, Wang C, Liu R, et al. Somatostatin Improved B Cells Mature in Macaques during Intestinal Ischemia-Reperfusion. *PLoS One*. 2015;10(7):e0133692.
29. Sung EZ, Da Silva NF, Goodyear SJ, McTernan PG, Arasaradnam RP, Nwokolo CU. Ghrelin promotes nuclear factor kappa-B activation in a human B-lymphocyte cell line. *Mol Biol Rep*. 2011;38(8):4833-8.
30. Saada S, Marget P, Fauchais AL, Lise MC, Chemin G, Sindou P, et al. Differential expression of neurotensin and specific receptors, NTSR1 and NTSR2, in normal and malignant human B lymphocytes. *J Immunol*. 2012;189(11):5293-303.
31. Holly MK, Smith JG. Paneth Cells during Viral Infection and Pathogenesis. *Viruses*. 2018;10(5).
32. Date S, Sato T. Mini-gut organoids: reconstitution of the stem cell niche. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:269-89.
33. Wehkamp J, Chu H, Shen B, Feathers RW, Kays RJ, Lee SK, et al. Paneth cell antimicrobial peptides: topographical distribution and quantification in human gastrointestinal tissues. *FEBS Lett*. 2006;580(22):5344-50.
34. Cibulka MT, Sinacore DR, Cromer GS, Delitto A. Unilateral hip rotation range of motion asymmetry in patients with sacroiliac joint regional pain. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1998;23(9):1009-15.
35. Salzman NH. Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: detente at mucosal surfaces. *Gut Microbes*. 2010;1(6):401-6.
36. Rothenberg ME, Nusse Y, Kalisky T, Lee JJ, Dalerba P, Scheeren F, et al. Identification of a cKit(+) colonic crypt base secretory cell that supports Lgr5(+) stem cells in mice. *Gastroenterology*. 2012;142(5):1195-205 e6.
37. Albarracin L, Komatsu R, Garcia-Castillo V, Aso H, Iwabuchi N, Xiao JZ, et al. Deciphering the influence of paraimmunobiotic bifidobacteria on the innate antiviral immune

response of bovine intestinal epitheliocytes by transcriptomic analysis. *Benef Microbes*. 2019;10(2):199-209.

38. McKinley ET, Sui Y, Al-Kofahi Y, Millis BA, Tyska MJ, Roland JT, et al. Optimized multiplex immunofluorescence single-cell analysis reveals tuft cell heterogeneity. *JCI Insight*. 2017;2(11).

39. Nevo S, Kadouri N, Abramson J. Tuft cells: From the mucosa to the thymus. *Immunol Lett*. 2019;210:1-9.

40. Banerjee A, McKinley ET, von Moltke J, Coffey RJ, Lau KS. Interpreting heterogeneity in intestinal tuft cell structure and function. *J Clin Invest*. 2018;128(5):1711-9.

41. Schneider C, O'Leary CE, Locksley RM. Regulation of immune responses by tuft cells. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(9):584-93.

42. Haber AL, Biton M, Rogel N, Herbst RH, Shekhar K, Smillie C, et al. A single-cell survey of the small intestinal epithelium. *Nature*. 2017;551(7680):333-9.

43. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*. 2013;6(4):666-77.

44. Rouch JD, Scott A, Lei NY, Solorzano-Vargas RS, Wang J, Hanson EM, et al. Development of Functional Microfold (M) Cells from Intestinal Stem Cells in Primary Human Enteroids. *PLoS One*. 2016;11(1):e0148216.

45. Kobayashi N, Takahashi D, Takano S, Kimura S, Hase K. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:2345.

46. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(10):667-85.

47. Valdes AM, Walter J, Segal E, Spector TD. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018;361:k2179.

48. Kastl AJ, Jr., Terry NA, Wu GD, Albenberg LG. The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2020;9(1):33-45.

49. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124(4):837-48.

50. Rodriguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:26050.
51. Backhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 2015;17(6):852.
52. Bibbo S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrri F, Masucci L, Gasbarrini A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(22):4742-9.
53. Desai MS, Seekatz AM, Koropatkin NM, Kamada N, Hickey CA, Wolter M, et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell.* 2016;167(5):1339-53 e21.
54. Lu VB, Gribble FM, Reimann F. Free Fatty Acid Receptors in Enteroendocrine Cells. *Endocrinology.* 2018;159(7):2826-35.
55. Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science.* 2018;359(6380):1151-6.
56. Musso P, Chiappini E, Bernardini R. Human Microbiome and Allergic Diseases in Children: Pathogenetic Role and Therapeutic Options. *Curr Pediatr Rev.* 2020;16(2):89-94.
57. Becattini S, Taur Y, Pamer EG. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. *Trends Mol Med.* 2016;22(6):458-78.
58. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut.* 2016;65(2):330-9.
59. Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, et al. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol.* 2006;4(1):e3.
60. Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, Boling L, et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun.* 2014;5:4498.
61. Yutin N, Makarova KS, Gussow AB, Krupovic M, Segall A, Edwards RA, et al. Discovery of an expansive bacteriophage family that includes the most abundant viruses from the human gut. *Nat Microbiol.* 2018;3(1):38-46.
62. Cadwell K. Expanding the role of the virome: commensalism in the gut. *J Virol.* 2015;89(4):1951-3.

63. Beller L, Matthijssens J. What is (not) known about the dynamics of the human gut virome in health and disease. *Curr Opin Virol.* 2019;37:52-7.
64. Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES, Novik GI. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol.* 2010;59(3):145-55.
65. Neil JA, Cadwell K. The Intestinal Virome and Immunity. *J Immunol.* 2018;201(6):1615-24.
66. Oliver KM, Degnan PH, Hunter MS, Moran NA. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science.* 2009;325(5943):992-4.
67. Barr JJ, Auro R, Furlan M, Whiteson KL, Erb ML, Pogliano J, et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(26):10771-6.
68. Metzger RN, Krug AB, Eisenacher K. Enteric Virome Sensing-Its Role in Intestinal Homeostasis and Immunity. *Viruses.* 2018;10(4).
69. Lee S, Wilen CB, Orvedahl A, McCune BT, Kim KW, Orchard RC, et al. Norovirus Cell Tropism Is Determined by Combinatorial Action of a Viral Non-structural Protein and Host Cytokine. *Cell Host Microbe.* 2017;22(4):449-59 e4.
70. Kernbauer E, Ding Y, Cadwell K. An enteric virus can replace the beneficial function of commensal bacteria. *Nature.* 2014;516(7529):94-8.
71. Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, et al. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science.* 2017;356(6333):44-50.
72. Santos AJM, Lo YH, Mah AT, Kuo CJ. The Intestinal Stem Cell Niche: Homeostasis and Adaptations. *Trends Cell Biol.* 2018;28(12):1062-78.
73. Ermund A, Schutte A, Johansson ME, Gustafsson JK, Hansson GC. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(5):G341-7.
74. Chang CS, Chen GH, Lien HC, Yeh HZ. Small intestine dysmotility and bacterial overgrowth in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Hepatology.* 1998;28(5):1187-90.

75. Cremer J, Segota I, Yang CY, Arnoldini M, Sauls JT, Zhang Z, et al. Effect of flow and peristaltic mixing on bacterial growth in a gut-like channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(41):11414-9.
76. Wouters MM, Boeckxstaens GE. Neuroimmune mechanisms in functional bowel disorders. *Neth J Med*. 2011;69(2):55-61.
77. Lai NY, Musser MA, Pinho-Ribeiro FA, Baral P, Jacobson A, Ma P, et al. Gut-Innervating Nociceptor Neurons Regulate Peyer's Patch Microfold Cells and SFB Levels to Mediate Salmonella Host Defense. *Cell*. 2020;180(1):33-49 e22.
78. Pinho-Ribeiro FA, Verri WA, Jr., Chiu IM. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends Immunol*. 2017;38(1):5-19.
79. Ramirez VT, Sladek J, Godinez DR, Rude KM, Chicco P, Murray K, et al. Sensory Nociceptive Neurons Contribute to Host Protection During Enteric Infection With *Citrobacter rodentium*. *J Infect Dis*. 2020;221(12):1978-88.
80. Matthews JD, Owens JA, Naudin CR, Saeedi BJ, Alam A, Reedy AR, et al. Neutrophil-Derived Reactive Oxygen Orchestrates Epithelial Cell Signaling Events during Intestinal Repair. *Am J Pathol*. 2019;189(11):2221-32.
81. Iatsenko I, Boquete JP, Lemaitre B. Microbiota-Derived Lactate Activates Production of Reactive Oxygen Species by the Intestinal NADPH Oxidase Nox and Shortens *Drosophila* Lifespan. *Immunity*. 2018;49(5):929-42 e5.
82. Modun D, Giustarini D, Tsikas D. Nitric oxide-related oxidative stress and redox status in health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:129651.
83. Bourgonje AR, Feelisch M, Faber KN, Pasch A, Dijkstra G, van Goor H. Oxidative Stress and Redox-Modulating Therapeutics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Mol Med*. 2020.
84. Kim R, Attayek PJ, Wang Y, Furtado KL, Tamayo R, Sims CE, et al. An in vitro intestinal platform with a self-sustaining oxygen gradient to study the human gut/microbiome interface. *Biofabrication*. 2019;12(1):015006.
85. Shah YM. The role of hypoxia in intestinal inflammation. *Mol Cell Pediatr*. 2016;3(1):1.
86. Colgan SP, Campbell EL. Oxygen metabolism and innate immune responses in the gut. *J Appl Physiol (1985)*. 2017;123(5):1321-7.

87. Grootjans J, Krupka N, Hosomi S, Matute JD, Hanley T, Saveljeva S, et al. Epithelial endoplasmic reticulum stress orchestrates a protective IgA response. *Science*. 2019;363(6430):993-8.
88. Duvigneau JC, Luis A, Gorman AM, Samali A, Kaltenecker D, Moriggl R, et al. Crosstalk between inflammatory mediators and endoplasmic reticulum stress in liver diseases. *Cytokine*. 2019;124:154577.
89. Blander JM, Longman RS, Iliev ID, Sonnenberg GF, Artis D. Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host. *Nat Immunol*. 2017;18(8):851-60.
90. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*. 2015;16(4):343-53.
91. Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001;2(4):361-7.
92. Olivares-Villagomez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol*. 2018;39(4):264-75.
93. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*. 1996;381(6585):751-8.
94. Seifert M, Kuppers R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283-92.
95. Ma H, Tao W, Zhu S. T lymphocytes in the intestinal mucosa: defense and tolerance. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(3):216-24.
96. Owen JA, Punt J, Stranford SA, Jones PP, Owen JA, Kuby J. *Kuby Immunologie*. 7e édition. ed. Paris: Dunod; 2014. xxix, 800 pages p.
97. Muthana SM, Xia L, Campbell CT, Zhang Y, Gildersleeve JC. Competition between serum IgG, IgM, and IgA anti-glycan antibodies. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119298.
98. McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Lamm ME. Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. *J Exp Med*. 1977;145(4):866-75.
99. Bunker JJ, Bendelac A. IgA Responses to Microbiota. *Immunity*. 2018;49(2):211-24.
100. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(1):36-49.

101. Kaetzel CS. The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev.* 2005;206:83-99.
102. Donaldson GP, Ladinsky MS, Yu KB, Sanders JG, Yoo BB, Chou WC, et al. Gut microbiota utilize immunoglobulin A for mucosal colonization. *Science.* 2018;360(6390):795-800.
103. Poggi A, Benelli R, Vene R, Costa D, Ferrari N, Tosetti F, et al. Human Gut-Associated Natural Killer Cells in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:961.
104. Mayassi T, Jabri B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol.* 2018;11(5):1281-9.
105. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
106. Pervolaraki K, Rastgou Talemi S, Albrecht D, Bormann F, Bamford C, Mendoza JL, et al. Differential induction of interferon stimulated genes between type I and type III interferons is independent of interferon receptor abundance. *PLoS Pathog.* 2018;14(11):e1007420.
107. Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity.* 2019;50(4):907-23.
108. de Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol Cell Biol.* 2012;90(5):483-91.
109. Zhou JH, Wang YN, Chang QY, Ma P, Hu Y, Cao X. Type III Interferons in Viral Infection and Antiviral Immunity. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(1):173-85.
110. Kotenko SV, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J Biol Chem.* 2017;292(18):7295-303.
111. Chen K, Liu J, Cao X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *J Autoimmun.* 2017;83:1-11.
112. Chow KT, Gale M, Jr., Loo YM. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol.* 2018;36:667-94.
113. MacDuff DA, Baldrige MT, Qaqish AM, Nice TJ, Darbandi AD, Hartley VL, et al. HOIL1 Is Essential for the Induction of Type I and III Interferons by MDA5 and Regulates Persistent Murine Norovirus Infection. *J Virol.* 2018;92(23).

114. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, et al. Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nat Immunol.* 2014;15(8):717-26.
115. Onoguchi K, Yoneyama M, Takemura A, Akira S, Taniguchi T, Namiki H, et al. Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism. *J Biol Chem.* 2007;282(10):7576-81.
116. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34(3):796-805.
117. Ank N, Iversen MB, Bartholdy C, Staeheli P, Hartmann R, Jensen UB, et al. An important role for type III interferon (IFN-lambda/IL-28) in TLR-induced antiviral activity. *J Immunol.* 2008;180(4):2474-85.
118. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* 2005;175(5):2851-8.
119. Singh M, Brahma B, Maharana J, Patra MC, Kumar S, Mishra P, et al. Insight into buffalo (*Bubalus bubalis*) RIG1 and MDA5 receptors: a comparative study on dsRNA recognition and in-vitro antiviral response. *PLoS One.* 2014;9(2):e89788.
120. Barrat FJ, Elkon KB, Fitzgerald KA. Importance of Nucleic Acid Recognition in Inflammation and Autoimmunity. *Annu Rev Med.* 2016;67:323-36.
121. Bender S, Reuter A, Eberle F, Einhorn E, Binder M, Bartenschlager R. Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* 2015;11(11):e1005264.
122. Brisse M, Ly H. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol.* 2019;10:1586.
123. Osterlund PI, Pietila TE, Veckman V, Kotenko SV, Julkunen I. IFN regulatory factor family members differentially regulate the expression of type III IFN (IFN-lambda) genes. *J Immunol.* 2007;179(6):3434-42.

124. Yoboua F, Martel A, Duval A, Mukawera E, Grandvaux N. Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *J Virol.* 2010;84(14):7267-77.
125. Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys.* 2013;42:443-68.
126. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity.* 2008;29(4):538-50.
127. Peisley A, Jo MH, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Walz T, et al. Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(49):E3340-9.
128. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, et al. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell.* 2013;152(1-2):276-89.
129. Dias Junior AG, Sampaio NG, Rehwinkel J. A Balancing Act: MDA5 in Antiviral Immunity and Autoinflammation. *Trends Microbiol.* 2019;27(1):75-85.
130. Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, et al. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(52):21010-5.
131. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-5.
132. Anchisi S, Guerra J, Garcin D. RIG-I ATPase activity and discrimination of self-RNA versus non-self-RNA. *mBio.* 2015;6(2):e02349.
133. Fortier ME, Kent S, Ashdown H, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The viral mimic, polyinosinic:polycytidylic acid, induces fever in rats via an interleukin-1-dependent mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(4):R759-66.
134. Yoshino H, Saitoh T, Kozakai M, Kashiwakura I. Effects of ionizing radiation on retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. *Biomed Rep.* 2015;3(1):59-62.
135. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol.* 2009;83(20):10761-9.

136. Mian MF, Ahmed AN, Rad M, Babaian A, Bowdish D, Ashkar AA. Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. *J Leukoc Biol.* 2013;94(5):1025-36.
137. Oberson A, Spagnuolo L, Puddinu V, Barchet W, Rittner K, Bourquin C. NAB2 is a novel immune stimulator of MDA-5 that promotes a strong type I interferon response. *Oncotarget.* 2018;9(5):5641-51.
138. Gale ECR, G. A.; Smith, A.A.A.; Alcantara-Hernandez, M.; Idoyaga, J.; Appel, E. A. A Nanoparticle Platform for Improved Potency, Stability, and Adjuvanticity of Poly(I:C). *Advanced Therapeutics.* 2019;3(1).
139. Broquet AH, Hirata Y, McAllister CS, Kagnoff MF. RIG-I/MDA5/MAVS are required to signal a protective IFN response in rotavirus-infected intestinal epithelium. *J Immunol.* 2011;186(3):1618-26.
140. Sanchez David RY, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, et al. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *Elife.* 2016;5:e11275.
141. Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, Kirchhofer A, Lammens K, Lammens A, et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(6):2014-25.
142. Rodriguez KR, Bruns AM, Horvath CM. MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *J Virol.* 2014;88(15):8194-200.
143. Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine.* 2015;74(2):198-206.
144. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell.* 2014;55(5):771-81.
145. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol.* 2006;80(24):12332-42.
146. Venkataraman T, Valdes M, Elsbey R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol.* 2007;178(10):6444-55.

147. Deddouche S, Goubau D, Rehwinkel J, Chakravarty P, Begum S, Maillard PV, et al. Identification of an LGP2-associated MDA5 agonist in picornavirus-infected cells. *Elife*. 2014;3:e01535.
148. Mukherjee S, Huda S, Sinha Babu SP. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. *Scand J Immunol*. 2019;90(1):e12771.
149. Miyake K, Shibata T, Ohto U, Shimizu T, Saitoh SI, Fukui R, et al. Mechanisms controlling nucleic acid-sensing Toll-like receptors. *Int Immunol*. 2018;30(2):43-51.
150. Sesti-Costa R, Francozo MCS, Silva GK, Proenca-Modena JL, Silva JS. TLR3 is required for survival following Coxsackievirus B3 infection by driving T lymphocyte activation and polarization: The role of dendritic cells. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185819.
151. Macpherson C, Audy J, Mathieu O, Tompkins TA. Multistrain probiotic modulation of intestinal epithelial cells' immune response to a double-stranded RNA ligand, poly(i.c). *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(5):1692-700.
152. Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol*. 2012;86(6):2900-10.
153. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16(1):3-9.
154. Lind K, Svedin E, Domsgen E, Kapell S, Laitinen OH, Moll M, et al. Coxsackievirus counters the host innate immune response by blocking type III interferon expression. *J Gen Virol*. 2016;97(6):1368-80.
155. Malik A, Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(23):3955-63.
156. Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, et al. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol*. 2009;10(10):1073-80.
157. Wang P, Zhu S, Yang L, Cui S, Pan W, Jackson R, et al. Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. *Science*. 2015;350(6262):826-30.
158. Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, et al. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell*. 2011;145(5):745-57.
159. Pervolaraki K, Stanifer ML, Munchau S, Renn LA, Albrecht D, Kurzhals S, et al. Type I and Type III Interferons Display Different Dependency on Mitogen-Activated Protein Kinases to Mount an Antiviral State in the Human Gut. *Front Immunol*. 2017;8:459.

160. Lee SJ, Kim WJ, Moon SK. Role of the p38 MAPK signaling pathway in mediating interleukin-28A-induced migration of UMUC-3 cells. *Int J Mol Med*. 2012;30(4):945-52.
161. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:513-45.
162. Reis e Sousa C. Sensing infection and tissue damage. *EMBO Mol Med*. 2017;9(3):285-8.
163. Bhushal S, Wolfsmuller M, Selvakumar TA, Kemper L, Wirth D, Hornef MW, et al. Cell Polarization and Epigenetic Status Shape the Heterogeneous Response to Type III Interferons in Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2017;8:671.
164. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013;340(6137):1190-4.
165. Selvakumar TA, Bhushal S, Kalinke U, Wirth D, Hauser H, Koster M, et al. Identification of a Predominantly Interferon-lambda-Induced Transcriptional Profile in Murine Intestinal Epithelial Cells. *Front Immunol*. 2017;8:1302.
166. Hakim MS, Chen S, Ding S, Yin Y, Ikram A, Ma XX, et al. Basal interferon signaling and therapeutic use of interferons in controlling rotavirus infection in human intestinal cells and organoids. *Sci Rep*. 2018;8(1):8341.
167. Saxena K, Simon LM, Zeng XL, Blutt SE, Crawford SE, Sastri NP, et al. A paradox of transcriptional and functional innate interferon responses of human intestinal enteroids to enteric virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(4):E570-E9.
168. Lin JD, Feng N, Sen A, Balan M, Tseng HC, McElrath C, et al. Distinct Roles of Type I and Type III Interferons in Intestinal Immunity to Homologous and Heterologous Rotavirus Infections. *PLoS Pathog*. 2016;12(4):e1005600.
169. Pott J, Mahlakoiv T, Mordstein M, Duerr CU, Michiels T, Stockinger S, et al. IFN-lambda determines the intestinal epithelial antiviral host defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(19):7944-9.
170. Steele JC, Jr. Rotavirus. *Clin Lab Med*. 1999;19(3):691-703.
171. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol*. 2008;82(1):335-45.
172. Nice TJ, Baldrige MT, McCune BT, Norman JM, Lazear HM, Artyomov M, et al. Interferon-lambda cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity. *Science*. 2015;347(6219):269-73.

173. Gelmetti D, Meroni A, Brocchi E, Koenen F, Cammarata G. Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis. *Vet Res.* 2006;37(1):15-23.
174. Carocci M, Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus. *Virulence.* 2012;3(4):351-67.
175. Mahlakoiv T, Hernandez P, Gronke K, Diefenbach A, Staeheli P. Leukocyte-derived IFN-alpha/beta and epithelial IFN-lambda constitute a compartmentalized mucosal defense system that restricts enteric virus infections. *PLoS Pathog.* 2015;11(4):e1004782.
176. Thaiss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature.* 2016;535(7610):65-74.
177. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell.* 2004;118(2):229-41.
178. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(12):821-32.
179. Peterson DA, McNulty NP, Guruge JL, Gordon JI. IgA response to symbiotic bacteria as a mediator of gut homeostasis. *Cell Host Microbe.* 2007;2(5):328-39.
180. Chapel H, Lucas M, Lee M, Bjorkander J, Webster D, Grimbacher B, et al. Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood.* 2008;112(2):277-86.
181. Kaplan GG, Bernstein CN, Coward S, Bitton A, Murthy SK, Nguyen GC, et al. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Epidemiology. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2019;2(Suppl 1):S6-S16.
182. Benchimol EI, Bernstein CN, Bitton A, Murthy SK, Nguyen GC, Lee K, et al. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: A Scientific Report from the Canadian Gastro-Intestinal Epidemiology Consortium to Crohn's and Colitis Canada. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2019;2(Suppl 1):S1-S5.
183. Darr U, Khan N. Treat to Target in Inflammatory Bowel Disease: An Updated Review of Literature. *Curr Treat Options Gastroenterol.* 2017;15(1):116-25.
184. Ruel J, Ruane D, Mehandru S, Gower-Rousseau C, Colombel JF. IBD across the age spectrum: is it the same disease? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(2):88-98.

185. Bernstein CN. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2001;3(6):477-83.
186. Bernstein CN, Benchimol EI, Bitton A, Murthy SK, Nguyen GC, Lee K, et al. The Impact of Inflammatory Bowel Disease in Canada 2018: Extra-intestinal Diseases in IBD. *J Can Assoc Gastroenterol.* 2019;2(Suppl 1):S73-S80.
187. Bernstein CN, Nugent Z, Targownik LE, Singh H, Lix LM. Predictors and risks for death in a population-based study of persons with IBD in Manitoba. *Gut.* 2015;64(9):1403-11.
188. Kamp K, Dudley-Brown S, Heitkemper M, Wyatt G, Given B. Symptoms among emerging adults with inflammatory bowel disease: a descriptive study. *Res Nurs Health.* 2020;43(1):48-55.
189. Weisshof R, Chermesh I. Micronutrient deficiencies in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015;18(6):576-81.
190. Rigottier-Gois L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J.* 2013;7(7):1256-61.
191. Lix LM, Graff LA, Walker JR, Clara I, Rawsthorne P, Rogala L, et al. Longitudinal study of quality of life and psychological functioning for active, fluctuating, and inactive disease patterns in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2008;14(11):1575-84.
192. Wang Y, Parker CE, Bhanji T, Feagan BG, MacDonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;4:CD000543.
193. Vavricka SR, Schoepfer AM, Scharl M, Rogler G. Steroid use in Crohn's disease. *Drugs.* 2014;74(3):313-24.
194. Sadowski DC, Bernstein CN, Bitton A, Croitoru K, Fedorak RN, Griffiths A, et al. Canadian Association of Gastroenterology Clinical Practice Guidelines: The use of tumour necrosis factor-alpha antagonist therapy in Crohn's disease. *Can J Gastroenterol.* 2009;23(3):185-202.
195. Iskandar HN, Dhere T, Farraye FA. Ulcerative Colitis: Update on Medical Management. *Curr Gastroenterol Rep.* 2015;17(11):44.
196. Devaraj B, Kaiser AM. Surgical management of ulcerative colitis in the era of biologicals. *Inflamm Bowel Dis.* 2015;21(1):208-20.
197. Wall CL, Day AS, Geary RB. Use of exclusive enteral nutrition in adults with Crohn's disease: a review. *World J Gastroenterol.* 2013;19(43):7652-60.

198. Piovani D, Danese S, Peyrin-Biroulet L, Nikolopoulos GK, Lytras T, Bonovas S. Environmental Risk Factors for Inflammatory Bowel Diseases: An Umbrella Review of Meta-analyses. *Gastroenterology*. 2019;157(3):647-59 e4.
199. Benchimol EI, Mack DR, Guttman A, Nguyen GC, To T, Mojaverian N, et al. Inflammatory bowel disease in immigrants to Canada and their children: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(4):553-63.
200. Okada H, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2010;160(1):1-9.
201. Cholapranee A, Ananthakrishnan AN. Environmental Hygiene and Risk of Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2016;22(9):2191-9.
202. Wang Q, Xu KQ, Qin XR, Wen L, Yan L, Wang XY. Association between physical activity and inflammatory bowel disease risk: A meta-analysis. *Dig Liver Dis*. 2016;48(12):1425-31.
203. Liu X, Wu Y, Li F, Zhang D. Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease: result from a meta-analysis. *Nutr Res*. 2015;35(9):753-8.
204. Del Pinto R, Pietropaoli D, Chandar AK, Ferri C, Cominelli F. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2708-17.
205. Ananthakrishnan AN, Nguyen DD, Sauk J, Yajnik V, Xavier RJ. Genetic polymorphisms in metabolizing enzymes modifying the association between smoking and inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(5):783-9.
206. Halfvarson J, Bodin L, Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*. 2003;124(7):1767-73.
207. Loddo I, Romano C. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Front Immunol*. 2015;6:551.
208. Roth MP, Petersen GM, McElree C, Vadheim CM, Panish JF, Rotter JI. Familial empiric risk estimates of inflammatory bowel disease in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*. 1989;96(4):1016-20.
209. Bernstein CN, Rawsthorne P, Cheang M, Blanchard JF. A population-based case control study of potential risk factors for IBD. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(5):993-1002.

210. Uhlig HH, Muise AM. Clinical Genomics in Inflammatory Bowel Disease. *Trends Genet.* 2017;33(9):629-41.
211. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature.* 2012;491(7422):119-24.
212. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010;11(6):415-25.
213. Waltoft BL, Pedersen CB, Nyegaard M, Hobolth A. The importance of distinguishing between the odds ratio and the incidence rate ratio in GWAS. *BMC Med Genet.* 2015;16:71.
214. Schaid DJ, Chen W, Larson NB. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nat Rev Genet.* 2018;19(8):491-504.
215. Spain SL, Barrett JC. Strategies for fine-mapping complex traits. *Hum Mol Genet.* 2015;24(R1):R111-9.
216. Huang H, Fang M, Jostins L, Umicevic Mirkov M, Boucher G, Anderson CA, et al. Fine-mapping inflammatory bowel disease loci to single-variant resolution. *Nature.* 2017;547(7662):173-8.
217. DeBoever C, Tanigawa Y, Lindholm ME, McInnes G, Lavertu A, Ingelsson E, et al. Medical relevance of protein-truncating variants across 337,205 individuals in the UK Biobank study. *Nat Commun.* 2018;9(1):1612.
218. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(2):637-42.
219. Li X, Lu C, Stewart M, Xu H, Strong RK, Igumenova T, et al. Structural basis of double-stranded RNA recognition by the RIG-I like receptor MDA5. *Arch Biochem Biophys.* 2009;488(1):23-33.
220. Chistiakov DA, Voronova NV, Savost'Anov KV, Turakulov RI. Loss-of-function mutations E6 27X and I923V of IFIH1 are associated with lower poly(I:C)-induced interferon-beta production in peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetes patients. *Hum Immunol.* 2010;71(11):1128-34.

221. Shigemoto T, Kageyama M, Hirai R, Zheng J, Yoneyama M, Fujita T. Identification of loss of function mutations in human genes encoding RIG-I and MDA5: implications for resistance to type I diabetes. *J Biol Chem*. 2009;284(20):13348-54.
222. Asgari S, Schlapbach LJ, Anchisi S, Hammer C, Bartha I, Junier T, et al. Severe viral respiratory infections in children with IFIH1 loss-of-function mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(31):8342-7.
223. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science*. 2009;324(5925):387-9.
224. Wagner J, Maksimovic J, Farries G, Sim WH, Bishop RF, Cameron DJ, et al. Bacteriophages in gut samples from pediatric Crohn's disease patients: metagenomic analysis using 454 pyrosequencing. *Inflamm Bowel Dis*. 2013;19(8):1598-608.
225. Wang W, Jovel J, Halloran B, Wine E, Patterson J, Ford G, et al. Metagenomic analysis of microbiome in colon tissue from subjects with inflammatory bowel diseases reveals interplay of viruses and bacteria. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(6):1419-27.
226. Mukhopadhyaya I, Segal JP, Carding SR, Hart AL, Hold GL. The gut virome: the 'missing link' between gut bacteria and host immunity? *Therap Adv Gastroenterol*. 2019;12:1756284819836620.
227. Lepage P, Colombet J, Marteau P, Sime-Ngando T, Dore J, Leclerc M. Dysbiosis in inflammatory bowel disease: a role for bacteriophages? *Gut*. 2008;57(3):424-5.
228. Perez-Brocal V, Garcia-Lopez R, Vazquez-Castellanos JF, Nos P, Beltran B, Latorre A, et al. Study of the viral and microbial communities associated with Crohn's disease: a metagenomic approach. *Clin Transl Gastroenterol*. 2013;4:e36.
229. Zuo T, Lu XJ, Zhang Y, Cheung CP, Lam S, Zhang F, et al. Gut mucosal virome alterations in ulcerative colitis. *Gut*. 2019;68(7):1169-79.
230. Ungaro F, Massimino L, D'Alessio S, Danese S. The gut virome in inflammatory bowel disease pathogenesis: From metagenomics to novel therapeutic approaches. *United European Gastroenterol J*. 2019;7(8):999-1007.
231. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell*. 2015;160(3):447-60.

232. Arias-Sanchez FI, Allen RC, Hall AR. Effects of prior exposure to antibiotics on bacterial adaptation to phages. *J Evol Biol.* 2018;31(2):277-86.
233. Torres-Barcelo C, Gurney J, Gougat-Barbera C, Vasse M, Hochberg ME. Transient negative effects of antibiotics on phages do not jeopardise the advantages of combination therapies. *FEMS Microbiol Ecol.* 2018;94(8).
234. Monaco CL, Gootenberg DB, Zhao G, Handley SA, Ghebremichael MS, Lim ES, et al. Altered Virome and Bacterial Microbiome in Human Immunodeficiency Virus-Associated Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Cell Host Microbe.* 2016;19(3):311-22.
235. Niwa Y, Yokoyama MM. Effect of glucocorticosteroid therapy on the immune system of patients with nonimmunologically mediated dermatoses. *J Clin Lab Immunol.* 1981;6(2):147-55.
236. Zhao G, Vatanen T, Droit L, Park A, Kostic AD, Poon TW, et al. Intestinal virome changes precede autoimmunity in type I diabetes-susceptible children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(30):E6166-E75.
237. Galtier M, De Sordi L, Sivignon A, de Vallee A, Maura D, Neut C, et al. Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 2017;11(7):840-7.
238. Sulakvelidze A. Safety and Efficacy of EcoActive on Intestinal Adherent Invasive E. Coli in Patients With Inactive Crohn's Disease.
239. Chehoud C, Dryga A, Hwang Y, Nagy-Szakal D, Hollister EB, Luna RA, et al. Transfer of Viral Communities between Human Individuals during Fecal Microbiota Transplantation. *mBio.* 2016;7(2):e00322.
240. Coleman TJ, Gamble DR, Taylor KW. Diabetes in mice after Coxsackie B 4 virus infection. *Br Med J.* 1973;3(5870):25-7.
241. Hubbard VM, Cadwell K. Viruses, autophagy genes, and Crohn's disease. *Viruses.* 2011;3(7):1281-311.
242. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, Miyoshi H, Loh J, Lennerz JK, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature.* 2008;456(7219):259-63.
243. Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, et al. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell.* 2010;141(7):1135-45.

244. Handley SA, Desai C, Zhao G, Droit L, Monaco CL, Schroeder AC, et al. SIV Infection-Mediated Changes in Gastrointestinal Bacterial Microbiome and Virome Are Associated with Immunodeficiency and Prevented by Vaccination. *Cell Host Microbe*. 2016;19(3):323-35.
245. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*. 2007;2(12):3081-9.
246. Matsu E, Burridge PW, Wu JC. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci Transl Med*. 2014;6(239):239ps6.
247. Arvey A, Tempera I, Tsai K, Chen HS, Tikhmyanova N, Klichinsky M, et al. An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. *Cell Host Microbe*. 2012;12(2):233-45.
248. Lindner SE, Sugden B. The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid*. 2007;58(1):1-12.
249. Sie L, Loong S, Tan EK. Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res*. 2009;87(9):1953-9.
250. Saha A, Robertson ES. Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *J Virol*. 2019;93(13).
251. Oh JH, Kim YJ, Moon S, Nam HY, Jeon JP, Lee JH, et al. Genotype instability during long-term subculture of lymphoblastoid cell lines. *J Hum Genet*. 2013;58(1):16-20.
252. Saha A, Jha HC, Upadhyay SK, Robertson ES. Epigenetic silencing of tumor suppressor genes during in vitro Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(37):E5199-207.
253. Hernando H, Islam AB, Rodriguez-Ubreva J, Forne I, Ciudad L, Imhof A, et al. Epstein-Barr virus-mediated transformation of B cells induces global chromatin changes independent to the acquisition of proliferation. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(1):249-63.
254. Grafodatskaya D, Choufani S, Ferreira JC, Butcher DT, Lou Y, Zhao C, et al. EBV transformation and cell culturing destabilizes DNA methylation in human lymphoblastoid cell lines. *Genomics*. 2010;95(2):73-83.
255. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*. 2013;13(2):149-59.
256. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.

257. Kumar S, Curran JE, Glahn DC, Blangero J. Utility of Lymphoblastoid Cell Lines for Induced Pluripotent Stem Cell Generation. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2349261.
258. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature.* 2011;470(7332):105-9.
259. Tamminen K, Balboa D, Toivonen S, Pakarinen MP, Wiener Z, Alitalo K, et al. Intestinal Commitment and Maturation of Human Pluripotent Stem Cells Is Independent of Exogenous FGF4 and R-spondin1. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134551.
260. McCracken KW, Howell JC, Wells JM, Spence JR. Generating human intestinal tissue from pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc.* 2011;6(12):1920-8.
261. Yoo JH, Donowitz M. Intestinal enteroids/organoids: A novel platform for drug discovery in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol.* 2019;25(30):4125-47.
262. Le Guen L, Marchal S, Faure S, de Santa Barbara P. Mesenchymal-epithelial interactions during digestive tract development and epithelial stem cell regeneration. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(20):3883-96.
263. Pellestor F, Andreo B, Coullin P. Interphasic analysis of aneuploidy in cancer cell lines using primed in situ labeling. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;111(2):111-8.
264. In J, Foulke-Abel J, Zachos NC, Hansen AM, Kaper JB, Bernstein HD, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* reduce mucus and intermicrovillar bridges in human stem cell-derived colonoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2016;2(1):48-62 e3.
265. Zhang YG, Wu S, Xia Y, Sun J. Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host-bacterial interactions. *Physiol Rep.* 2014;2(9).
266. Sherman HG. A Novel Method for Generating Single, Intestinal Organoids for High Throughput Screening Application Note. Corning. 2018.
267. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Lai CY, Otsu M, Hayashi M, et al. Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and Adipocytes in the Absence of Immune Cells. *EBioMedicine.* 2017;23:34-45.
268. Wells JMSJR. How to make an intestine. *The company of Biologists.* 2014;141:752-60.
269. Bazzone LE, King M, MacKay CR, Kyawe PP, Meraner P, Lindstrom D, et al. A Disintegrin and Metalloproteinase 9 Domain (ADAM9) Is a Major Susceptibility Factor in the Early Stages of Encephalomyocarditis Virus Infection. *mBio.* 2019;10(1).

270. Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S, Shah N, Kammermeier J, Elkadri A, et al. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2014;147(5):990-1007 e3.
271. Kurosaki T, Maquat LE. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci*. 2016;129(3):461-7.
272. Nagamine CM, Chan K, Lau YF. A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet*. 1989;45(2):337-9.
273. Rodriguez S, Visedo G, Zapata C. Detection of errors in dinucleotide repeat typing by nondenaturing electrophoresis. *Electrophoresis*. 2001;22(13):2656-64.
274. Downes K, Pekalski M, Angus KL, Hardy M, Nutland S, Smyth DJ, et al. Reduced expression of IFIH1 is protective for type 1 diabetes. *PLoS One*. 2010;5(9).
275. Mithal A, Capilla A, Heinze D, Berical A, Villacorta-Martin C, Vedaie M, et al. Generation of mesenchyme free intestinal organoids from human induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*. 2020;11(1):215.
276. Dixit E, Kagan JC. Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors. *Adv Immunol*. 2013;117:99-125.
277. Kozuka K, He Y, Koo-McCoy S, Kumaraswamy P, Nie B, Shaw K, et al. Development and Characterization of a Human and Mouse Intestinal Epithelial Cell Monolayer Platform. *Stem Cell Reports*. 2017;9(6):1976-90.
278. Gleeson JP, Estrada HQ, Yamashita M, Svendsen CN, Targan SR, Barrett RJ. Development of Physiologically Responsive Human iPSC-Derived Intestinal Epithelium to Study Barrier Dysfunction in IBD. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
279. Eremeev AV, Volovikov EA, Shuvalova LD, Davidenko AV, Khomyakova EA, Bogomiakova ME, et al. "Necessity Is the Mother of Invention" or Inexpensive, Reliable, and Reproducible Protocol for Generating Organoids. *Biochemistry (Mosc)*. 2019;84(3):321-8.
280. Mosa MH, Nicolle O, Maschalidi S, Sepulveda FE, Bidaud-Meynard A, Menche C, et al. Dynamic Formation of Microvillus Inclusions During Enterocyte Differentiation in Munc18-2-Deficient Intestinal Organoids. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2018;6(4):477-93 e1.
281. Bartfeld S, Bayram T, van de Wetering M, Huch M, Begthel H, Kujala P, et al. In vitro expansion of human gastric epithelial stem cells and their responses to bacterial infection. *Gastroenterology*. 2015;148(1):126-36 e6.

282. Co JY, Margalef-Catala M, Li X, Mah AT, Kuo CJ, Monack DM, et al. Controlling Epithelial Polarity: A Human Enteroid Model for Host-Pathogen Interactions. *Cell Rep.* 2019;26(9):2509-20 e4.
283. Lui PY, Wong LR, Ho TH, Au SWN, Chan CP, Kok KH, et al. PACT Facilitates RNA-Induced Activation of MDA5 by Promoting MDA5 Oligomerization. *J Immunol.* 2017;199(5):1846-55.
284. Lang X, Tang T, Jin T, Ding C, Zhou R, Jiang W. TRIM65-catalyzed ubiquitination is essential for MDA5-mediated antiviral innate immunity. *J Exp Med.* 2017;214(2):459-73.
285. Shu XS, Zhao Y, Sun Y, Zhong L, Cheng Y, Zhang Y, et al. The epigenetic modifier PBRM1 restricts the basal activity of the innate immune system by repressing retinoic acid-inducible gene-I-like receptor signalling and is a potential prognostic biomarker for colon cancer. *J Pathol.* 2018;244(1):36-48.
286. Zhu Q, Tan P, Li Y, Lin M, Li C, Mao J, et al. DHX29 functions as an RNA co-sensor for MDA5-mediated EMCV-specific antiviral immunity. *PLoS Pathog.* 2018;14(2):e1006886.
287. Groschel S, Piggott KD, Vaglio A, Ma-Krupa W, Singh K, Goronzy JJ, et al. TLR-mediated induction of negative regulatory ligands on dendritic cells. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(4):443-55.
288. Yang JZ, X.; Wang, F.; Wang, P.; Kuang, E.; Xiaojuan, L. Suppression of MDA5-mediated antiviral immune response by NSP8 of SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020:28.
289. Maiti AK. The African-American population with a low allele frequency of SNP rs1990760 (T allele) in IFIH1 predicts less IFN-beta expression and potential vulnerability to COVID-19 infection. *Immunogenetics.* 2020;72(6-7):387-91.
290. Zhang Q BP, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, Ogishi M, Sabli IKD, Hodeib S, Korol C, Rosain J, Bilguvar K, Ye J, Bolze A, Bigio B, Yang R, Arias AA, Zhou Q, Zhang Y, Onodi F, Korniotis S, Karpf L, Philippot Q, Chbihi M, Bonnet-Madin L, Dorgham K, Smith N, Schneider WM, Razoooky BS, Hoffmann HH, Michailidis E, Moens L, Han JE, Lorenzo L, Bizien L, Meade P, Neehus AL, Ugurbil AC, Corneau A, Kerner G, Zhang P, Rapaport F, Seeleuthner Y, Manry J, Masson C, Schmitt Y, Schlüter A, Le Voyer T, Khan T, Li J, Fellay J, Roussel L, Shahrooei M, Alosaimi MF, Mansouri D, Al-Saud H, Al-Mulla F, Almourfi F, Al-Muhsen SZ, Alshime F, Al Turki S, Hasanato R, van de Beek D, Biondi A, Bettini LR, D'Angio M, Bonfanti P, Imberti L, Sottini A, Paghera S, Quiros-Roldan E, Rossi C, Oler AJ, Tompkins MF, Alba C,

Vandernoot I, Goffard JC, Smits G, Migeotte I, Haerynck F, Soler-Palacin P, Martin-Nalda A, Colobran R, Morange PE, Keles S, Çölkesen F, Ozcelik T, Yasar KK, Senoglu S, Karabela ŞN, Gallego CR, Novelli G, Hraiech S, Tandjaoui-Lambiotte Y, Duval X, Laouéan C; COVID-STORM Clinicians; COVID Clinicians; Imagine COVID Group; French COVID Cohort Study Group; CoV-Contact Cohort; Amsterdam UMC Covid-19; Biobank; COVID Human Genetic Effort; NIAID-USUHS; TAGC COVID Immunity Group, Snow AL, Dalgard CL, Milner J, Vinh DC, Mogensen TH, Marr N, Spaan AN, Boisson B, Boisson-Dupuis S, Bustamante J, Puel A, Ciancanelli M, Meyts I, Maniatis T, Soumelis V, Amara A, Nussenzweig M, García-Sastre A, Krammer F, Pujol A, Duffy D, Lifton R, Zhang SY, Gorochov G, Béziat V, Jouanguy E, Sancho-Shimizu V, Rice CM, Abel L, Notarangelo LD, Cobat A, Su HC, Casanova JL. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020.

291. D'Amico F, Baumgart DC, Danese S, Peyrin-Biroulet L. Diarrhea During COVID-19 Infection: Pathogenesis, Epidemiology, Prevention, and Management. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020;18(8):1663-72.

292. Xiao F, Tang M, Zheng X, Liu Y, Li X, Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020;158(6):1831-3 e3.

293. Neurath MF. COVID-19 and immunomodulation in IBD. *Gut*. 2020;69(7):1335-42.

294. Yerushalmy-Feler A, Kern-Isaacs S, Cohen S. CMV Infection in Pediatric IBD. *Curr Gastroenterol Rep*. 2018;20(4):13.

295. Trinschek B, Luessi F, Gross CC, Wiendl H, Jonuleit H. Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci*. 2015;16(7):16330-46.

Annexes

Tableau supplémentaire 1. Caractéristiques phénotypiques des individus à l'origine des LCLs.

	wt K83994	wt K14797	wt K02201	wt K30281	wt K17945	Sp2/ E627X	Sp1/ I923V	Sp2/ Sp2	Sp1/ Sp2	I923V/ I923V
Phénotype	Non atteint	Non atteint	Non atteint	Non atteint	CU	CU	MC	MC	MC	MC
Genre	F	M	M	F	F	M	F	M	M	M
Âge diagnostic	n/a	n/a	n/a	n/a	28	28	23	12	9	23
Âge collecte	53	70	65	35	39	47	28	13	13	33
Ethnie	Cau	Cau, Juif Ashk	Cau	Cau	Cau	Cau	Cau	Cau	Cau	Cau
Présentation de la maladie	n/a	n/a	n/a	n/a	?	?	b2	b1	b1	b3
Régions atteintes connues	n/a	n/a	n/a	n/a	DisLocProctitis, DisLocLeft, DisLocExtensive	DisLocProctitis, DisLocLeft, DisLocExtensive, DisLocPi	DisLocColorectal	DisLocAnal	DisLocIleal, DisLocColorectal, DisLocAnal	DisLocIleal, DisLocColorectal
Atteintes aux articulations, peau, yeux, foie	?	?	?	?	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Chirurgie – appareil digestif	?	?	?	?	Non	Non	Non	Oui (Pf)	Non	Oui (Br)
Fumeur	Non	Non	Non	Non	Oui (3X/jour)	Non	Non	Non	Non	Non
Appendicectomie	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Non	Oui
Historique familial	?	?	?	?	Non	Non	Non	Non	Non	Non

Wt : wild type, Sp1 : IFIH1*IVS8+1, Sp2 :IFIH1*IVS14+1, n/a : non applicable, Cau : caucasien, Ashk : Ashkénaze, b1 : inflammation, b2 : rétrécissement, b3 : pénétrante, DisLocProctitis : proctitis , DisLocLeft : côté gauche (à la jonction splénique) , DisLocExtensive : extensif (au-delà de la jonction splénique) , DisLocIleale : iléale , DisLocColorectale : colorectale, DisLocPi : inflammation périappendicéale, DisLocAnal :anal, Pf :fistule-abcès périnéale, Br : restriction intestinale-sténose.

À noter que la lignée wt K17945 dérive d'un individu atteint de la CU, mais que l'absence des quatre variants dans *IFIH1* a été confirmée pour cette lignée, ainsi que pour les autres lignée « wt »

Méthodes pour la caractérisation des hiPSCs

*Les méthodes suivantes ont été réalisées par Marie-Ève Rivard et Jean Paquette, des membres du laboratoire Rioux.

Extraction d'ADN pour la caractérisation des hiPSCs

Les cellules ont été rincées au DPBS et le culot a été congelé directement dans l'azote liquide (*flash-freeze*). Le tube a été gardé à -80°C jusqu'au moment de l'extraction. L'ADN a été extrait à l'aide de la trousse *DNeasy blood and tissue kit* (Qiagen) selon les instructions du manufacturier. L'ADN a été dosé avec l'appareil *Synergy 2* (BioTek), à l'aide d'une *Take3 micro-volume plate* et du logiciel *Gen5 version 1.11.5*. L'ADN a été conservé à -20°C.

Absence d'intégration des plasmides dans les hiPSCs

L'absence d'intégration des plasmides épisomiques dans les cellules a été validée par électrophorèse sur gel d'agarose de produits de PCR. Pour ce faire, 57,6 ng d'ADN de chaque clone a été amplifié par PCR avec la trousse *HotStarTaq Plus DNA Polymease* (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. 0,5 µM d'amorces a été utilisé pour chaque plasmide (l'amorce sens est commune aux quatre plasmides mais l'amorce antisens est spécifique à chacun). Des amorces pour un gène de référence de l'ADN génomique (*chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)*) ainsi qu'un contrôle positif (plasmide) et négatif (lignée d'hiPSCs commerciale) ont été utilisés pour valider l'amplification. Les séquences des amorces sont décrites dans le Tableau supplémentaire 2. Le produit de PCR a migré sur un gel d'agarose 1% à 100V pendant environ 1 heure.

Tableau supplémentaire 2. Amorces pour vérifier l'intégration des plasmides par PCR.

Gènes	Espèce	Amorces	Séquences 5' - 3'
Plasmide	<i>H. sapiens</i>	HUM-PCR-Plasmide-sens02	AAT CTG TGC GGA GCC GAA A
OCT3/4	<i>H. sapiens</i>	HUM-PCR-Pla-OCT3/4-anti	CAG GGT GAG CCC CAC AT
SOX2	<i>H. sapiens</i>	HUM-PCR-Pla-SOX2-anti	GGG CAG CGT GTA CTT ATC CT
LMYC	<i>H. sapiens</i>	HUM-PCR-Pla-LMYC-anti	TCA TTC TCC GAG TCG CTT GGG
P53DD	<i>H. sapiens</i>	HUM-PCR-Pla-p53DD-anti	CCG GAA CAT CTC GAA GCG T

CXCL2 - sens	<i>H. sapiens</i>	Hs_CXCL2_F2	GTC ATA GCC ACA CTC AAG AAT G
CXCL2 - antisens	<i>H. sapiens</i>	Hs_CXCL2_R2	AGG AAC AGC CAC CAA TAA GC

Clonage unicellulaire des hiPSCs

Un clone de chaque lignée a été sous-cloné. Pour ce faire, les cellules ont été récoltées avec du TrypLE Express 1X (Life Technologies) et rincées dans un tampon composé de PBS^{-Ca-Mg²⁺}, 5 mM EDTA, 25 mM HEPES et 1% FBS. Les cellules ont été filtrées à l'aide d'un *cell strainer* de 70 μ m (Mylytenyi). Elles ont été triées par cytométrie en flux à l'aide du *BD FACSAria™ Fusion flow cytometer*. Une cellule unique a été déposée dans chaque puits d'une plaque 96 puits recouvert de *hESC-Qualified matrigel* (Corning) dans un milieu stemflex (Invitrogen) additionné de revitacell 1X (Invitrogen) et a été cultivée jusqu'à l'apparition d'une colonie.

Caryotype des hiPSCs

L'absence d'aberrations chromosomiques a été confirmée par *KaryoStat assay* à l'aide de l'appareil *GeneChip Scanner 3000 systems* (Life Technologies). Pour ce faire, 2×10^6 cellules ont été rincées au DPBS, puis congelées en culot dans l'azote liquide (*flash freeze*), avant d'être envoyées (sur glace sèche) pour analyse à Life Technologies.

Séquençage des hiPSCs

Les variants dans *IFIH1* ont été validés au Centre d'expertise et de services Génome Québec, par séquençage de type Sanger avec la technologie 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). Les amorces utilisées pour les différents variants dans *IFIH1* sont résumées dans le tableau Tableau supplémentaire 3. Toutes les séquences ont été analysées avec le logiciel CLC DNA Workbench (CLC Bio).

Tableau supplémentaire 3. Amorces pour séquençage.

Gène	Espèce	Amorces	Séquences 5' - 3'
<i>IFIH1 – Sp1</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-Seq-IFIH1-sp1-sens-01	ACAGGAGCCATGCAAGAAGT
		Hum-Seq-IFIH1-sp1-anti-01	TGGCTCTGTGGAATGTCAGA
<i>IFIH1 – E627X</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-Seq-IFIH1-E627X-sens-01	AGGCAGAACTCAAGCAGCAA
		Hum-Seq-IFIH1-E627X-anti-01	GTGGCTCATCTACAATCTTGCG
<i>IFIH1 – Sp2 et I923V</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-Seq-IFIH1-sp2-I923V-sens-01	ACTGCACATTTTCATGGTTACAGG
		Hum-Seq-IFIH1-sp2-I923V-anti-01	CAAGGGGCATGTTGCCTTTC

Extraction d'ARN pour caractérisation des hiPSCs

L'ARN a été isolé pour chaque lignée avec la trousse *Rneasy Plus Mini kit* (Qiagen). Brièvement, les cellules ont été récoltées dans un tampon de lyse *RLT* contenant 10% β -mercaptoéthanol. Les lysats ont été homogénéisés et l'ADN génomique a été éliminé avec 30 U d'enzymes *DNaseI* (Qiagen) pendant 15 minutes à température ambiante. L'ARN a été élué dans 40 μ l d'eau *RNase free* et a été dosé par spectrométrie avec l'appareil *Synergy 2* (BioTek), à l'aide d'une *Take3 micro-volume plate* et du logiciel *Gen5 version 1.11.5*. L'ARN a été conservé à -80°C

Rétro-transcription pour caractérisation des hiPSCs

La rétro-transcription s'est faite avec 100 ng d'ARN et la trousse *High Capacity cDNA Reverse Transcription* selon les instructions du fabricant (Applied Biosystem). L'ADNc a été conservé à -20°C.

PCR quantitative pour caractérisation des hiPSCs

Afin de valider la pluripotence de nos hiPSCs, trois marqueurs ont été mesurés par qPCR, soit *NANOG*, *POU5F1* et *SOX2* (amorces dans le Tableau supplémentaire 4). Le qPCR a été fait à partir de 4 ng d'ADNc ainsi que 10 μ M d'amorces. L'ADNc a été amplifié avec le réactif *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher). L'amplification a été réalisée par l'appareil *Quant Studio Real-Time PCR* et le logiciel associé *VI.3*. Les valeurs d'expression relative ont été normalisées par rapport à *HPRT*.

Tableau supplémentaire 4. Amorces pour qPCR (marqueurs de pluripotence).

Gènes	Espèces	Amorces	Séquence 5' - 3'
<i>NANOG</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-qPCR-NANOG-01 sens	GATTTGTGGGCCTGAAGAAA
		Hum-qPCR-NANOG-02 antisens	ATGGAGGAGGGAAGAGGAGA
<i>SOX2</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-qPCR-SOX2-01 sens	AACCCCAAGATGCACAACCTC
		Hum-qPCR-SOX2-02 antisens	GCTTAGCCTCGTCGATGAAC
<i>POU5F1</i>	<i>H. sapiens</i>	Hum-qPCR-POU5F1-01 sens	GAAGGAGAAGCTGGAGCAAA
		Hum-qPCR-POU5F1-02 antisens	CTTCTGCTTCAGGAGCTTGG

Feuillets embryonnaires (hiPSCs)

La capacité d'hiPSCs à former les trois feuillets embryonnaires a été mesurée à l'aide de la trousse *Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification* (R&Dsystems) selon les instructions du manufacturier. Brièvement, les cellules ont été différenciées, puis des anticorps spécifiques à chaque feuillet (Otx2 (ectoderme), Brachyury (mésoderme), SOX17 (endoderme)) ont été utilisés pour visualiser, par immunofluorescence, la proportion de cellules positives. Les images ont été prises avec le microscope IN Cell Analyser 6000 de la compagnie GE Healthcare Life Sciences et analysées avec le logiciel IN Cell Analyser 6000 V.7.3.

Résultats pour la caractérisation des hiPSCs

*Les résultats suivants ont été réalisés par Marie-Ève Rivard et Jean Paquette, des membres du laboratoire Rioux. Tous les résultats présentés dans cette section sont représentatifs de toutes les lignées utilisées dans le cadre de cette étude.

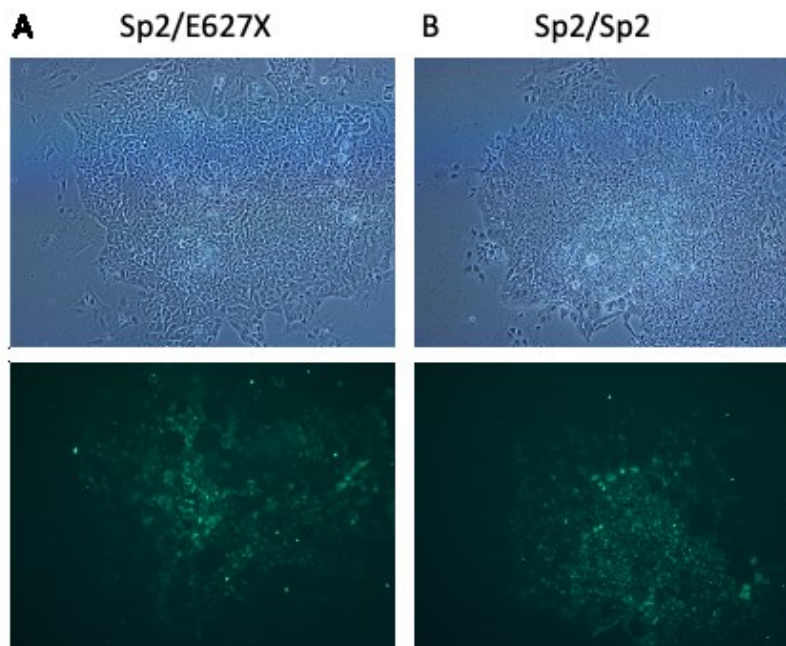


Figure supplémentaire 1. Validation de la pluripotence des hiPSCs.

Les différentes lignées d'hiPSCs ont été marquées au Tra-1-81 afin d'identifier les cellules avec un potentiel de pluripotence. Les images des lignées hiPSCs avec les génotypes Sp2/E627X (A) et Sp2/Sp2 (B) sont représentées. Les images du haut représentent les images avec champ clair uniquement, alors que la fluorescence pour les images du bas reflète les cellules marquées (potentiel de pluripotence confirmé). Sp2 : IFIH1 *IVS14+1.

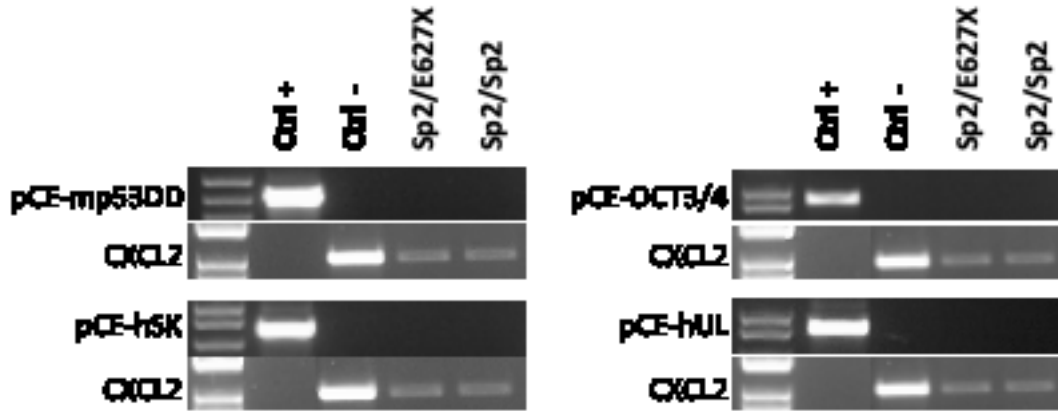


Figure supplémentaire 2. Validation de l'absence d'intégration des plasmides dans les hiPSCs.

Des PCR ont été effectuées avec des amorces pour les quatre plasmides utilisés dans le contexte de la reprogrammation des LCLs en hiPSCs (pCE-mp53DD, pCE-hSK, pCE-OCT3/4 et pCE-hUL). Les produits PCR migrés sur gel d'agarose sont représentés pour les lignées Sp2/E627X et Sp2/Sp2. Le gène *CXCL2* a été utilisé comme gène de référence de l'ADN génomique. Ctrl : contrôle, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

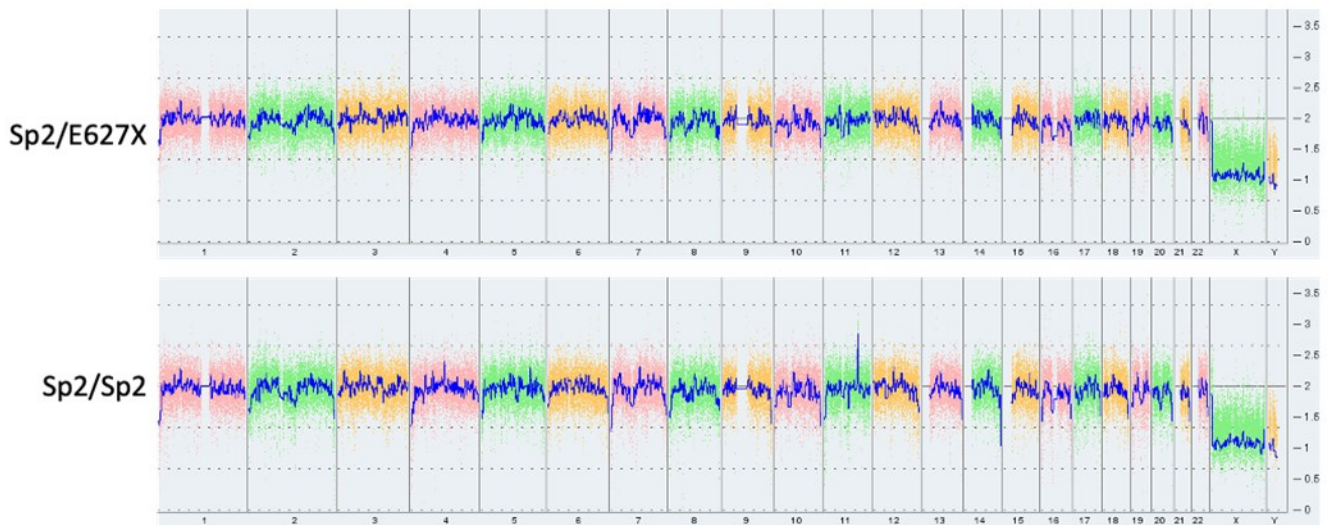
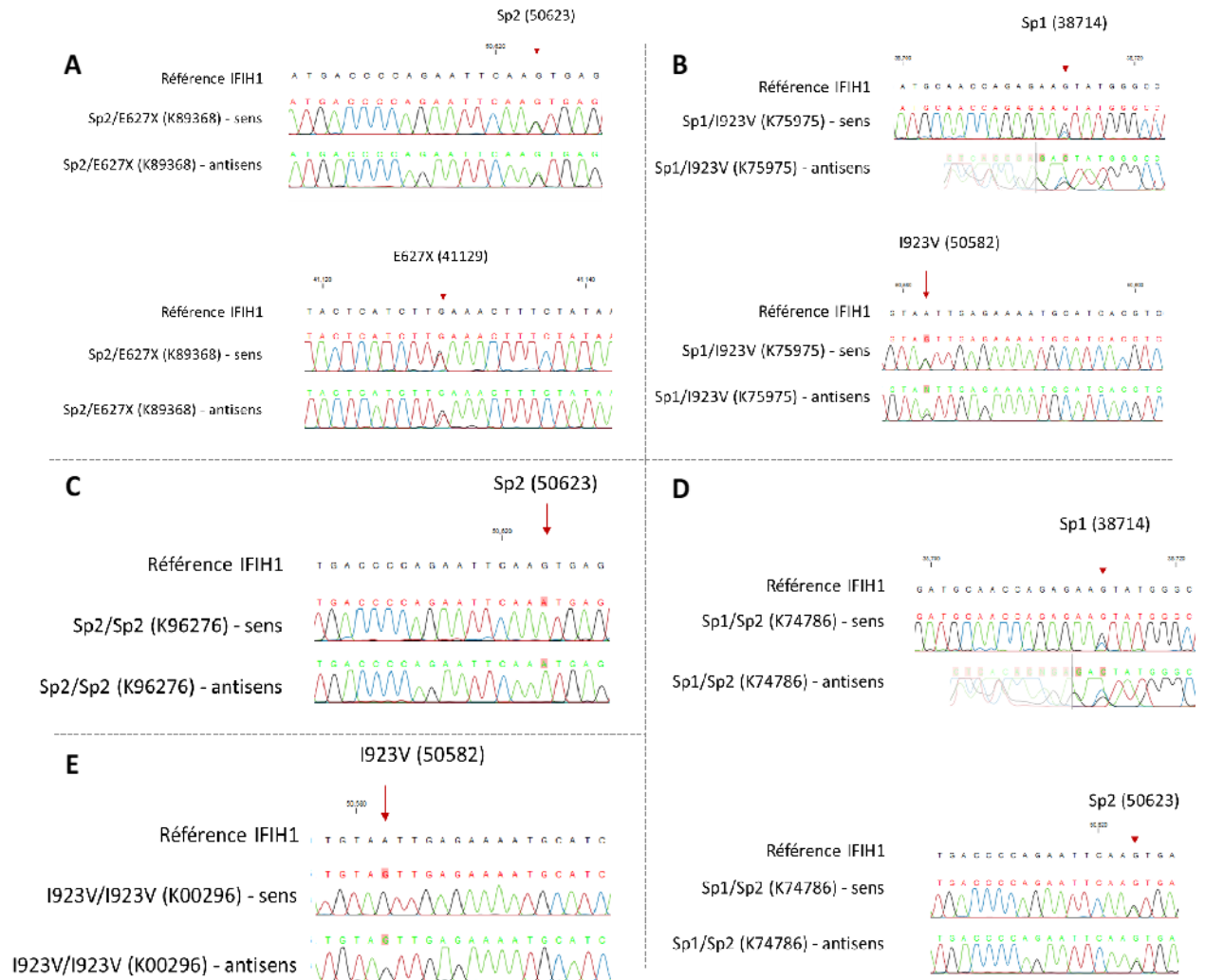


Figure supplémentaire 3. Caryotype des hiPSCs.

Le génome en entier, comprenant les chromosomes somatiques et sexuels est représenté pour les lignées Sp2/E627X et Sp2/Sp2. L'axe des Y représente l'intensité de signal des sondes sur les puces à ADN (*microarray*). Une valeur de 2 représente un nombre de copies normal, alors qu'une valeur de 3 représenterait un gain de copie. Une valeur de 1 représenterait une perte de copie ou les chromosomes sexuels pour un homme (X,Y). Les couleurs rose, vert et jaune représentent le signal brut, alors que la couleur bleue représente le signal normalisé sur lequel on se fie pour identifier le nombre de chromosomes et les aberrations. Aucune aberration chromosomique n'a été identifiée pour les hiPSCs. Sp2 : IFIH1*IVS14+1.



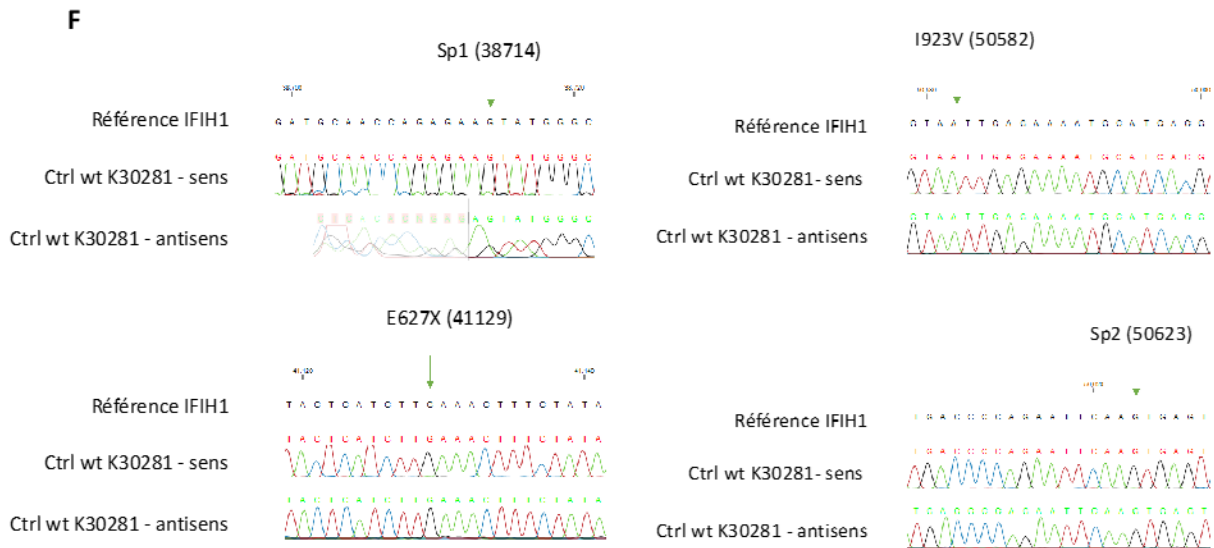


Figure supplémentaire 4. Séquençage des différentes lignées d’hiPSCs avec les variants dans *IFIH1* et d’un contrôle wt.

Les hiPSCs Sp2/E627X (A), Sp1/I923V (B), Sp2/Sp2 (C), Sp1/Sp2 (D), I923V/I923V (E) et wt K30281 (F) ont été analysés par séquençage Sanger. Les séquences des différentes lignées apparaissent sous la séquence de référence d’*IFIH1*. Les variants sont indiqués par la flèche rouge pour les différentes lignées mutantes (A,B,C,D,E). Les flèches vertes pour la lignée wt indiquent la position où se trouveraient les mutations (F). Toutes les lignées contrôles ont été séquencées et ne présentent pas de mutations aux différents sites où sont retrouvés nos variants (données non présentées). Sp1 : *IFIH1**IVS8+1, Sp2 : *IFIH1**IVS14+1.

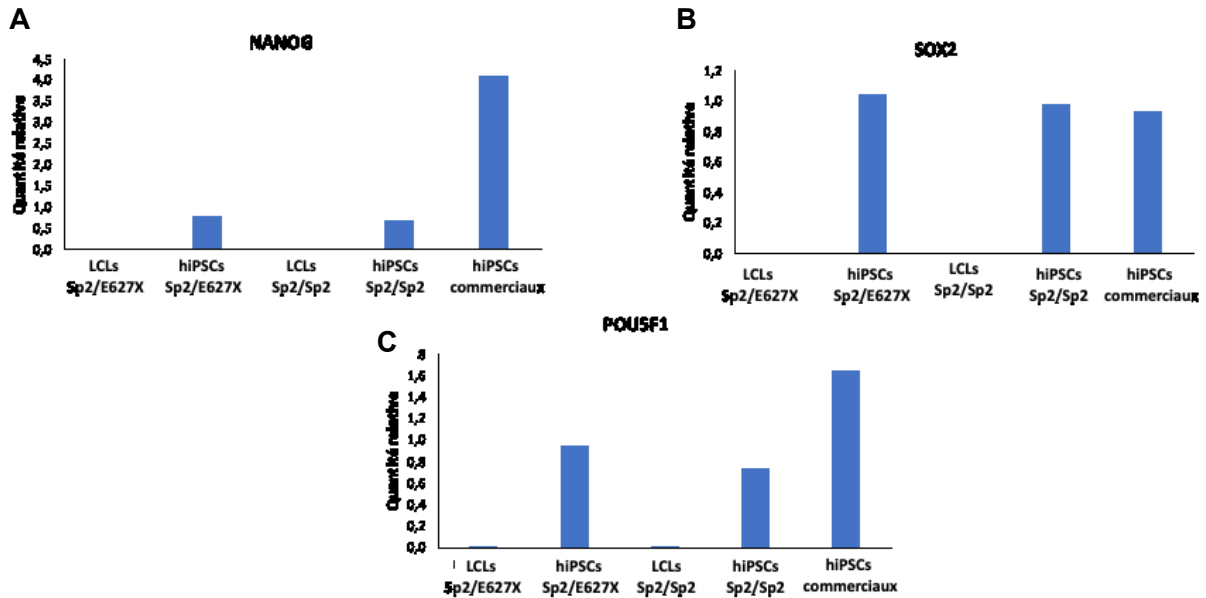


Figure supplémentaire 5. Gain des marqueurs de pluripotence dans les hiPSCs.

Les marqueurs de pluripotence *NANOG* (A), *SOX2* (B) et *POU5F1* (C) ont été mesurés par qPCR pour les LCLs ainsi que les hiPSCs dérivés des mêmes individus. Les données pour les lignées Sp2/E627X et Sp2/Sp2 sont représentées. La lignée d’hiPSCs commerciale (cw20047) a été utilisée comme contrôle positif. Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. LCL : lignée cellulaire lymphoblastoïde, hiPSCs : human induced Pluripotent Stem Cells, Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

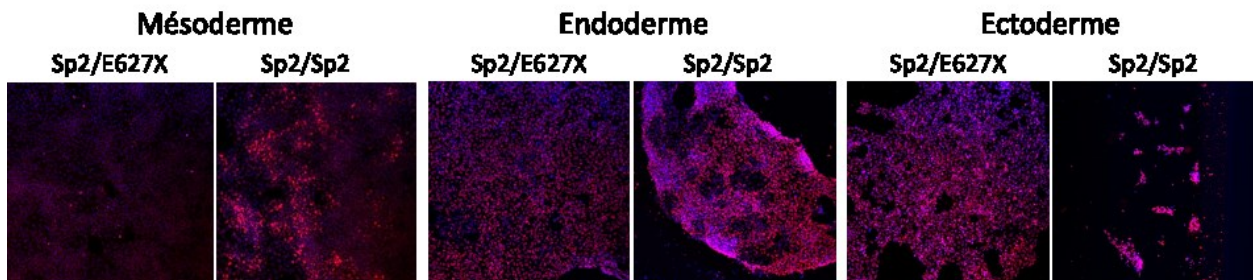


Figure supplémentaire 6. Validation de la capacité des hiPSCs à former les 3 feuillets embryonnaires.

Les hiPSCs de toutes les lignées utilisées ont pu être différenciées en mésoderme, en endoderme et en ectoderme. La proportion de cellules positives pour des protéines spécifiques aux différents feuillets (Brachyury (mésoderme), *SOX17* (endoderme) et *Otx2* (ectoderme)), a été révélée par immunofluorescence. Les images pour les lignées Sp2/E627X et Sp2/Sp2 sont représentées. Sp2 : IFIH1*IVS14+1.

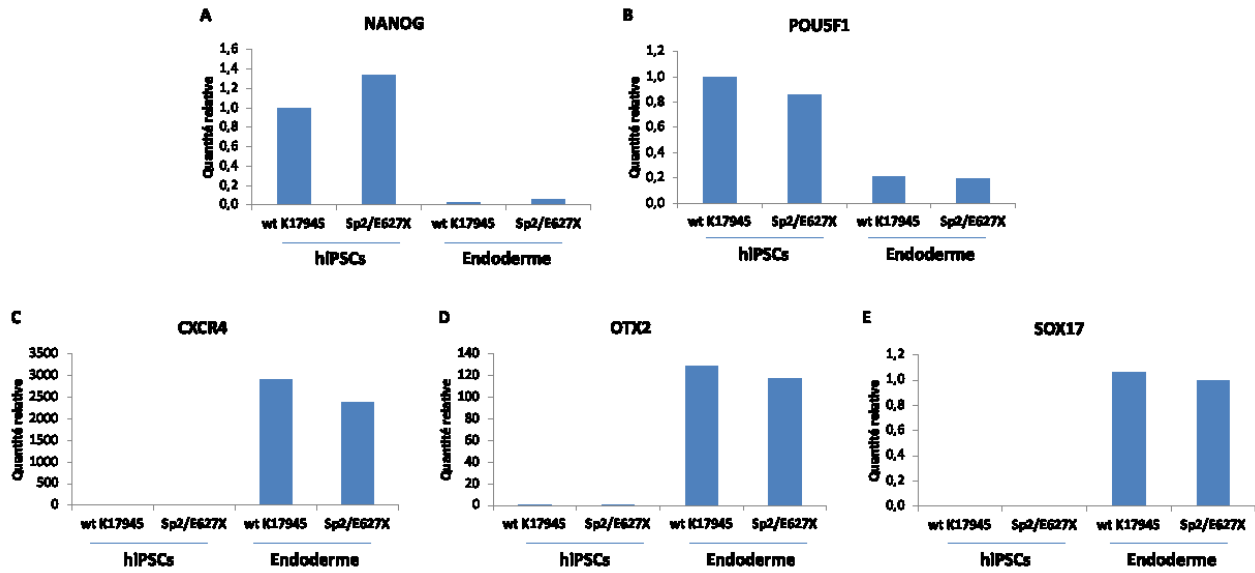


Figure supplémentaire 7. Validation de la perte des marqueurs de pluripotence et du gain des marqueurs d'endoderme dans l'endoderme dérivé d'hiPSCs.

L'expression des marqueurs de pluripotence (*NANOG* et *POU5F1*), ainsi que l'expression des marqueurs d'endoderme (*CXCR4*, *OTX2* et *SOX17*), ont été évalués par qPCR, pour les lignées wt K17945 et Sp2/E627X du protocole 2D, et ce pour les hiPSCs et les cellules sous forme d'endoderme. Les valeurs de quantité ont été rapportées sur *HPRT*, n=1. hiPSCs : human induced Pluripotent Stem Cells, Wt : wild type : Sp2 : IFIH1*IVS14+1.