

# Université de Montréal

---

## **Les interactions entre l'interleukine-15, l'haplotype HLA-DQ8 et le gluten conduisent au développement de la maladie cœliaque chez la souris**

Thomas Bastien Lejeune

**Département de microbiologie et d'immunologie  
Faculté de médecine**

Cette thèse est présentée en vue de l'obtention du grade de Ph.D. en microbiologie et immunologie

Septembre 2019

© Thomas Bastien Lejeune

# Université de Montréal

Département de microbiologie et d'immunologie  
Faculté de médecine

---

*Cette thèse intitulée*

**Les interactions entre l'interleukine-15, l'haplotype HLA-DQ8 et le gluten  
conduisent au développement de la maladie cœliaque chez la souris**

*Présentée par*

**Thomas Bastien Lejeune**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Dr. Elie Haddad**

Président-rapporteur

**Dr. Valérie Abadie**

Directrice de recherche

**Dr. Heather Melichar**

Membre du jury

**Dr. Maya Saleh**

Examinatrice externe

**Dr. Sylvie Lesage**

Représentante de la doyenne

## Résumé

La maladie cœliaque est une entéropathie inflammatoire chronique se développant chez des individus génétiquement prédisposés par l'expression des haplotypes HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 et survenant suite à la consommation de gluten. Elle se caractérise par le développement d'une atrophie des villosités de la muqueuse intestinale débouchant sur un syndrome de malabsorption alimentaire. La seule thérapie actuelle est le suivi d'une diète sans gluten mais cette éviction totale du gluten n'est pas toujours efficace et est lourde en concessions. Il est par conséquent urgent de développer des thérapies alternatives mais ce domaine constitue un pipeline évoluant lentement, notamment suite à l'absence d'un modèle animal pertinent et complet sur le plan physiologique. L'objectif de cette thèse doctorale est de répondre à ce besoin crucial en développant un modèle murin capable de récapituler les caractéristiques de la maladie.

Le chapitre 1 dresse le portrait de la maladie en quatre parties amenant progressivement le lecteur dans les détails de sa pathogenèse. Cette introduction débute par un rappel sur la physiologie et l'immunité intestinale puis elle définit la face clinique de la maladie. Ensuite, le lecteur évolue dans une partie plus détaillée de la pathogenèse aidant au discernement de ses acteurs cellulaires et moléculaires. Finalement, elle se termine par une revue de la littérature sur les actuels modèles animaux. Le chapitre 2 brosse les objectifs de la thèse sur base de données clés de la littérature, notamment, les patients présentent au minimum une copie de l'haplotype HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 et plus des deux-tiers sur-expriment la cytokine pro-inflammatoire interleukine-15 au niveau de leur muqueuse intestinale. Il est donc raisonnable de penser qu'ensemble, le gluten, l'haplotype HLA et l'interleukine-15 contribuent activement à la pathogenèse. Bien que soupçonnés, leurs rôles et interactions nécessitent l'apport de preuves tangibles

*in vivo*. Le chapitre 3 détaille ainsi ces interactions démontrées à l'aide du développement de notre nouveau modèle murin.

Ce dernier est caractérisé par la surexpression de l'interleukine-15 dans l'épithélium et dans la lamina propria intestinale et par l'expression de l'haplotype HLA-DQ8. Ce travail démontre que l'exposition de cette souris au gluten s'accompagne d'une atrophie villositaire et de la signature complète de la maladie, tant sur le plan sérologique, cellulaire que transcriptionnel. Nous démontrons que la surexpression simultanée de l'interleukine-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale que sont la lamina propria et l'épithélium est une condition *sine qua non* au développement de l'atrophie. Aussi, cette étude permet de mettre en lumière la nécessité des cellules T CD4<sup>+</sup> et de l'interféron- $\gamma$  dans l'activation des lymphocytes intraépithéliaux et le développement de l'atrophie. Finalement, cette recherche établit le rôle central joué par l'haplotype HLA-DQ8 et par l'enzyme transglutaminase II tissulaire dans la survenue de ces lésions. De manière générale, les résultats issus de ce modèle et présentés au chapitre 3 reflètent toute la complexité des interactions entre le gluten, la génétique et l'IL-15 dans le développement de la maladie cœliaque.

Enfin, le chapitre 4 apporte une conclusion à ce travail et le chapitre 5 discute des futures directions envisagées pour ce modèle préclinique. Ce dernier va sans doute contribuer à une meilleure compréhension de la maladie cœliaque et permettre l'identification de potentielles cibles thérapeutiques.

**Mots clés :** auto-immunité, maladie cœliaque, modèle murin, gluten, HLA-DQ8, transglutaminase-2, interleukine-15, cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques, cellules T CD4<sup>+</sup>

## Summary

Coeliac disease is a chronic inflammatory enteropathy characterized by autoimmune features. This disease occurs in genetically predisposed individuals expressing HLA-DQ2 or HLA-DQ8 haplotypes and is triggered following gluten consumption. The disease is characterized by the development of intestinal villous atrophy leading to malabsorption. The only current therapy is the adherence to a gluten-free diet, but the diet is not always effective and is heavy in concessions. Therefore, the development of alternative therapies is urgent but is a slowly evolving pipeline, mainly due to the absence of a physiologically relevant animal model. The aim of this thesis is to answer this unmet need by developing an animal model capable of recapitulating the main characteristics of the disease.

Chapter 1 depicts a portrait of the disease in four points, gradually leading the reader into the details of its pathogenesis. This introduction begins with a review of the physiology and intestinal immunity and then draws a clinical portrait of the disease. Third, the reader evolves in a more detailed part of the pathogenesis helping him to discern its cellular and molecular actors. Finally, the introduction ends with a review of the literature on current animal models. Chapter 2 outlines the thesis objectives based on key data from the literature, in particular, patients present at least one copy of the HLA-DQ2 or HLA-DQ8 haplotype and more than two-thirds over-express the proinflammatory cytokine interleukin-15 at the level of their intestinal mucosa. It is therefore reasonable to hypothesize that gluten, HLA haplotype and interleukin-15 together contribute to the pathogenesis. Although suspected, their roles and interactions still require the provision of tangible evidence *in vivo*. Chapter 3 details these interactions based on the proposed new mouse model.

This model is characterized by the overexpression of interleukin-15 in the intestinal epithelium and lamina propria and by the expression of the HLA-DQ8 haplotype. This work demonstrates that the exposure of this mouse to gluten is accompanied by villous atrophy and the complete serological, cellular and transcriptional signature of the disease. We also demonstrate that simultaneous overexpression of interleukin-15 in both mucosal compartments is a prerequisite for the development of atrophy. This study also highlights the need for CD4<sup>+</sup> T cells and interferon- $\gamma$  in the activation of intraepithelial lymphocytes and the development of villous atrophy. Finally, this research establishes the central role played by the HLA-DQ8 haplotype and the enzyme tissue transglutaminase II in the occurrence of these lesions. In general, the results from this model presented in Chapter 3 reflects the complexity of the interactions between gluten, genetics and IL-15 in the development of coeliac disease.

Finally, chapter 4 concludes this work and chapter 5 discusses future directions for this powerful preclinical model that will undoubtedly contribute to a better understanding of coeliac disease and will allow the identification of new potential therapeutic targets.

**Key words:** autoimmunity, coeliac disease, mouse model, gluten, HLA-DQ8, transglutaminase-2, interleukin-15, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> T cells

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Summary</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des tables</b> .....	<b>14</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>15</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>18</b>
<b>Chapitre 1. Introduction</b> .....	<b>22</b>
<b>1.1 L'intestin grêle, principal terrain de jeu de la maladie cœliaque</b> .....	<b>22</b>
1.1.1 Anatomie et histologie : rappels .....	22
1.1.2 L'immunité intestinale .....	28
1.1.2.1 Initiation de la réponse immunitaire intestinale .....	28
A. Sites inducteurs.....	30
Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés .....	30
Les ganglions mésentériques.....	31
B. Sites effecteurs .....	32
La lamina propria .....	32
L'épithélium .....	32
1.1.2.2 Le microbiome intestinal .....	33
1.1.2.3 Les antigènes alimentaires .....	35
1.1.3 Les mécanismes de la tolérance orale .....	36
<b>1.2 Vue d'ensemble de la maladie cœliaque</b> .....	<b>40</b>
1.2.1 Contexte historique .....	40
1.2.2 Définitions et concepts généraux .....	42
1.2.3 L'iceberg cœliaque et ses différents phénotypes .....	46
1.2.4 Épidémiologie .....	49
1.2.5 Facteurs de risque .....	52
1.2.5.1 Facteurs génétiques .....	52
A. Association aux gènes du système HLA .....	53
B. Association à d'autres gènes .....	58
1.2.5.2 Facteurs environnementaux.....	62
A. Le gluten.....	62
B. Autres facteurs environnementaux .....	65
Le microbiome intestinal .....	65
Les infections virales intestinales.....	66
Période d'introduction du gluten et allaitement.....	67
1.2.6 Signes cliniques, diagnostic et traitements .....	69
1.2.6.1 Signes cliniques .....	69
1.2.6.2 Diagnostic.....	70
A. La biopsie histologique et la classification de Marsh .....	71
B. La sérologie cœliaque .....	74
C. Le typage HLA .....	77

D.	Réponse à la diète sans gluten .....	77
1.2.6.3	Traitements .....	78
A.	La diète sans gluten .....	78
B.	Alternatives à la diète sans gluten .....	79
	Thérapie orale par compléments enzymatiques .....	80
	Vaccination peptidique.....	80
	Inhibiteurs de la tTGII .....	81
	Antagonistes de l'interleukine-15 .....	81
<b>1.3</b>	<b>Immunopathogenèse de la maladie cœliaque .....</b>	<b>82</b>
1.3.1	Le passage du gluten dans la lamina propria .....	82
1.3.1.1	Passage para-cellulaire .....	83
1.3.1.2	Passage trans-cellulaire .....	85
1.3.2	Immunopathogenèse de la maladie cœliaque .....	87
1.3.2.1	Vue d'ensemble .....	87
1.3.2.2	La réponse immunitaire adaptative .....	90
A.	Les cellules T CD4 <sup>+</sup> spécifiques du gluten .....	90
	Activation des cellules T CD4 <sup>+</sup> .....	90
	Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.....	91
B.	Les lymphocytes intraépithéliaux .....	93
	Populations de lymphocytes intraépithéliaux .....	93
	Activation des lymphocytes intraépithéliaux .....	95
C.	Les cellules B spécifiques du gluten et de la tTGII .....	97
	Le modèle haptène-porteur .....	97
	Implication des anticorps dans la pathogenèse.....	98
D.	Importance de la tTGII.....	100
	Caractéristiques .....	100
	Régulation de la tTGII dans la MC .....	103
	Implication la tTGII dans la MC .....	104
1.3.2.3	La réponse immunitaire innée : importance de l'interleukine-15.....	105
A.	Contexte.....	105
B.	Caractéristique et régulation.....	106
C.	Récepteur et voie de signalisation .....	107
D.	Interleukine-15 VS Interleukine-2 .....	109
E.	Implication de l'IL-15 dans la MC .....	110
1.3.3	Conclusion.....	115
<b>1.4</b>	<b>Modèles animaux de la maladie cœliaque .....</b>	<b>116</b>
1.4.1	Contexte.....	116
1.4.2	Modèles clés existants .....	121
1.4.2.1	Modèles humanisés exprimant le HLA-DQ8 .....	121
A.	Importance du système HLA.....	121
B.	Black <i>et al</i> , 2002.....	122
C.	Marietta <i>et al</i> , 2002 VS Galipeau <i>et al</i> , 2011 .....	122
1.4.2.2	Modèles exprimant l'interleukine-15.....	123
A.	Ohta <i>et al</i> , 2002 et Yokoyama <i>et al</i> , 2009 .....	124
B.	Korneychuk <i>et al</i> , 2014 .....	124
C.	De Paolo <i>et al</i> , 2011.....	125
	<b>Chapitre 2. Objectifs de la thèse doctorale.....</b>	<b>128</b>

<b>Chapitre 3. The interplay between IL-15, gluten and HLA-DQ8 drives the development of coeliac disease in mice .....</b>	<b>131</b>
<b>3.1 Abstract .....</b>	<b>135</b>
<b>3.2 Introduction.....</b>	<b>136</b>
<b>3.3 Results.....</b>	<b>138</b>
<b>3.4 Discussion.....</b>	<b>162</b>
<b>3.5 Methods .....</b>	<b>164</b>
3.5.1 Mice.....	164
3.5.2 Antibodies and flow cytometry.....	165
3.5.3 Epithelial, lamina propria, and mesenteric lymph nodes cell isolation.....	165
3.5.4 Gluten feeding and depletions.....	166
3.5.5 Preparation of CT-gliadin, PT-gliadin and DGP.....	166
3.5.6 Anti-tTGII, anti-gluten and anti-DGP ELISA .....	167
3.5.7 Histology .....	168
3.5.8 Immunohistochemistry .....	169
3.5.9 Quantification of IELs with cytotoxic properties.....	170
3.5.10 Visualization and quantification of tTGII protein and activity.....	171
3.5.11 tTGII inhibition.....	171
3.5.12 RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR.....	171
3.5.13 Gene expression microarray.....	172
3.5.14 Identifying genes differentially expressed between mouse strains .....	173
3.5.15 Patients.....	173
3.5.16 RNA-sequencing on gut biopsies from control and coeliac disease patients .....	174
3.5.17 Gene set enrichment analyses .....	175
3.5.18 Statistical Analysis .....	175
<b>3.6 References.....</b>	<b>176</b>
<b>3.7 Acknowledgments .....</b>	<b>183</b>
<b>3.8 Author contributions .....</b>	<b>183</b>
<b>3.9 Competing interests.....</b>	<b>184</b>
<b>3.10 Extended Data Figures .....</b>	<b>185</b>
<b>Chapitre 4. Conclusion et discussion .....</b>	<b>204</b>
<b>Chapitre 5. Limitations, futures directions et exploitation du modèle .....</b>	<b>216</b>
<b>5.1 Limitations et futures directions .....</b>	<b>216</b>
5.1.1 Atrophie sévère et pénétrance limitée.....	216
5.1.2 Caractérisation de la réponse CD4 <sup>+</sup> spécifique du gluten .....	216
5.1.3 Comparaison des molécules du HLA prédisposant à la maladie.....	218
<b>5.2 Exploitation du modèle.....</b>	<b>219</b>
5.2.1 Investigation des mécanismes contrôlant l'activation de la tTGII .....	219
5.2.2 Investigation de la réponse CD8 <sup>+</sup> cytotoxique.....	220
5.2.3 Investigation du rôle de la réponse humorale.....	222

5.2.4	Investigation du rôle du microbiome intestinal .....	224
5.2.5	Investigation de l'exposition précoce au gluten sur la perte de la tolérance orale .....	226
5.2.6	Investigation de nouvelles solutions thérapeutiques .....	227
<b>Chapitre 6. Références bibliographiques.....</b>		<b>228</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> histologie de l'intestin grêle et organisation de sa muqueuse absorbante.....	26
<b>Figure 2:</b> composition cellulaire de l'épithélium intestinal.....	27
<b>Figure 3:</b> représentation des éléments composant le système immunitaire de la muqueuse intestinale.....	29
<b>Figure 4:</b> capture de l'antigène et activation des LT CD4 <sup>+</sup> spécifiques de ce dernier.....	39
<b>Figure 5:</b> séquence de l' $\alpha$ -gliadine.....	44
<b>Figure 6:</b> évolution représentative de l'atteinte histologique dans la MC.....	45
<b>Figure 7:</b> modèle de l'iceberg cœliaque.....	49
<b>Figure 8:</b> prévalence mondiale de la maladie cœliaque .....	52
<b>Figure 9:</b> déamidation post-traductionnelle du gluten par la tTGII et interactions résultantes avec les molécules du HLA-DQ2 et du HLA-DQ8.....	56
<b>Figure 10:</b> risque de développement de la MC associé aux différentes combinaisons des allèles pour le HLA-DQ2 et le HLA-DQ8.....	58
<b>Figure 11:</b> chevauchements entre certains facteurs de risques génétiques de la maladie cœliaque, des pathologies auto-immunes et des pathologies inflammatoires de l'intestin .....	61
<b>Figure 12:</b> corrélation entre la prévalence de la maladie cœliaque, la consommation de blé et la fréquence des haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8.....	64
<b>Figure 13:</b> algorithme diagnostique de la maladie cœliaque selon Tack et collègues.....	71
<b>Figure 14:</b> évolution progressive de l'atrophie villositaire et de l'hyperplasie cryptique dans la maladie cœliaque suivant la classification de Marsh-Oberhuber.....	73
<b>Figure 15:</b> transport des complexes IgA-gliadine médié par le récepteur à la transferrine, le CD71.....	87
<b>Figure 16:</b> pathogenèse de la maladie cœliaque.....	89
<b>Figure 17:</b> réaction de transamidation et de déamidation médiées par la tTGII.....	101

<b>Figure 18:</b> oxydo-réduction, conformation et état d'activation de la tTGII.....	103
<b>Figure 19:</b> complexes des récepteurs de l'interleukine-15 et de l'interleukine-2.....	109
<b>Figure 20:</b> induction de la réponse inflammatoire anti-gluten suite à la perte du profile tolérogène des cellules dendritiques.....	114
<b>Figure 21:</b> DQ8-IL-15 <sup>LPxIEC</sup> mice develop the hallmarks of CeD upon gluten feeding and recover on a GFD.....	140
<b>Figure 22:</b> IL-15 expression in both the LP and epithelium confers IELs with a cytotoxic phenotype and the ability to kill epithelial cells.....	145
<b>Figure 23:</b> HLA-DQ8 is required to amplify gluten-specific adaptive immunity to the threshold required for tissue destruction.....	150
<b>Figure 24:</b> CD4 <sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$ are critically involved in CeD pathogenesis.....	154
<b>Figure 25:</b> DQ8-IL-15 <sup>LPxIEC</sup> mice as a preclinical model for coeliac disease.....	159
<b>Figure supplémentaire 1:</b> overexpression of IL-15 in HLA-humanized DQ8 mice confers susceptibility to development of coeliac disease-like features in a gluten-dependent manner.....	185
<b>Figure supplémentaire 2:</b> a gluten-free diet decreases the anti-gluten antibody response and the levels of cytotoxic intraepithelial lymphocytes.....	187
<b>Figure supplémentaire 3:</b> IL-15 expression in both the lamina propria and epithelium confers IELs with a cytotoxic phenotype and the ability to kill epithelial cells.....	189
<b>Figure supplémentaire 4:</b> effect of IELs depletion on antibodies production and epithelial stress markers.....	192
<b>Figure supplémentaire 5:</b> HLA-DQ8 is required to amplify gluten-specific adaptive immunity to the threshold required for tissue destruction.....	194
<b>Figure supplémentaire 6:</b> GSEA for gluten-responsive genes in DQ8-IL-15 <sup>LPxIEC</sup> and DQ8 mice.....	196
<b>Figure supplémentaire 7:</b> anti-gliadin antibody titers are decreased in CD4-depleted DQ8-IL-15 <sup>LPxIEC</sup> mice.....	197

**Figure supplémentaire 8:** impact of T helper 1 cytokine depletion on the development of disease in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice.....199

**Figure supplémentaire 9:** similar gene regulatory mechanisms underlie the development of CeD in humans and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice.....201

**Figure supplémentaire 10:** interplay between IL-15, tTGII, and HLA-DQ8 promote the development of villous atrophy.....202

## Liste des tables

<b>Table 1</b> : classification de Marsh-Oberhuber.....	73
<b>Table 2</b> : modèles murins de la maladie cœliaque.....	120

## Liste des abréviations

AGA: anticorps anti-gliadine

CCR9: C-C chemokine receptor type 9

CD: cellule dendritique

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: cellule présentatrice de l'antigène

CTLA4: antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique

DGPA: anticrops anti-gliadine déamidée

EMA: anticrops anti-endomysium

Ep: épithélium

GALT: tissu lymphoïde associé au tube digestif

GM: ganglions mésentériques

GWAS: étude d'association pangénomique

HLA: antigène leucocytaire humain

IFN- $\alpha$ : interféron- $\alpha$

IFN- $\gamma$ : interféron gamma

IL-x: interleukine-x (x étant le chiffre associé)

JAK/STAT: janus kinase/signal transducer and activator of transcription

JNK: janus kinase

LB: lymphocyte B

LIEs: lymphocytes intra-épithéliaux

LT: lymphocyte T

LTh1: lymphocyte T helper 1

LTh2: lymphocyte T helper 2

LTreg: lymphocyte T régulateur

Lp: lamina propria

MICA: MHC class I-related chain A  
MICB: MHC class I-related chain B  
MC: maladie cœliaque  
NOD: non obese diabetic  
NK: cellule naturelle tueuse  
NKr: récepteur des cellules naturelles tueuses  
PC: plasmocyte  
pIgR: récepteur aux immunoglobulines polymériques  
PP: plaque de Peyer  
SED: dome sous-épithélial  
SIgA: IgA sécrétoire  
Smad: small mothers against decapentaplegic  
TCR: récepteur des lymphocytes T  
TDA: zone dépendante du thymus  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$   
TLR: récepteur toll like  
TNF: tumor necrosis factor  
TO: tolérance orale  
tTGII: transglutaminase II tissulaire  
tTGA: anticorp anti-transglutaminase II tissulaire

**À ma mère, Béatrice.**

Ete tas essilev.

### **Heredity**

*I am the family face;  
Flesh perishes, I live on,  
Projecting trait and trace  
Through time to times anon,  
And leaping from place to place  
Over oblivion.*

*The years-heired feature that can  
In curve and voice and eye  
Despise the human span  
Of durance — that is I;  
The eternal thing in man,  
That heeds no call to die.*

Thomas Hardy.

Moments of Vision, 1917.

## Remerciements

La rédaction et la soutenance d'une thèse doctorale sont l'aboutissement d'un cheminement personnel, mais elles ne peuvent bien évidemment pas prendre une direction adéquate sans l'aide précieuse de nombreux acteurs figurant dans l'entourage de l'étudiant. Ainsi, et afin de n'oublier aucune et aucun, j'aimerais remercier toutes ces personnes qui m'ont aidé directement ou indirectement dans l'accomplissement de mes études doctorales. Vous qui lisez ces lignes, vous vous reconnaitrez.

Aussi, et très humblement, j'aimerais que le lecteur garde à l'esprit que ce manuscrit est le résultat d'une recherche de très longue haleine, issue de l'évolution des résultats et du cheminement de pensée du Dr. Bana Jabri basée à l'université de Chicago. Ce projet a débuté en 2011 par le Dr. Valérie Abadie et constitue un travail sur lequel de nombreuses personnes ont collaboré au cours du temps. Plus particulièrement, Sangman Michael Kim et Jordan Ernest ont joué un rôle crucial concernant les expériences réalisées à Chicago. Le Dr. Abadie, Sangman et moi-même sommes co-premiers auteurs, mais tout comme de nombreux projets de recherche scientifique, c'est avant tout un travail d'équipe où chacun a apporté sa pierre à l'édifice.

Je suis reconnaissant des soutiens financiers que j'ai pu obtenir durant mes études doctorales et qui m'ont aidé à compléter ces dernières. Précisément, je remercie la Fédération Wallonie-Bruxelles Internationale qui rend possible le financement de jeunes chercheurs belges ayant choisi d'effectuer leurs études doctorales à l'étranger. Je remercie également le Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et la Technologie. Leur confiance et soutien ont été précieux.

Je remercie ma directrice de recherche, le Dr. Valérie Abadie, ainsi que notre très proche collaboratrice, le Dr. Bana Jabri. Je les remercie de m'avoir accueilli dans leurs équipes

respectives, tant à l'université de Montréal dans un premier temps pour le Dr. Abadie, qu'à l'université de Chicago dans un second temps pour le Dr. Jabri. Je les remercie pour leur guidance et leur support durant le développement de mes aptitudes à la recherche. Je les remercie également pour l'opportunité unique qu'elles m'ont donné de travailler corps et âme sur un projet d'une telle répercussion dans le domaine de la maladie coéliquaue.

Je remercie également mon comité de suivi ainsi que mon jury de thèse, pour avoir accepté de faire partie de ces derniers mais aussi pour leur retour et leur expertise scientifique précieuse. Leurs suggestions, leurs remarques et leurs idées ont été cruciales à l'amélioration de ce manuscrit. Merci pour le temps que vous m'avez accordé. Toujours dans la sphère scientifique, je remercie chaleureusement le Dr. Carolina Alfieri pour ses conseils, son soutien, son expérience et sa sagesse. Malgré son emploi du temps chargé, elle a toujours su se rendre disponible. Sachez que j'ai une profonde considération à votre égard.

Un merci s'impose pour quelques anciens membres du laboratoire à Montréal. Je pense à Maxime, étudiant stagiaire à la maîtrise qui s'est rapidement transformé en un véritable ami et qui fait maintenant entièrement partie de mon nouvel entourage Montréalais. Je pense à Alexandre, notre associé de recherche pendant malheureusement une trop courte période. Même si ce fût court, il a été pour moi la personne qui m'a le plus apporté en termes de réflexion et de soutien à la paillasse. Plus humainement maintenant, nous savons tous deux que ça n'a vraiment pas été facile pour de nombreuses raisons infortunées et hors de notre contrôle. Un seul mot résume notre travail et nos échanges : le soutien.

On se décale maintenant d'une paillasse au 6<sup>ème</sup> étage du centre de recherche du CHU Sainte-Justine, et on se retrouve chez nos voisins du laboratoire du Dr. Decaluwe. Chloé et Alexis, mes deux potos inconditionnels m'ayant accueilli durant ma période seul au laboratoire durant la transition entre Montréal et Chicago. J'étais ce « réfugié de labo »

comme ils disaient, et on a formé cette petite famille durant toute cette période. On s'est donné le sourire au quotidien, on a tourné la difficulté en dérision et on a porté notre sarcasme et notre autodérision à leur apogée, parfois à coup de double IPA au Saint-Bock. C'était thérapeutique et plein de vie, merci les amis.

On traverse maintenant une frontière pour rejoindre le Knapp Center for Biomedical Discovery de l'université de Chicago. Cette thèse a été ponctuée par de nombreuses mouvances et ceci m'a permis de découvrir le mode de fonctionnement, le rythme et la dynamique d'un laboratoire tel que celui du Dr. Jabri. Je la remercie à nouveau pour m'avoir accueilli et pour avoir fourni cet environnement collaboratif de très grande qualité. Je la remercie pour ses questions de réflexions, ses retours constants, mais aussi pour sa précieuse pédagogie. Je comprends aisément pourquoi autant de jeunes chercheurs souhaitent se former à ses côtés. Son dévouement à la formation scientifique des étudiants ainsi que sa clairvoyance hors norme font du Dr. Jabri cette personne tant réputée, aussi bien pour sa science, son mentoring que son leadership hors du commun. Merci à tous les membres de son laboratoire m'ayant apporté leur aide ainsi que pour leur bonne humeur. Plus particulièrement merci à mon collègue Sangman Michael Kim pour son aide durant toute la période à Chicago, pour sa jovialité et son humour grinçant. J'ai apprécié notre collaboration sur le champ de bataille scientifique, mais également en dehors.

On revient en Belgique où j'ai bien évidemment plusieurs personnes à évoquer. Ma famille, pour son affection et son soutien. Plus particulièrement, merci à mon oncle et à ma tante, pour m'avoir continuellement soutenu et éclairé dans mes choix d'adolescent et d'adulte. Je leur serai éternellement reconnaissant pour tout ce que qu'ils m'ont apporté dans la vie, sans rien attendre en retour, mais surtout pour avoir cru en moi quand je n'y croyais plus. Merci simplement d'avoir été les parents qu'ils ont été dans ma vie. Je ne serai pas qui je suis, je ne serai pas où je suis, sans eux. Je remercie également Gauthier pour la place qu'il occupe dans ma vie depuis maintenant 15 années et pour avoir été présent, contre vents et

marées, à chaque étape importante de ma vie. La liste serait trop longue à énumérer, mais lui et moi, nous savons. Il est un véritable pilier, un père spirituel dont le soutien et le dévouement sont incommensurables, dont l'expérience de vie me fait grandir, et dont l'emprunte se retrouve dans chacun de mes actes aux quotidiens. Même si on ne peut parler techniquement d'hérédité mendélienne, on peut entièrement parler d'hérédité spirituelle. Tu es dans ma vie ce qu'un phare est aux navires.

Je tiens également à remercier Kayla pour son soutien durant la dernière année de ma thèse. Malgré la distance et les sacrifices qui y sont liés, elle a très rapidement cru en la situation et n'a pas hésité à me soutenir au quotidien. C'est plus qu'une simple question de chance d'avoir croisé son chemin et je ne peux que me réjouir du futur proche qui nous attend. Je crois en toi. Je remercie également Rocco Vecera et Nancy Alfiero pour leur gentillesse, leur présence et leur dévotion spontanée. Ils m'ont apporté le cadre et la stabilité dont j'avais besoin lors de cette dernière étape de rédaction.

Je terminerai par la personne la plus importante à mes yeux. Celle qui vit et subsiste en moi plus que jamais. Ma mère. Je sais à quel point mon départ pour l'étranger et cette thèse étaient pour toi à la fois un déchirement mais également une de tes plus grandes fiertés de maman, comme tu me le disais tant. Bien évidemment jamais nous n'aurions envisagé une telle issue. Maintenant, tu sais tout ce que je pense, tu sais tout ce que je ressens. Inutile de s'épancher ici, cette thèse, elle t'est définitivement dédiée.

Montréal, Septembre 2019.

Thomas Bastien Lejeune.

# Chapitre 1. Introduction

## 1.1 L'intestin grêle, principal terrain de jeu de la maladie cœliaque

### 1.1.1 Anatomie et histologie : rappels

L'intestin au sens large du terme est l'un des principaux organes du tube digestif. Il est subdivisé en deux sections consécutives, l'intestin grêle, suivi du côlon, l'ensemble formant une surface avoisinant les 300m<sup>2</sup> (1). Ces deux structures sont anatomiquement distinctes et présentent chacune leurs propres spécificités morphologiques et physiologiques. Par conséquent, elles présentent également leurs propres dysfonctionnements, leurs propres pathologies. Afin de bien intégrer l'ensemble des mécanismes associés à la physiopathologie de la maladie cœliaque (MC) discutés dans cet écrit, nous ne considérerons ici que l'intestin grêle, terrain de jeu principal de la pathologie.

Cet organe du tube digestif se situe donc entre l'estomac et le côlon. Plus précisément, il fait directement suite au sphincter pylorique de l'estomac et s'arrête à la valve iléo-caecale, pour une longueur totale d'environ 7 mètres chez l'Homme adulte. D'un point de vue anatomique, il se dissocie en trois sections consécutives évoluant vers le côlon et reconnaissables sur base de différences au niveau de leur muqueuse : le duodénum, le jéjunum et l'iléon (2).

La fonction première du petit intestin est de participer activement à la digestion des aliments et à l'absorption des nutriments qui en résultent. On estime à environ 30kg la quantité de protéines alimentaires atteignant le tractus digestif sur une période d'un an et à 130-190g de protéines sur une base quotidienne (3). La digestion des

macromolécules issues de ce bol alimentaire, qui a principalement lieu au niveau du duodénum, est assurée par la batterie d'enzymes produites par les entérocytes épithéliaux et exprimées au niveau de leur pôle apical. Ces enzymes travaillent de concert avec les enzymes pancréatiques et la bile afin de compléter le catabolisme des macromolécules partiellement digérées par les sucs gastriques de l'estomac. L'absorption quant à elle est assurée grâce à l'architecture remarquable de l'intestin grêle, faite de plis circulaires, de villosités intestinales et de microvillosités entérocytaires, lesquelles augmentent significativement la surface d'échange de sa muqueuse avec l'environnement externe (**Figure 1**). Cette caractéristique unique nous permet d'ailleurs de faire un premier lien direct avec la MC et de comprendre aisément pourquoi le patient, qui présente une altération sévère de l'architecture de cette muqueuse, souffre d'un syndrome de malabsorption et de carences alimentaires multiples.

Plus précisément, cette muqueuse intestinale est constituée de 3 éléments lui assurant ses propriétés d'absorption, de sécrétion et de protection. On distingue ainsi un épithélium (Ep), une lamina propria (Lp) et une muscularis mucosae (**Figure 1**). La muscularis mucosae consiste en une fine couche de cellules musculaires lisses située sous la Lp et séparant cette dernière de la sous-muqueuse. Ses fines contractions participent au péristaltisme ainsi qu'au maintien du tonus intestinal. La Lp est quant à elle principalement composée de tissu conjonctif lâche assurant un rôle de soutien à l'architecture des villosités. Elle comporte également des vaisseaux sanguins et lymphatiques, lui conférant un rôle de vascularisation et d'absorption. L'Ep intestinal est un peu plus complexe dans sa composition et mérite une description plus détaillée, précisons qu'il est la structure cible faisant l'objet d'une destruction dans la MC.

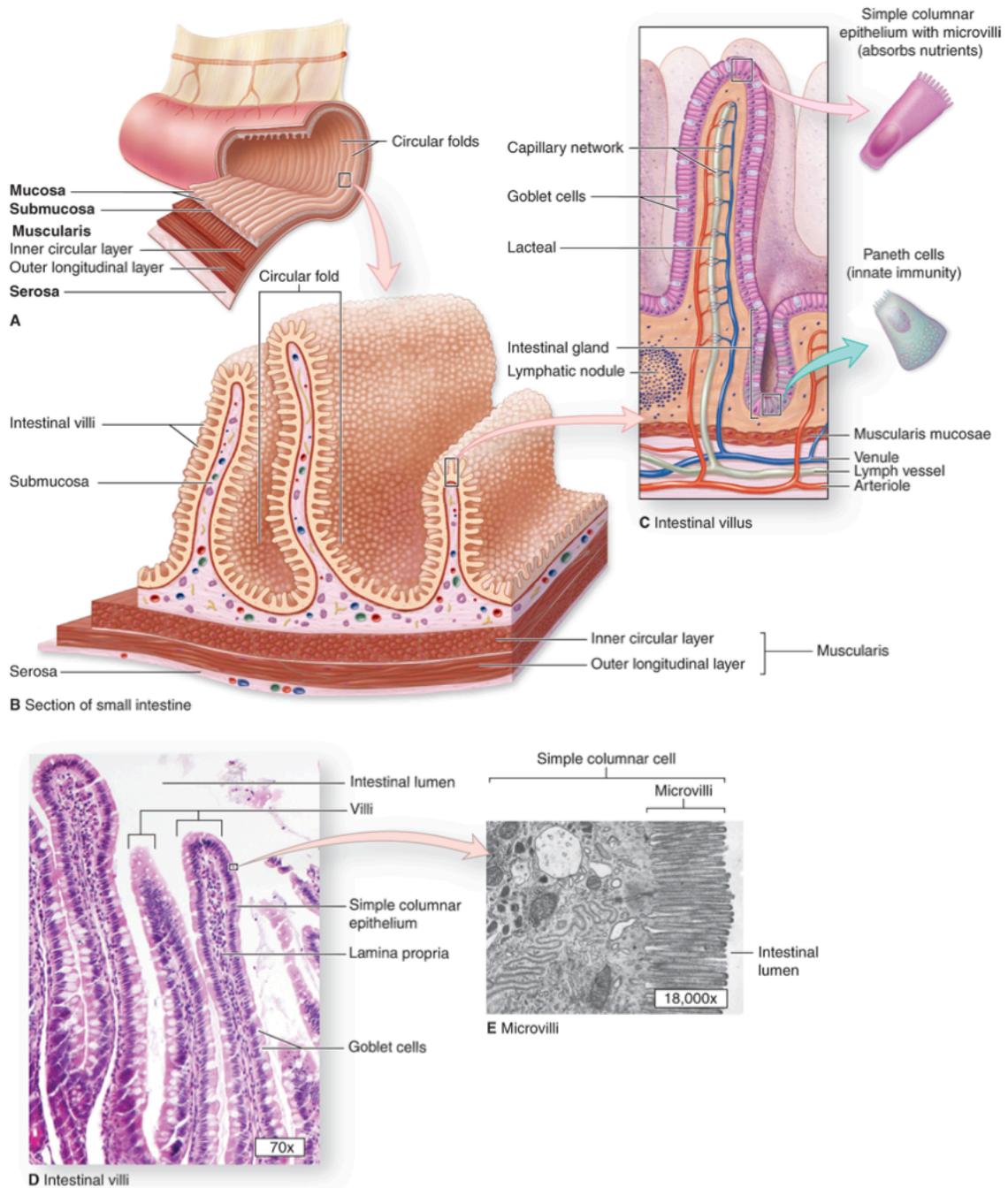
Cet Ep est de type prismatique unistratifié et constitué de différents types cellulaires, chacun assurant des fonctions biologiques spécifiques brièvement décrites ci-

dessous. On distingue ainsi les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules neuroendocrines et les cellules de Gobelet, encore appelées cellules caliciformes ou cellules à mucus (4) (**Figure 2**). Ces différents types cellulaires sont issus de cellules souches pluripotentes que l'on retrouve au fond des cryptes de Lieberkühn, lesquelles sont situées à la base des villosités intestinales. Ainsi, ces différentes lignées épithéliales nouvellement formées vont évoluer depuis les cryptes jusque l'apex des villosités où elles présentent un cycle de vie très rapide puisqu'elles sont renouvelées environ tous les 5 jours. Au cours de cette migration, la cellule épithéliale, quel que soit son type, va maturer et acquérir les spécificités nécessaires à sa fonction biologique :

- **Les entérocytes** : ils constituent la lignée cellulaire épithéliale la plus importante avec environ 80% de la composition de l'épithélium. Ils sont responsables de la fonction digestive et d'absorption. Ils sont caractérisés au niveau du pôle apical par la présence de microvillosités, formant ensemble la bordure en brosse. Cette dernière exprime les enzymes digestives et augmente la surface d'absorption tel que mentionné ci-dessus.
- **Les cellules de Gobelet** : leur principale fonction est la sécrétion de mucine, une macroprotéine glycosylée entrant dans la composition du mucus. Ce dernier se présente sous la forme d'une monocouche lâche tapissant l'épithélium et assurant plusieurs fonctions essentielles à la régulation de l'homéostasie intestinale sur laquelle nous reviendrons en détails. Il constitue notamment une barrière immunitaire puisqu'il maintient une certaine distance entre les bactéries du microbiome intestinal et l'épithélium, sans pour autant leur être totalement imperméable. Il permet également la retenue des peptides antimicrobiens et des anticorps sécrétés dans la lumière et luttant directement contre l'invasion de

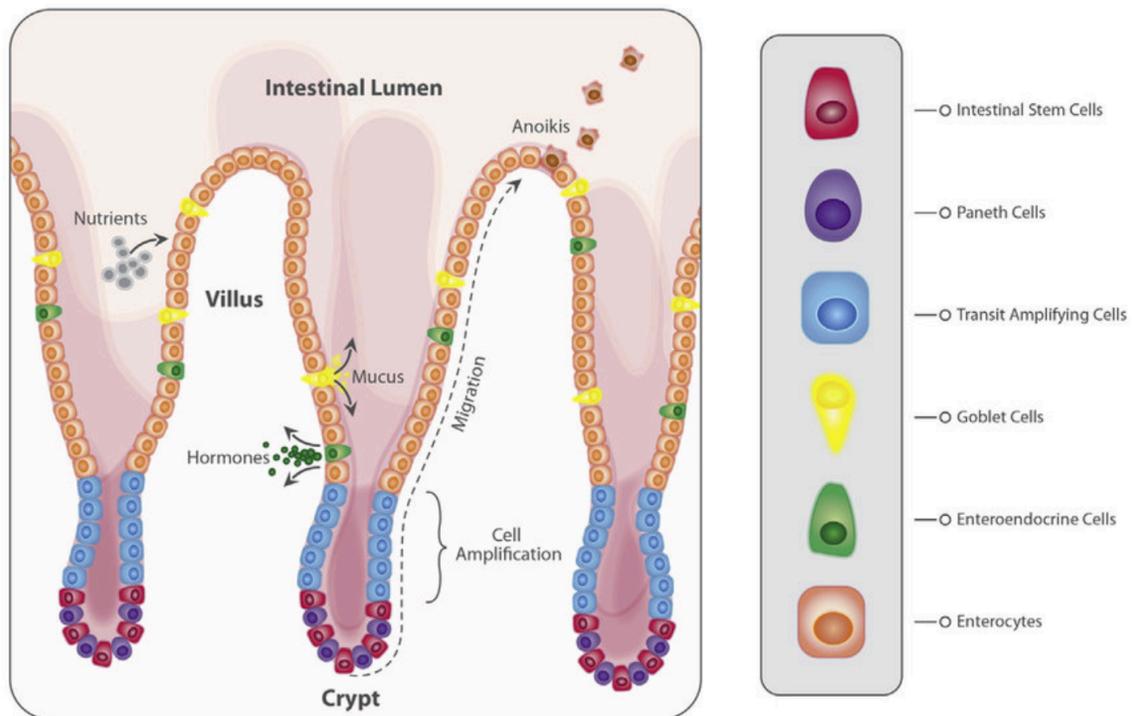
pathogènes. Finalement, son pH basique permet une protection face à l'acidité du bol alimentaire délivré par l'estomac.

- **Les cellules neuroendocrines** : elles sont responsables de la sécrétion de différentes hormones intervenant directement dans la régulation de la digestion, de la sensation d'appétit et celle de la satiété.
- **Les cellules de Paneth** : ces cellules sont situées au fond des cryptes de Lieberkühn, à proximité des cellules souches multipotentes. Elles sont les seules cellules de l'épithélium intestinal à ne pas migrer selon l'axe crypte-villosité décrit précédemment et elles présentent une durée de vie plus longue que les autres types cellulaires. Ce sont des cellules sécrétrices exocrines à action antimicrobienne. Plus précisément, elles sécrètent des peptides tels que le lysozyme, les cathelicidines et les défensines. Ces peptides microbicides se retrouvent dans le mucus et participent activement à la lutte contre l'invasion d'agents pathogènes.



**Figure 1: histologie de l'intestin grêle et organisation de sa muqueuse absorbante.** L'intestin grêle est situé entre l'estomac et le côlon, il comporte trois sections consécutives; le duodénum, le jéjunum et l'iléon. **(a)** La muqueuse et la sous-muqueuse forment les deux premières couches concentriques et sont organisées en **(b)** plis circulaires augmentant la surface d'absorption intestinales. **(c,d)** Chaque plis circulaire est lui-même recouvert de villosités intestinales comportant chacune un capillaire sanguin et lymphatique. Ces villosités sont tapissées d'un épithélium constitué de différents types cellulaires parmi lesquels les entérocytes, caractérisés à leur pôle apical par **(e)** des microvillosités, augmentant elles aussi la surface d'absorption. Cet épithélium s'invagine entre les villosités et constitue les cryptes de Lieberkühn, protégeant les cellules souches responsables du renouvellement épithélial. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text & Atlas, 12th ed. McGraw Hill Lange, New York: 2010. Page 270, figure 15-25.

Ensemble, ces cellules, et donc cette muqueuse intestinale, assurent un rôle clé sur le plan digestif mais également sur le plan immunitaire. D'ailleurs, il convient de préciser que l'intestin contient de nombreux acteurs de l'immunité innée et adaptative. Par exemple, les lymphocytes résidant dans la Lp et ceux résidant dans l'Ep présentent des profils tout à fait différents et constituent donc des compartiments immunologiques aux fonctions distinctes. D'ailleurs, le dialogue établi entre ces deux compartiments lors de la MC reste quelque peu énigmatique. Il est donc adéquat d'aborder l'immunité intestinale afin de bien intégrer les prochains concepts développés dans ce travail.



**Figure 2: composition cellulaire de l'épithélium intestinal.**

L'épithélium intestinal est constitué de différents types cellulaires, chacun assurant des fonctions biologiques spécifiques. On distingue les entérocytes, les cellules de Paneth, les cellules neuroendocrines et les cellules de Gobelet. Ces différents types cellulaires sont issus de cellules souches pluripotentes situées au fond des cryptes de Lieberkühn. Les cellules filles ainsi générées vont migrer depuis la crypte jusque l'apex de la villosité tout en se spécialisant (4).

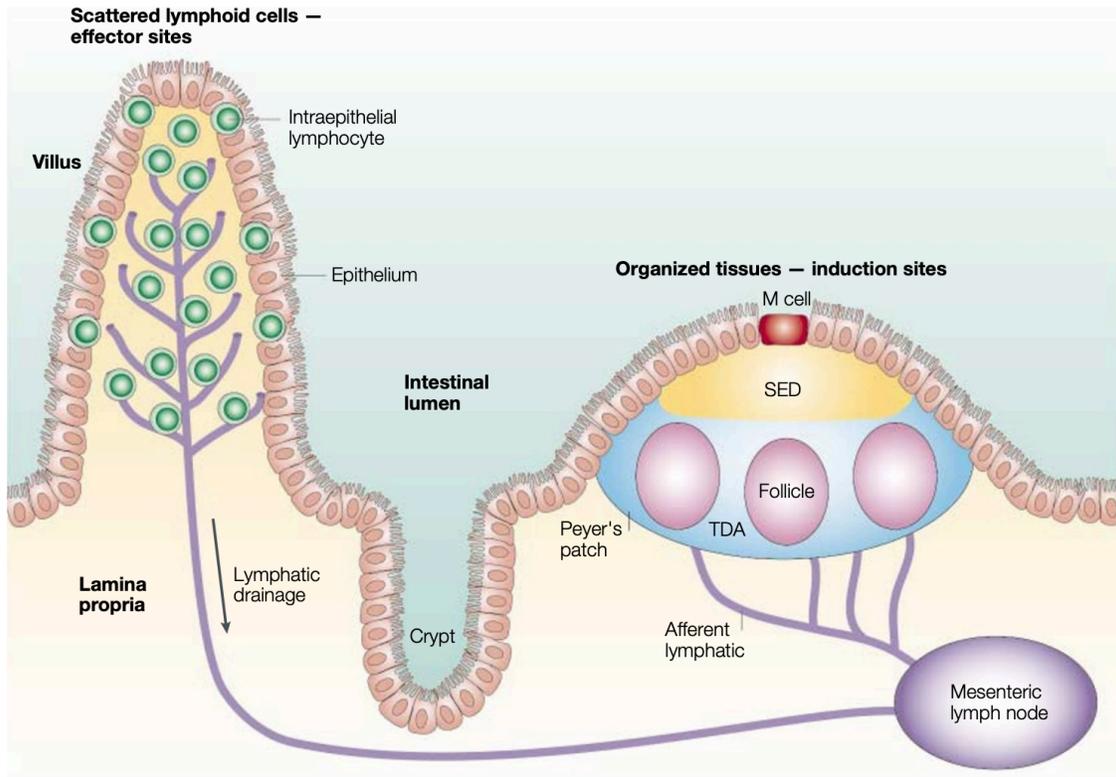
### **1.1.2 L'immunité intestinale**

D'un point de vue immunologique, l'intestin est l'organe du corps humain comportant la plus grande concentration en cellules immunitaires et ce constat reste d'application pour la souris. On parle d'environ 70% de l'ensemble des cellules de l'immunité chez le mammifère et ceci s'explique aisément puisque l'intestin constitue l'interface la plus importante de l'organisme avec l'environnement externe (5). Cette interface est le lieu d'une constante exposition face aux antigènes présents dans la lumière intestinale. Ces derniers incluent un large spectre de bactéries issues du microbiome ainsi qu'une multitude de protéines alimentaires quotidiennement ingérées par l'individu. Ces interactions complexes entre les antigènes, la barrière intestinale et le système immunitaire sont contrôlées par une homéostasie unique et finement régulée, permettant à la fois la digestion, l'absorption et la tolérance des nutriments, l'absence de réponse face aux bactéries commensales et la protection de l'individu face aux antigènes potentiellement pathogènes. Cette aptitude est plus connue sous le terme général de tolérance et sera décrite au point 1.1.3 puisque la rupture de cette dernière s'inscrit pleinement dans la pathogenèse de la MC. La compréhension de ces mécanismes tolérogéniques passe inévitablement par une description et une compréhension du système immunitaire intestinal.

#### **1.1.2.1 Initiation de la réponse immunitaire intestinale**

Le développement d'une réponse immunitaire adaptative intestinale est orchestrée à partir de différents sites, on parle de sites inducteurs et de sites effecteurs (6). Les sites inducteurs permettent la reconnaissance de l'antigène, ils rassemblent les ganglions mésentériques (GM) et les tissus lymphoïdes associés au tube digestif (on parle du GALT, pour Gut-Associated Lymphoid Tissue). Ce dernier comporte à la fois des

structures lymphoïdes organisées, telles que les plaques de Peyer (PP) mais également des structures beaucoup plus aléatoires parsemant la muqueuse intestinale, ce sont les follicules lymphoïdes isolés. Les sites effecteurs sont quant à eux les sites où la réponse immunitaire contre l'antigène a véritablement lieu, il s'agit de la Lp et de l'Ep (Figure 3) (7).



**Figure 3: représentation des éléments composant le système immunitaire de la muqueuse intestinale.** Le système immunitaire intestinal s'organise en sites inducteurs et en sites effecteurs. Les premiers sont constitués des GM et du GALT et permettent la reconnaissance de l'antigène. Les seconds sont constitués de l'Ep et de la Lp et assurent le développement de la réponse contre cet antigène. SED, dôme subépithélial; TDA, zone dépendante du thymus (7).

## A. Sites inducteurs

### Les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés

Les PP sont des structures lymphoïdes macroscopiques localisées tout au long de la muqueuse intestinale, avec cependant des tailles et des concentrations plus importantes au niveau de la section iléale. Comme tout organe lymphoïde secondaire, elles sont caractérisées par cette structure immunologique classique faite de follicules riches en lymphocytes B (LB) et entourée d'une zone riche en lymphocytes T (LT) (8). Les PP présentent néanmoins une particularité, celle d'un épithélium spécialisé et étroitement associé aux follicules B. Cet épithélium comporte les cellules M (M pour microfold, **figure 3**) qui ont la caractéristique de continuellement sonder le contenu de la lumière intestinale. Ces cellules vont ainsi capter les antigènes et les faire parvenir, dans leur totalité et par voie transépithéliale, aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA); les macrophages et les cellules dendritiques (CD, appelées ici cellules dendritiques folliculaires dans les PP) (9). Classiquement, les CD rentrant en contact avec un antigène considéré vont maturer et entamer une migration vers la zone T ou elles vont présenter cet antigène aux LT CD4<sup>+</sup> naïves spécifiques de ce dernier. La formation de centres germinatifs impliquant le dialogue bidirectionnel classique entre LB et LT est alors engagée et débouchera sur une réponse immunitaire adaptative. Les cellules T activées dans les PP peuvent également évoluer vers les GM via drainage lymphatique pour ensuite rejoindre le torrent circulatoire et finalement s'accumuler dans la muqueuse intestinale (7).

Les follicules lymphoïdes individuels ressemblent aux PP en ce sens où ils comportent eux aussi un épithélium associé aux follicules B avec présence de cellules M. Cependant, ce sont de petits agrégats lymphoïdes beaucoup plus petits et comportant

uniquement quelques follicules B. La zone T est également beaucoup moins bien marquée. Bien que microscopiques, ces structures tapissent littéralement la muqueuse intestinale et jouent donc un rôle non négligeable dans l'induction de la réponse immunitaire intestinale (10).

### **Les ganglions mésentériques**

Les GM se présentent sous la forme d'un chapelet ganglionnaire intriqué dans le mésentère, ils sont responsables du drainage de l'intestin. Tout comme le GALT, ils font partie des organes lymphoïdes secondaires. Brièvement, ils sont entourés d'une capsule conjonctive sous laquelle on retrouve deux structures clés impliquées dans le développement de la réponse immunitaire adaptative : un cortex abritant les follicules B et, au pourtour de ce cortex, le paracortex qui lui, comporte la zone T. On retiendra en particulier de ces GM que leur stroma fournit un environnement tout à fait unique dont les caractéristiques biologiques participent pleinement à l'induction de ce mécanisme immunitaire clé déjà cité au préalable et sur lequel nous reviendrons rapidement : la tolérance orale (TO) (11). En l'absence de ces GM, ce mécanisme ne peut avoir lieu (12, 13)

En résumé, que l'on soit dans les PP, les follicules lymphoïdes isolés ou encore dans les GM, les cellules T et les cellules B activées par les CPA vont, suite à cette polarisation, exprimer différents récepteurs de « homing » leur permettant de migrer depuis ces sites inducteurs jusqu'au niveau des sites effecteurs de la réponse immunitaire intestinale, l'Ep et la Lp.

## **B. Sites effecteurs**

### **La lamina propria**

La Lp comporte différents types de cellules immunitaires avec une majorité de LT et de LB. Les LT constituent une population mixte de CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> au ratio 2 pour 1. Ils présentent un phénotype effecteur mémoire pour la plupart puisqu'ils sont issus des cellules T naïves activées dans les sites inducteurs décrits précédemment (14). Les LB sont quant à eux majoritairement présents sous la forme de plasmocytes (PC), assurant la production d'anticorps d'isotype IgA. On parle de SIgA ou d'IgA sécrétoires puisque pour rappel, les cellules épithéliales expriment au niveau basal le pIgR, ou récepteur aux immunoglobulines polymériques, assurant la transcytose des IgA dimériques vers la lumière intestinale où elles contribuent à la protection de la muqueuse intestinale face aux antigènes présents dans la lumière (15). En plus de ces LT effecteurs et de ces PC, la Lp contient également des cellules de l'immunité innée dont des granulocytes et autres types de phagocytes jouant un rôle important aussi bien dans la protection innée que dans la connexion entre cette réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative.

### **L'épithélium**

L'Ep intestinal est principalement caractérisé par la présence de lymphocytes intraépithéliaux (LIEs). On en dénombre environ une dizaine pour 100 cellules épithéliales chez la souris pour un total de 10 à 20 chez l'Homme, en conditions physiologiques normales. Ils constituent une population hétérogène de cellules T CD8<sup>+</sup> effectrices dont la fonction principale est de fournir une première ligne de défense contre les agents pathogènes envahissant la barrière intestinale (16). Ils expriment un récepteur T (TCR) de

type TCR $\alpha\beta$  ou TCR $\gamma\delta$  et présentent un état d'activation globalement plus élevé que les cellules T périphériques classiques, ce qui, à l'image de véritables sentinelles, leur permet de répondre très rapidement à toutes invasions potentielles (17). Aussi, en plus de leur fonction cytotoxique, ils assurent une fonction régulatrice permettant le maintien de l'intégrité épithéliale, notamment via la sécrétion de facteurs de croissance. Finalement, soulignons qu'il existe un grand nombre de différences dans la composition et le phénotype de ces LIEs entre l'Homme et la souris. Ces dernières seront abordées plus en détails au point 1.3.2.3.A.

### **1.1.2.2 Le microbiome intestinal**

Chez les mammifères, la colonisation des barrières épithéliales par une communauté microbienne est extrêmement fréquente. En effet, la surface cutanée, le tractus respiratoire, urogénital ou encore digestif présentent une microflore commensale faite de bactéries, virus et champignons. Plus spécifiquement, le microbiome intestinal réfère principalement à l'ensemble des espèces bactériennes colonisant la section intestinale du tractus digestif. Il constitue un pan de recherche à lui seul et notre compréhension face à son impact sur la physiologie normale et pathologique de la santé humaine ne cesse d'évoluer.

La colonisation de ce tractus gastro-intestinal par le microbiome est un processus rapide et dynamique, ayant lieu dès la naissance de l'individu. Cette colonisation se complète généralement après les 3 premières années de vie et elle présente initialement une faible biodiversité, laquelle évoluera par la suite, notamment via l'introduction d'aliments solides dans le régime alimentaire de l'individu. Même si la biodiversité du microbiome est initialement restreinte durant les premières années de vie, c'est néanmoins durant cette période que le microbiome présente la plus grande variabilité observée entre les individus (18). Il tend ensuite à se stabiliser et à prendre la composition « classique » du microbiome adulte humain. Chez ce dernier, on compte environ  $10^{14}$

bactéries, soit dix fois plus de cellules microbiennes que de cellules eucaryotes composant le corps humain (19). Des différences dans la composition et la densité sont également observées en fonction de la région intestinale considérée, avec notamment une concentration et une diversité beaucoup plus faible au niveau de l'intestin proximal suite aux conditions physiologiques plus drastiques pour le règne bactérien. Inversement donc, la plus grande proportion de bactéries se trouve au niveau du côlon. Globalement, les groupes les plus abondants sont les gram-positives *Firmicutes* et *Actinobacteria* et les gram-négatives *Protobacteria* et *Bacteroides* (18). Cette microflore établit un équilibre symbiotique avec l'hôte et assure à elle seule des fonctions biochimiques et métaboliques complétant la physiologie de l'hôte. Par exemple, elle joue un rôle fondamental dans la digestion des nutriments, dans la fonction de la barrière épithéliale mais également dans le développement, la maturation et la régulation du système immunitaire intestinal.

D'un point de vue immunologique justement, la présence si intime d'une telle population bactérienne dans l'intestin constitue un perpétuel risque d'infection et d'inflammation. Chez l'individu sain, le maintien de cet équilibre symbiotique est garanti par une vigilance accrue du système immunitaire qui assure une double fonction : premièrement il prévient toute infraction bactérienne dans le torrent circulatoire mais dans un même temps, il permet une certaine tolérance face aux bactéries commensales. Il y a donc un dialogue bidirectionnel qui s'établit puisque le microbiome éduque le système immunitaire là où le système immunitaire régule la composition du microbiome (20). Toute dérégulation de cet équilibre peut favoriser une infraction bactérienne de la barrière intestinale, ce qui s'accompagne du développement d'une réponse immunitaire inappropriée et délétère pour l'individu, telle qu'observée par exemple dans les pathologies inflammatoires de l'intestin.

### **1.1.2.3 Les antigènes alimentaires**

Tel qu'abordé au point précédent, l'alimentation est un des facteurs majeurs influençant la composition du microbiome intestinal de l'individu. Cependant, le large spectre des macromolécules alimentaires constitue *per se* une seconde source d'antigènes face à laquelle l'immunité intestinale se doit de rester tolérante. Aussi, il convient de garder à l'esprit que certains composants alimentaires sont uniquement digérés par les bactéries du microbiome intestinal et les métabolites qui en résulte jouent un rôle crucial dans le développement de cette tolérance aux antigènes alimentaires et microbiotiques. Un exemple couramment cité est la production d'acides gras à courte chaîne résultant de la fermentation bactérienne des fibres végétales. Ces acides gras occupent une fonction fondamentale dans la biologie et l'homéostasie des cellules T régulatrices, acteurs primordiaux dans la tolérance (21-23). Ceci sous-entend donc l'existence d'un dialogue complexe entre le microbiome, les antigènes alimentaires et le système immunitaire intestinal. Ce triangle et les interactions qu'il implique garantissent le maintien de l'homéostasie intestinale.

Très brièvement, la nourriture ingérée fait l'objet d'une digestion progressive tout au long du tractus gastro-intestinal via différents processus mécaniques et enzymatiques dont la description détaillée serait ici hors contexte. Retenons que la digestion des macronutriments tels les protéines, glucides et lipides en micronutriments plus simples permet *in fine* d'atténuer largement leur potentiel immunogène tout en assurant leur absorption par les entérocytes. Néanmoins, certains composants alimentaires, tels que les fibres végétales par exemple, sont résistants à l'hydrolyse des enzymes digestives et feront donc plutôt l'objet d'une dégradation par fermentation bactérienne. Certaines macromolécules protéiques ne sont également que partiellement digérées, ce qui résulte en l'absorption de larges peptides conservant dès lors un potentiel immunogène. C'est

notamment le cas de la gliadine, une des fractions peptidiques résultant de la digestion incomplète du gluten et qui est responsable de la réponse immunitaire erronée observée chez l'individu cœliaque et sur laquelle nous reviendrons. Retenons que chez l'individu sain, ces antigènes alimentaires ne génèrent aucune réponse de la part du système immunitaire et vont, au même titre que les bactéries symbiotiques, être tolérés par ce dernier. Il est donc temps d'aborder maintenant le concept de la TO.

### **1.1.3 Les mécanismes de la tolérance orale**

Les deux précédentes sections nous permettent aisément de comprendre pourquoi il est indispensable pour l'immunité intestinale de disposer de mécanismes lui permettant de reconnaître et de tolérer les antigènes alimentaires et microbiens inoffensifs tout en étant capable de différencier les antigènes envahissants et de développer une réponse immunitaire adéquate face à ces derniers. Une rupture de la tolérance face aux antigènes de l'alimentation peut conduire à différents types d'allergies alimentaires ou encore à la MC, là où une perte de la tolérance face au microbiome conduit plutôt aux pathologies inflammatoires de l'intestin ou encore à l'obésité (24, 25). Aussi, les mécanismes sous-jacents la tolérance au microbiome et la tolérance aux antigènes alimentaires (on parle ici de TO) sont quelques peu différents. Seule la TO sera développée dans la présente section. Cette dernière se définit comme l'absence de réponse immunitaire faisant suite à l'administration orale d'antigènes, principalement issus des protéines alimentaires.

Ce mécanisme a été démontré aussi bien chez le rongeur que chez l'Homme (26-28) et différents facteurs influencent son développement tels que la dose d'antigène reçue, la nature de cet antigène ou encore la fréquence d'administration de ce dernier (29). Dans tous les cas, le développement de la TO permet d'éviter toute hypersensibilité

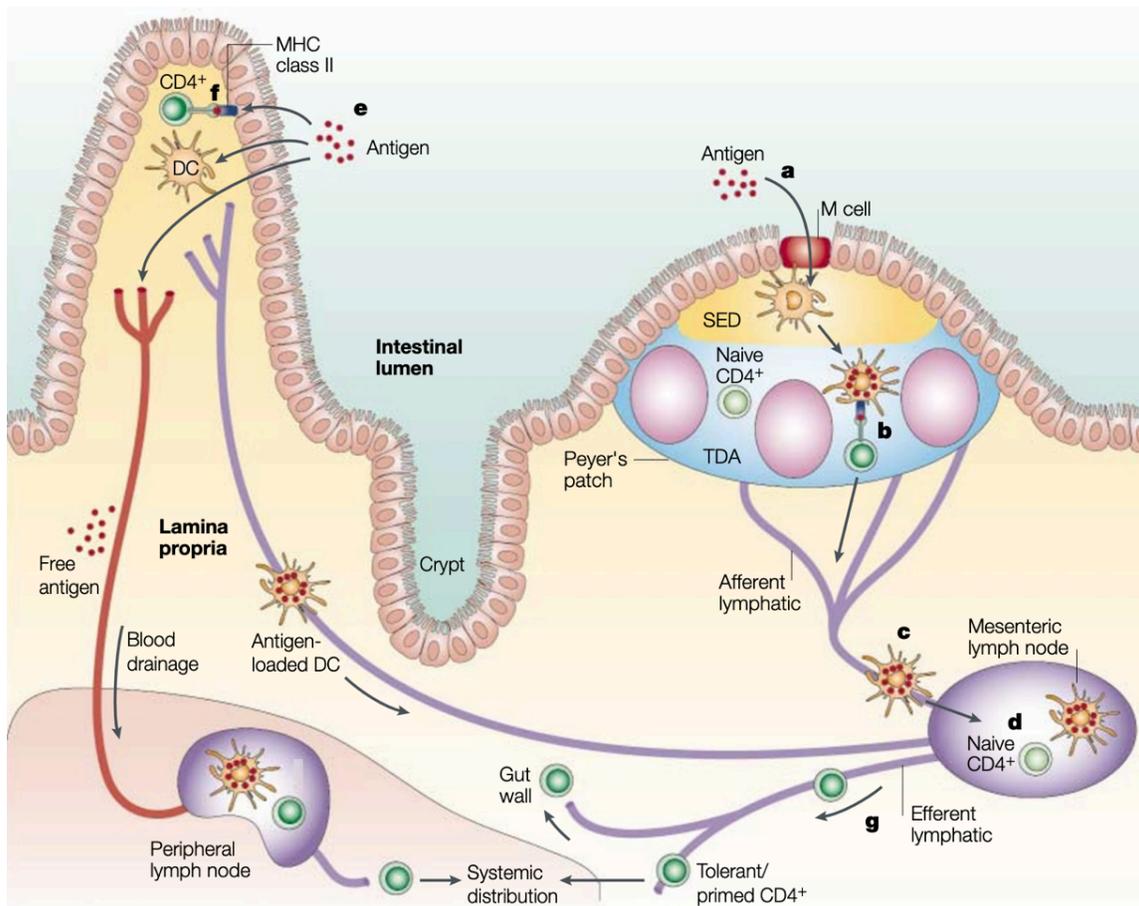
alimentaire en inhibant notamment la prolifération des LT et en limitant la production de cytokines et d'anticorps contre l'antigène alimentaire considéré.

L'induction de cette réponse tolérogène se fait dans la muqueuse du petit intestin et implique une réponse immunitaire locale et systémique particulièrement bien décrite par Pasbst et Mowat (7, 24) (**Figure 4**). De manière classique, les antigènes alimentaires peuvent traverser la barrière épithéliale intestinale et gagner alors le compartiment de la Lp où ils seront pris en charge par une population de CD tolérogènes. Ces dernières sont caractérisées par l'expression de l'intégrine  $\alpha E$  (CD103) et par la production d'acide rétinoïque et de TGF- $\beta$  (30-32). Ces CD vont maturer et migrer au niveau des GM (12) où elles présenteront les antigènes aux LT naïfs spécifiques de ces derniers. L'acide rétinoïque et le TGF- $\beta$  produits par ces CPA assurent un rôle clé dans l'induction de la TO. Premièrement ils vont permettre l'expression du facteur de transcription Foxp3 par les cellules T naïves spécifiques de l'antigène, lesquelles évolueront alors vers un profil de lymphocytes T régulateurs (LTreg) (30, 32, 33). Ensuite, ces cytokines vont permettre l'expression de différents récepteurs de migration intestinale tels l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et le récepteur CCR9 (C-C chemokine receptor type 9), permettant à ces LTreg de gagner la Lp où ils vont alors prévenir toutes réponses inflammatoires inappropriées face à l'antigène alimentaire considéré (34, 35), notamment via la production de cytokines immunosuppressives telles l'IL-10 ou de nouveau le TGF- $\beta$  (26, 30, 36). C'est précisément cette circulation des LTreg depuis les GM qui va garantir une tolérance systémique face à l'antigène alimentaire considéré.

Parallèlement à l'induction de cellules Treg, deux autres mécanismes interviennent dans le développement de la TO: l'anergie et la délétion clonale (37). Retenons simplement ici que le facteur principal orientant l'un ou l'autre mécanisme de tolérance semble être la quantité d'antigènes à laquelle l'organisme est exposé (26). Une

dose élevée est associée avec une association au TCR dépourvue de signaux de costimulation, favorisant alors une réponse immunosuppressive, à savoir une anergie ou une délétion des cellules T intestinales. À contrario, une faible dose oriente plutôt une réponse tolérogène via l'activation des LTreg. Ces derniers entretiennent un environnement immunosuppresseur via leurs interactions cellulaires directes et via la sécrétion de cytokines immunosuppressives tels le TGF- $\beta$  et IL-10 (38).

Finalement, les mécanismes de la TO ne sont pas infaillibles et peuvent dans certains cas faire défaut. Le système évolue alors vers une situation caractérisée par le développement d'une réponse immunitaire erronée ciblant un antigène alimentaire. La pathologie alimentaire la plus fréquemment rencontrée suite à cette rupture de la TO est la MC que nous allons maintenant discuter en détails. Le point 2 de cette introduction dresse un portrait clinique complet de la pathologie et le point 3 envisage sa pathogenèse de façon détaillée.



**Figure 4: capture de l'antigène et activation des LT CD4<sup>+</sup> spécifiques de ce dernier.**

Les antigènes sont bien souvent véhiculés via les cellules M de l'épithélium des plaques de Peyer (**a**) et transférés jusqu'aux cellules dendritiques sous-jacentes, lesquelles présentent l'antigène processé aux cellules T naïves spécifiques de ce dernier. (**b**) Les cellules dendritiques peuvent également migrer jusqu'au niveau des ganglions mésentériques (**c**) et de la même manière, activer les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves présentes dans ces derniers (**d**). Cette voie est également employée par les cellules dendritiques de la lamina propria captant directement des antigènes ayant traversé l'épithélium intestinal sans l'aide des cellules M (**e**). Aussi, il se peut que les entérocytes expriment également le CMH de classe II et jouent le rôle d'APC pour les cellules T CD4<sup>+</sup> présents dans la lamina propria (**f**). Dans tous les cas, les cellules T CD4<sup>+</sup> ainsi activées expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et le récepteur CCR9 (C-C chemokine receptor type 9), leur permettant de migrer dans la lamina propria via les vaisseaux lymphatiques efférents (**g**). SED, subepithelial dome; TDA, thymus-dependent area. Adapté de (7).

## 1.2 Vue d'ensemble de la maladie cœliaque

### 1.2.1 Contexte historique

Historiquement, la MC est une pathologie ancestrale résultant du mode de vie de la civilisation humaine. Elle apparaît suite au développement de l'agriculture et de l'introduction des céréales dans l'alimentation durant la période néolithique, il y a environ 10.000 ans. Plus précisément c'est le peuple romain qui s'est préférentiellement tourné vers la consommation du blé étant donné ses caractéristiques d'élasticité et de viscosité, nécessaires pour la fabrication du pain mais également directement liée à la présence de gluten (39). La première description du tableau clinique de la maladie remonte à la seconde moitié du 2<sup>ème</sup> siècle de notre ère, durant l'Antiquité, et revient au médecin grec Aratée de Cappadoce. Ce dernier décrira une symptomatologie classique avec diarrhées sévères, douleur et distension de la paroi abdominale et syndrome de malnutrition évolutif. Il reconnaîtra également l'atteinte du compartiment intestinal dans cette symptomatologie et il est à l'origine du terme cœliaque, du grec *koeliakos*, signifiant littéralement « souffrance de l'intestin » (40, 41). Il faudra patienter la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour voir apparaître une description médicale moderne de la pathologie mais surtout une première connexion faite avec le régime alimentaire grâce au pédiatre anglais Samuel Gee, en 1888. Ce dernier suggéra que le suivi d'une diète pauvre en farine constituait la charpente d'un traitement bénéfique pour ses jeunes patients sans pour autant pouvoir identifier l'agent causal (42).

C'est dans les années 1950 que la relation causale entre la MC et la consommation de céréales sera clairement et scientifiquement mise en évidence, principalement grâce aux recherches de la thèse doctorale du Dr. Willem Karel Dicke. Considéré comme le pionnier dans le domaine, ce dernier soupçonna une corrélation entre l'apparition des

symptômes de la maladie et la consommation de pain et autres dérivés céréaliers. Il a ensuite confirmé cette observation durant la seconde guerre mondiale où le tableau clinique des patients disparaissait de manière drastique suite au remplacement des céréales durant cette période de rationnement par un autre type de diète (43). Étant donné que les patients présentaient une rechute de leur condition suite à la réintroduction du pain après la période de pénurie, il entreprit des schémas expérimentaux contrôlés en exposant ses patients à différentes diètes plus ou moins riches en produits céréaliers tout en mesurant la malabsorption associée. Ceci en fit le premier médecin à instaurer l'idée d'un régime alimentaire excluant le blé, le seigle et l'orge et à constater que la santé du patient s'en trouvait grandement améliorée.

Quelques années plus tard, en 1954, Paulley apporte une première lumière sur les lésions de la maladie en examinant des biopsies obtenues par laparoscopie chez des patients souffrant de stéatorrhée. Ses travaux décrivent pour la première fois l'atrophie des villosités et l'infiltration lymphocytaire épithéliale caractérisant la muqueuse intestinale du patient cœliaque (44). Consécutivement à ces percées, les recherches de Charlotte Anderson permettront d'identifier définitivement le gluten comme étant la fraction toxique des céréales pour le patient cœliaque et responsable des lésions intestinales (45).

Enfin, c'est dans la seconde partie du 20<sup>ème</sup> siècle que sera progressivement identifiée l'implication du système immunitaire et du paysage génétique dans le décours de la pathologie (46). Notamment, l'implication du système HLA de classe II et plus précisément des haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8 sera identifiée comme facteur majeur de prédisposition génétique grâce aux différents travaux menés par Howell et Sollid, respectivement en 1986 et 1989 (47, 48). Durant cette même période, l'avènement des techniques d'investigations médicales telles que l'endoscopique digestive couplée à la

biopsie vont grandement améliorer le diagnostic de la maladie par identification formelle des altérations de la muqueuse intestinale causées par la consommation de gluten. Par ailleurs, Marsh sera, en 1992, le premier à décrire avec précision les différents stades évolutifs de l'atteinte de la muqueuse du patient cœliaque et définira 5 types d'atteintes histologiques, connues sous le nom de classification de Marsh, laquelle sera détaillée au point 1.2.6.2.A (49).

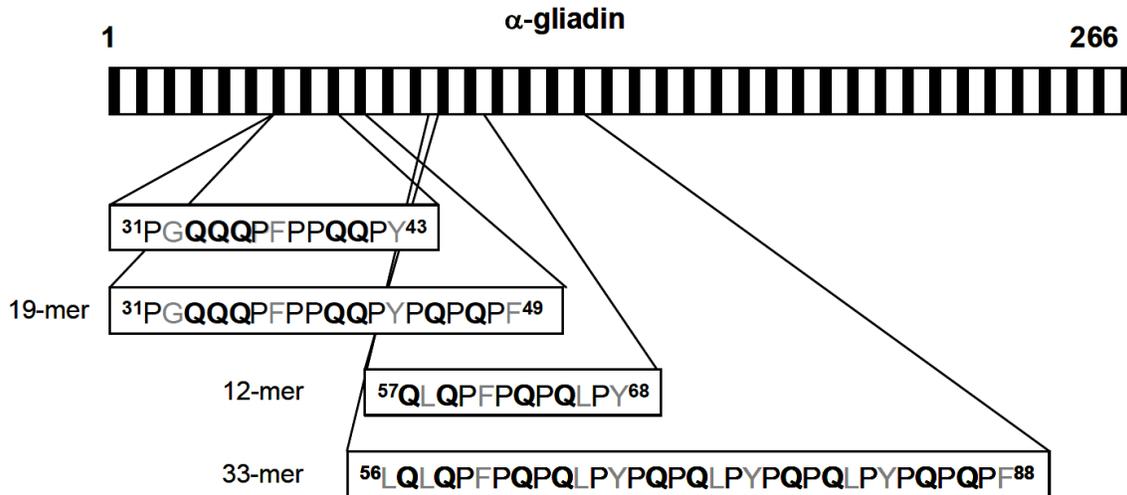
Finalement, c'est en 1997 que Walburga Dieterich identifiera l'autoantigène de la maladie, l'enzyme transglutaminase II tissulaire (tTGII), jouant un rôle clé dans la pathogenèse de la maladie et sur laquelle nous reviendrons en détail au point 1.3.2.2.C (50, 51). Elle identifiera également les auto-anticorps associés et ciblant cette enzyme endogène, prouvant définitivement la facette auto-immune de cette maladie. Cette découverte est absolument majeure dans l'historique de la pathologie puisqu'elle a mené au développement de nouveaux outils de diagnostic cliniques. Basés sur des tests sérologiques, ces outils de diagnostic vont permettre de lever le voile sur la réelle épidémiologie de cette maladie avec l'identification d'une prévalence complètement inattendue, propulsant la MC du statut de pathologie pédiatrique rare à celle de pathologie fréquente touchant des individus de tous âges et présentant un large éventail de symptômes cliniques (52). Maintenant que son contexte historique est dressé, il convient de définir clairement la pathologie et les termes qui y sont associés.

### **1.2.2 Définitions et concepts généraux**

Le gluten a donc été identifié comme l'antigène alimentaire de la MC. D'un point de vue dichotomique, ce gluten est en réalité un terme général regroupant deux grandes classes de protéines de stockage énergétique retrouvées dans les céréales et classées selon leur solubilité dans l'alcool ; les gluténines, insolubles et les prolamines, solubles.

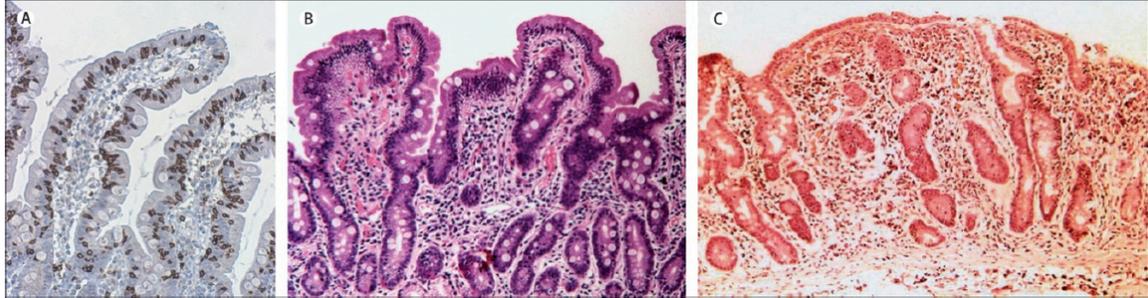
Les gluténines sont des macroprotéines polymériques généralement très peu toxiques pour le patient tandis que les prolamines sont de petites protéines monomériques et sont responsables de la toxicité du gluten pour le patient. Ce sont les prolamines du blé qui sont les mieux caractérisées, elles sont appelées gliadines et sont subdivisées en gliadines  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\omega$ , sur base de leur région amino-terminale et de leur mobilité électrophorétique décroissante. Les prolamines du seigle et de l'orge sont respectivement les sécalines et les hordéines (53, 54). Le point commun de ces prolamines est la présence de séquences répétées riches en glutamine et en proline, ce qui les rends particulièrement résistantes à la protéolyse des enzymes gastro-duodéno-pancréatiques du tractus digestif, lesquelles sont dépourvues d'activité propyl-endopeptidase (55, 56). Cette résistance à la digestion intervient directement dans leurs aptitudes immunogènes puisque ces peptides vont ainsi s'accumuler dans la lumière intestinale et subir des modifications post-traductionnelles une fois absorbés, telles que la déamidation par la tTGII, un processus sur lequel nous reviendrons également au point 1.3.2.2.C.

Bien que ces différentes prolamines soient toutes toxiques pour le patient cœliaque, on retiendra que la plupart des épitopes immunodominants dérivent de la séquence de la gliadine- $\alpha$  du blé (57-59). Longue de 266 acides aminés, on retrouve notamment dans cette gliadine- $\alpha$  la séquence 56-88, laquelle contient elle-même 6 épitopes dont les séquences immunogènes se chevauchent (9-mer, 13-mer, 17-mer, 18-mer, 25-mer et 33-mer) (60, 379) (**Figure 5**). Cette séquence 33-mer et les séquences qui en dérivent sont généralement reconnues comme étant les épitopes immunoréactifs les plus efficaces dans l'activation de la réponse inflammatoire et la réponse auto-immune caractéristique de la MC (56).



**Figure 5: séquence de l'α-gliadine.** L'α-gliadine est le peptide immunogénique majeur du gluten et présente une longueur de 266 acides aminés, riche en proline (P) et en glutamine (Q). Elle présente différentes séquences peptidiques immunogènes dont le 33-mer 56-88, un épitope extrêmement réactif chez le patient cœliaque (379).

De nos jours, le concept de cette maladie est défini par la Société Européenne de Pédiatrie, Gastroentérologie, Hépatologie, et Nutrition comme étant une entéropathie auto-immune développée suite à la consommation de protéines de gluten chez des individus génétiquement prédisposés exprimant l'haplotype HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 du système HLA (46, 61, 62). Elle se traduit au niveau histologique par une altération de la muqueuse intestinale prédominant au niveau du grêle proximal et dont le spectre s'étend de la discrète lymphocytose intra-épithéliale jusqu'à l'atrophie villositaire complète (**Figure 6**) (62).



**Figure 6: évolution représentative de l'atteinte histologique dans la MC.**

(A) Lymphocytose intra-épithéliale sans atrophie villositaire. Marquage hématoxyline-éosine et CD3. (B) Atrophie villositaire partielle avec raccourcissement des villosités. (C) Atrophie villositaire totale, les villosités sont indétectables (62).

D'un point de vue immunologique, cette perte de la TO au gluten se traduit chez ces patients par l'activation conjointe de l'immunité innée et adaptative, lesquelles sont responsables de la réponse inflammatoire intestinale chronique. Cette dernière est principalement orchestrée par les LT spécifiques du gluten. D'une part, ils permettent le développement d'une puissante réponse humorale avec activation des lymphocytes B spécifiques du gluten et de la tTGII, responsables de la signature sérologique de la maladie. D'autre part, ils vont également sécréter une batterie de cytokines pro-inflammatoires intervenant dans l'activation de la fonction cytotoxique des LIEs et dans le stress cellulaire des entérocytes. Ces deux types de réponse seront discutées en profondeur aux points 1.3.2.2 et 1.3.2.3.

En conséquence, ces lésions inflammatoires vont profondément impacter la qualité de vie du patient qui souffre de diarrhées chroniques, de douleurs abdominales mais surtout d'un syndrome de malabsorption alimentaire de degré variable. Ce dernier inclut notamment une carence sévère en minéraux et vitamines, essentiels au bon développement de l'organisme (63, 64). On note principalement une carence en fer, en acide folique, en vitamine D et en calcium. Il s'en suit donc des troubles tels que l'anémie ferriprive et l'ostéoporose. On comprend donc aisément pourquoi le jeune patient

coélie présente généralement un retard de croissance, un état cachectique et asthénique.

Depuis Willem Dicke jusqu'à ce jour, le seul traitement permettant une régression efficace de ce tableau clinique est purement diététique et se cantonne au suivi à vie d'une diète stricte sans gluten (65, 66). Bien qu'un tel régime améliore significativement et en quelques semaines les signes cliniques et histologiques présentés par le patient, il n'est pas toujours efficace (67, 68) et ses exigences sont un réel défi pour le patient, particulièrement chez les jeunes individus (69, 70). Toute pathologie non correctement prise en charge par un tel régime présente un impact majeur sur l'état de santé du patient et peut potentiellement évoluer vers de sérieuses complications, telles que le développement de lymphomes intestinaux (71-73).

Pour conclure le portrait de la maladie, ce qui la rend particulièrement intéressante au niveau de la recherche qui lui est dédiée est l'identification de l'antigène externe (le gluten), l'identification des facteurs génétiques (principalement le phénotype HLA) et finalement la facilité d'accès du tissu ciblé (le grêle proximal). Ceci fait de la MC une pathologie unique pour l'étude des mécanismes sous-jacents la rupture de la TO face à un antigène alimentaire ainsi que pour le développement de potentiels modèles d'études et stratégies thérapeutiques pouvant remplacer la diète sans gluten.

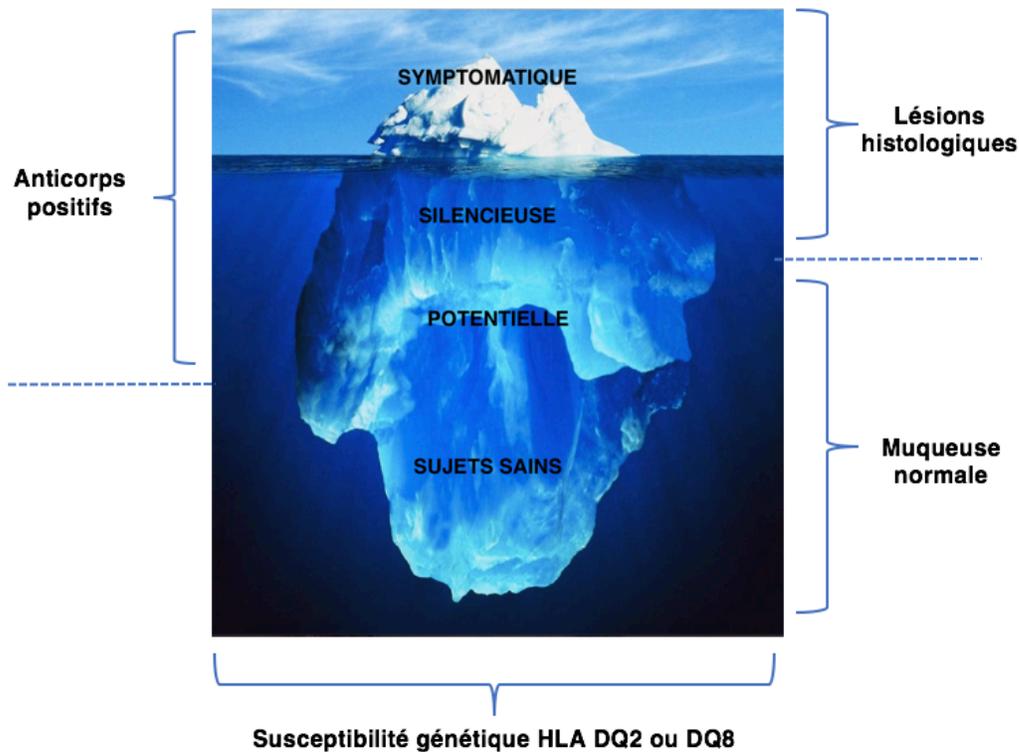
### **1.2.3 L'iceberg coélie et ses différents phénotypes**

La MC est un véritable caméléon en termes de symptomatologie clinique. L'évolution des connaissances sur la pathologie s'est accompagnée d'une meilleure compréhension de son spectre clinique, lequel présente en réalité un aspect polymorphique complexe. Ceci sous-entend l'existence de différentes formes ayant

chacune leurs spécificités en termes de signes cliniques contribuant au diagnostic, lequel n'est pas toujours évident. En effet, on décrit des formes symptomatiques dont la détection est aisée mais également des formes potentielles et silencieuses, pouvant rester en dehors du radar des outils diagnostiques et constituant pourtant la majorité des cas (46).

Une manière élégante et couramment acceptée d'illustrer ce polymorphisme est le concept de l'iceberg cœliaque, métaphore introduite pour la première fois par Anne Ferguson en 1993 (74). Ce modèle visuel (**Figure 7**) permet une compréhension plus aisée de son épidémiologie, laquelle sera discutée au point suivant. Concrètement, cet iceberg, lorsqu'il est considéré dans son entièreté, représente l'ensemble d'une population dans un espace-temps considéré. Cette dernière est caractérisée par l'expression du paysage génétique prédisposant de la maladie, à savoir l'haplotype HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 et peut se fractionner en 3 sous-populations sur base de la sérologie, de l'histologie et de la symptomatologie (75). Une fraction de cette population à risque se caractérise par une sérologie positive pour les anticorps spécifiques anti-gliadine et anti-tTGII sans que la biopsie intestinale ne montre d'altération au niveau de la muqueuse et sans qu'il y ait de symptômes évocateurs. On parle ici de la **forme potentielle** de la maladie. Une seconde fraction de la population considérée se caractérise quant à elle par une sérologie positive, une atrophie villositaire typique mais un état asymptomatique. C'est la **forme silencieuse** de la pathologie. Ensemble, la forme potentielle et la forme silencieuse constituent la majorité de la réelle population cœliaque, non diagnostiquée, car telle la partie immergée d'un iceberg, cette population n'est pas directement visible. Finalement, la partie émergée regroupe l'ensemble des patients présentant la **forme classique** avec une symptomatologie digestive accompagnée d'une altération histologique de la muqueuse intestinale et d'une séropositivité. Cette forme classique présente *per se* une certaine variabilité interindividuelle dépendant de plusieurs facteurs dont l'âge du patient, la

présence de symptômes extradigestifs ou encore la durée de la pathologie (76). La dernière forme qu'il convient d'aborder ici et qui ne fait pas encore partie de l'iceberg est la **forme réfractaire**. Ces individus souffrent d'une forme classique clairement identifiée évoluant par la suite vers une symptomatologie digestive beaucoup plus sévère et pour lesquelles l'éviction du gluten n'a aucun effet thérapeutique. Ces patients ont de fortes probabilités quant au développement d'un lymphome intestinal à cellules T (77). Bien que ces polymorphismes soient à ce jour clairement identifiés, il faut savoir que les mécanismes sous-jacents le passage plus ou moins rapide de la forme potentielle à la forme asymptomatique puis symptomatique voir réfractaire ne sont pas encore élucidés (75).



**Figure 7: modèle de l'iceberg cœliaque.** Ce modèle visuel permet de représenter le polymorphisme et l'épidémiologie de la pathologie cœliaque. D'après le spectre évolutif défini par Fasano et Catassi (75).

#### 1.2.4 Épidémiologie

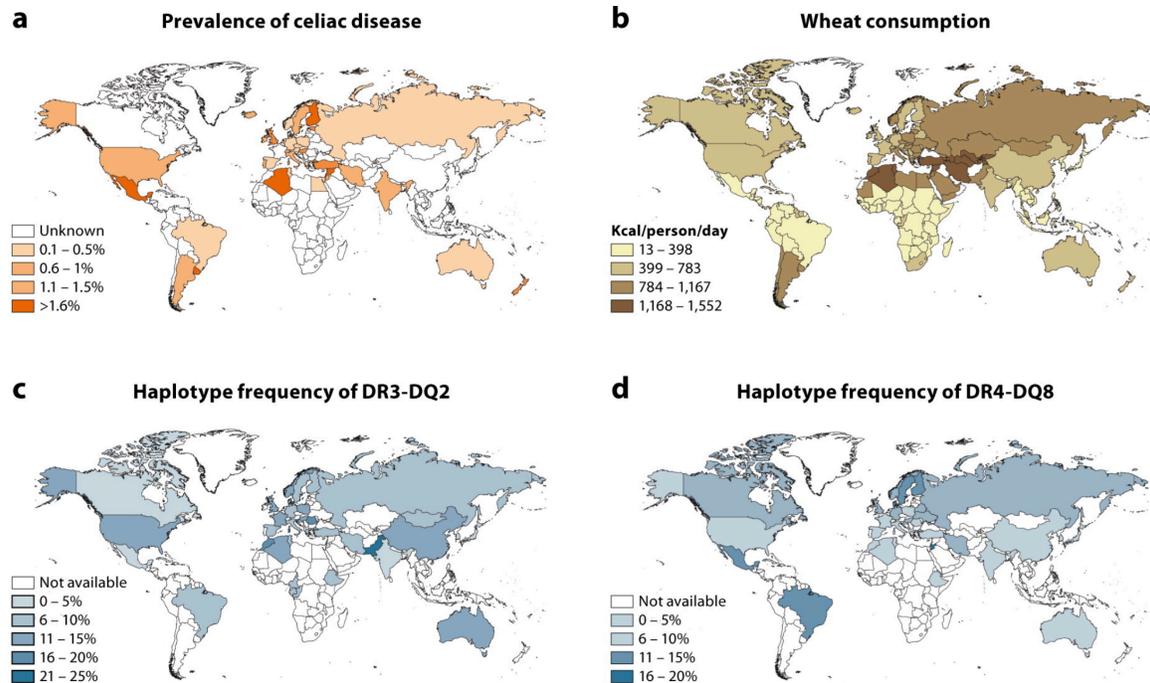
Initialement, la MC fût considérée comme un désordre génétique pédiatrique rare, touchant principalement la population caucasienne avec une prévalence de 0,03% (78, 79). Cette sous-estimation s'explique facilement avec le concept de l'iceberg puisqu'elle ne prenait en considération que la fraction visible, à savoir les formes sévères à la symptomatique bruyante, sans considérer les formes potentielles et silencieuses qui sont, nous l'avons vu, les plus fréquentes. C'est en 1997, via la découverte de l'auto-antigène par Dieterich, que l'essor de la sérologie cœliaque révolutionnera le diagnostic et les études épidémiologiques permettant alors l'identification des formes potentielles

et silencieuses et dans un même temps l'estimation d'une prévalence mondiale jusqu'alors insoupçonnée, atteignant un individu sur cent (46, 80-82).

Ce nouveau visage épidémiologique permet à la MC de se classer parmi les désordres auto-immun/génétique les plus communs à l'échelle mondiale, survenant dans un grand nombre de cultures et de groupes ethniques. Bien que la pathologie puisse survenir chez les individus de tous âges, on distingue néanmoins deux pics de diagnostics évidents correspondant aux périodes de l'enfance et de l'âge adulte. Le premier pic concerne en effet les très jeunes individus âgés de 6 mois à 24 mois et semble lié à l'introduction de produits céréaliers, et donc de gluten, dans le régime alimentaire. Le second pic de diagnostic concerne les adultes de 30 à 40 ans (69, 83). Aussi, et comme de nombreuses maladies au caractère auto-immun, la MC touche plus fréquemment les femmes que les hommes avec un ratio allant de 3 à 2 pour 1, sans qu'il n'y ait à ce jour de véritable explication à cette constatation (84). On notera également une atteinte beaucoup plus importante dans certaines populations à risque, telles que les individus présentant des désordres immuns et génétiques (73). Par exemple la pathologie est beaucoup plus fréquente chez les patients atteints d'un diabète de type I (85), de thyroïdite auto-immune (86) ou encore chez les personnes déficientes pour la production d'IgA (87). Les personnes souffrant du syndrome de Down et du syndrome de Turner sont également plus à risque (88, 89).

Finalement, l'incidence varie clairement selon les régions du globe considérées et cette variabilité trouve une part d'explication dans la distribution des allèles de prédisposition du HLA corroborée à la consommation de gluten (**Figure 8** et **Figure 12**) (79, 90). En d'autres termes, en plus d'être une pathologie polymorphique, la MC est également une pathologie multifactorielle résultant d'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux que nous aborderons en détails au point 1.2.5.

Pour l'instant, gardons à l'esprit que le développement de cette pathologie se développe uniquement chez les individus porteurs des haplotypes HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 tel que démontré par Ludwig Sollid en 1989 (48). L'entourage familiale d'un individu cœliaque présente une potentialité certaine de développer la maladie avec une prévalence de 1 pour 22 et de 1 pour 39 dépendamment du premier ou du second degré de relation avec le patient, respectivement (81, 91). Aussi, des études menées chez les jumeaux ont démontré une plus haute concordance entre les jumeaux homozygotes comparés aux dizygotes, avec respectivement 75% et 30% des individus présentant simultanément la pathologie (92, 93). Retenons également l'importance de la composante environnementale de la pathologie, avec ce rôle irréfutable joué par la consommation de gluten mais aussi probablement par d'autres facteurs tels que l'âge d'introduction de ce gluten, la composition du microbiome (94) ou les infections virales du tractus intestinal (95, 96).



**Figure 8: prévalence de la maladie cœliaque, consommation de blé et fréquences des haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8 à l'échelle mondiale. (a)** Prévalence de la MC sur base du dépistage dans la population adulte ou de la population infantile lorsque la prévalence adulte n'a pas été déterminée. **(b)** Distribution mondiale de la consommation de blé (<http://www.fao.org>). **(c)** Fréquence de l'haplotype HLA-DQ2 et **(d)** fréquence de l'haplotype HLA-DQ8 (79).

## 1.2.5 Facteurs de risque

### 1.2.5.1 Facteurs génétiques

Comme nous venons de l'aborder, la génétique joue un rôle incontournable dans la susceptibilité et le développement de la maladie. L'implication d'un paysage génétique unique et prédisposant à la maladie a été soupçonnée et confirmée suite aux études intrafamiliales, menant donc aux observations d'une incidence plus élevée entre les individus d'une même famille, particulièrement entre jumeaux homozygotes. Précisons ici que la MC n'est pas une pathologie monogénique due à la présence d'une mutation

particulière. Au contraire, on parle plutôt ici d'un ensemble d'allèles qui, considérées séparément, ne causent aucun trouble mais qui, combinées ensembles et à certains facteurs environnementaux, conduisent à la pathogenèse de la maladie.

#### **A. Association aux gènes du système HLA**

Plus précisément, c'est le système du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) qui est ici mis en cause (48). Chez l'Homme, on parle du système des antigènes leucocytaires humains ou système HLA (Human Leukocyte Antigen). Ce dernier est entièrement codé au niveau du chromosome 6, comporte environ 200 loci de gènes et est organisé en HLA de classe I, de classe II et de classe III. Brièvement, les deux premières classes codent pour des glycoprotéines de surface cellulaires appartenant à la famille des immunoglobulines et sont nécessaires à la présentation des antigènes au récepteur des cellules T. La classe I est virtuellement exprimée à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme et se spécialise dans la présentation d'antigènes intracellulaires aux cellules T CD8<sup>+</sup>. La classe II quant à elle est uniquement exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes telles les CD, les macrophages et les LB. Elle permet la présentation d'antigènes extracellulaires aux cellules T CD4<sup>+</sup>. Finalement, retenons simplement ici pour information que la classe III code pour des protéines du complément et de la famille du TNF (Tumor necrosis factor).

Dans le contexte cœliaque, c'est la classe II qui est impliquée dans la prédisposition génétique du patient. Cette dernière est codée par la région HLA-D du chromosome 6 et présente de multiples variants codés par les gènes *HLA-DP*, *DM*, *DOA*, *DOB*, *DQ* et *DR*. La nomenclature commence toujours par la dénomination HLA couplée au nom de l'allèle (exemple : HLA-DQA1) suivi d'un trait d'union, suivi du gène séparé par un astérisque, suivi du groupe d'allèles séparé par deux points, suivi de la protéine (exemple : HLA-

DQA1\*05 :01). Une autre possibilité est de dénommer la molécule par sa chaîne  $\beta$  séparée par un point de sa chaîne  $\alpha$  (exemple : HLA-DQ2.5).

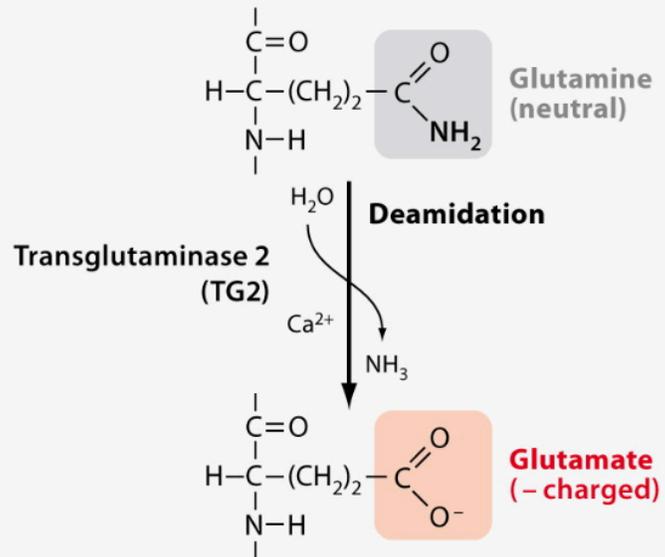
Retenons surtout que les gènes de la classe II codent donc pour un ensemble de protéines exprimées à la surface des CPA. Dans le contexte de la MC, on s'intéresse particulièrement à la molécule HLA-DQ. Cette dernière se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une chaîne  $\alpha$  et d'une chaîne  $\beta$  respectivement codée par un ensemble d'allèles DQA1 et DQB1. Chaque chaîne comporte deux domaines; un domaine amino-terminal polymorphique  $\alpha 1$  et  $\beta 1$ , comportant ensemble le sillon de présentation de l'antigène, et un domaine hautement conservé,  $\alpha 2$  et  $\beta 2$  (97). Concrètement, une fois l'antigène capté et catabolisé par les CPA, elles vont le présenter via ces protéines du HLA aux TCR des cellules T CD4<sup>+</sup>, menant alors à la réponse immunitaire contre cet antigène.

Les variants impliqués dans la pathologie, et donc dans la reconnaissance pathogénique du gluten, sont les molécules DQ2 et DQ8. La première est codée par la chaîne  $\alpha$  HLA-DQA1\*05 :01 et la chaîne  $\beta$  DQB1\*02 :01. La seconde est codée par la chaîne  $\alpha$  DQA1\*03 :01 et la chaîne  $\beta$  DQB\*03 :02 (98, 99). La question venant naturellement à l'esprit est de savoir pourquoi ce sont précisément ces deux haplotypes qui sont impliqués dans la pathologie? Les études cristallographiques ont permis d'apporter la réponse à cette question et démontrent que c'est le polymorphisme de leur sillon de présentation de l'antigène qui est parfaitement adapté pour la fixation et la présentation du gluten aux cellules T CD4<sup>+</sup> (100-102). En effet, et ce point permet d'introduire le rôle clé de l'enzyme tTGII dans la maladie, il faut savoir que le gluten absorbé est un excellent substrat pour cette enzyme étant donné sa richesse en proline et glutamine. La tTGII est capable de fixer le gluten au niveau de son site actif avec en conséquence une déamidation de ses résidus glutamine en résidus glutamate, lesquels sont chargés négativement (103). L'enzyme semble tout à fait spécifique dans son

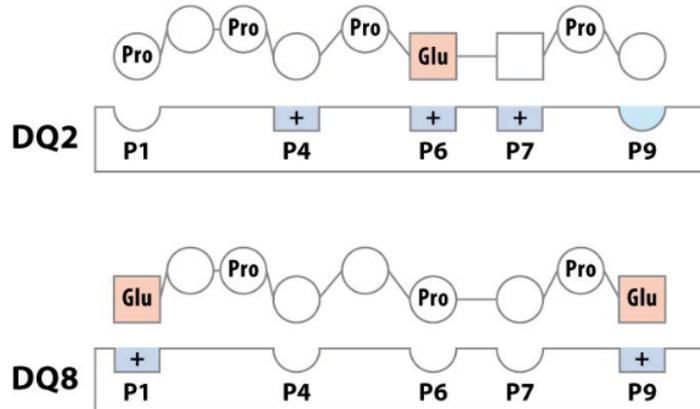
processus de déamidation du gluten puisqu'elle cible des résidus glutamines présents dans la séquence glutamine-X-proline, le X étant n'importe quel acide aminé (104).

Ainsi, ce sont précisément l'apparition de ces charges négatives sur le gluten déamidé qui augmente significativement et spécifiquement son affinité pour le sillon de présentation peptidique du DQ2 et du DQ8 qui sont eux chargés positivement (**Figure 9**). Plus précisément, la lysine en position  $\beta$ 71 du DQ2 permet la fixation de peptides chargés négativement au niveau des poches positives p4, p6, p7. Pour le DQ8, c'est l'alanine en  $\beta$ 57 qui assure cette fixation au niveau des poches p1 et p9 (105, 106). Ces interactions vont donc permettre une excellente synapse entre les cellules présentatrices du gluten et le TCR des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de ce dernier.

## Posttranslational modification



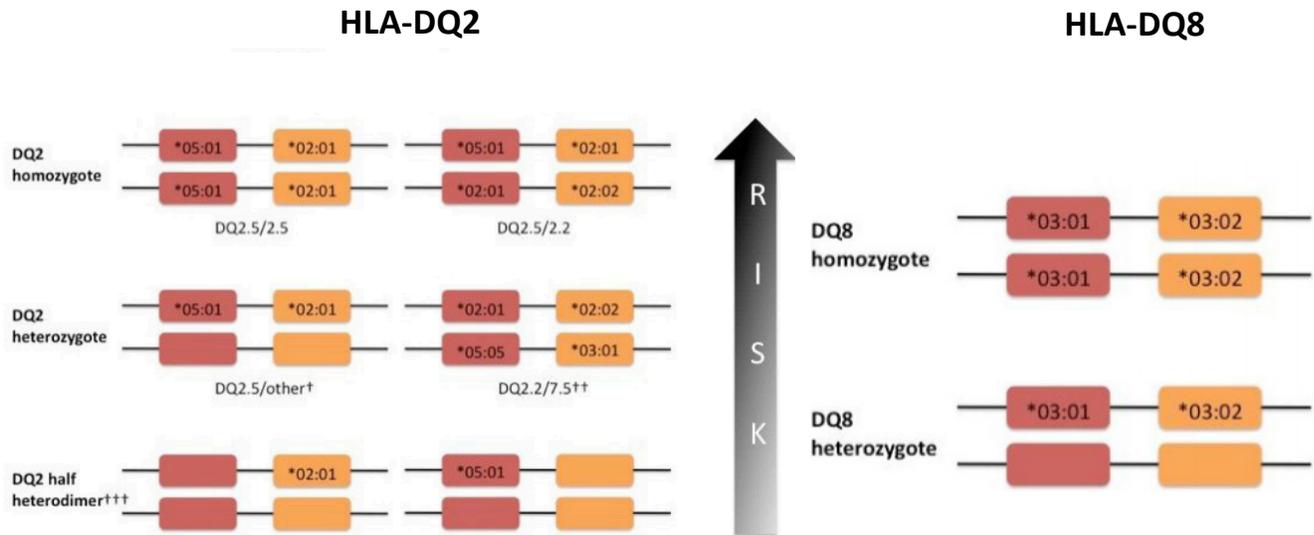
## MHC class II-peptide complexes



**Figure 9: déamidation post-traductionnelle du gluten par la tTGII et interactions résultantes avec les molécules du HLA-DQ2 et du HLA-DQ8.** Le gluten est un excellent substrat pour la tTGII, laquelle déamide ses résidus glutamines en résidus glutamates, chargés négativement. L'apparition de ces charges négatives augmente significativement l'affinité du gluten déamidé pour les molécules HLA-DQ2 et HLA-DQ8 présentant respectivement des charges positives au niveau des poches P4, P6, P7 et P1, P9 (79).

Enfin, pour en revenir aux statistiques, 90% à 95% des patients cœliaques présentent le phénotype DQ2 à la surface de leurs APC là où les 5 à 10% restant sont positifs pour l'haplotype DQ8 (107, 108). Il convient de souligner que le nombre, le type et la configuration des allèles DQA1 et DQB1 codant la molécule HLA-DQ exprimée par le patient influent sur la sévérité de la pathologie. Ainsi, les individus au génotype homozygote présentant les mêmes allèles sur les deux chromosomes présentent logiquement un plus haut degré de susceptibilité comparativement aux individus hétérozygotes, on parle d'un effet gène-dose dépendant, augmentant le facteur de risque de 4 à 6 fois pour ces individus homozygotes (107, 109). Concrètement, l'homozygotie résulte en 4 possibilités de combinaison entre les chaînes  $\alpha$  et les chaînes  $\beta$ , toutes résultants en la même protéine capable de présenter efficacement le gluten déamidé. A contrario, le sujet hétérozygote présente lui aussi 4 possibilités de combinaisons entre ces chaînes mais seulement une d'entre elles sera capable de présenter le gluten déamidé de manière efficace. On comprend dès lors pourquoi l'homozygotie de ces allèles est associée à la sévérité du spectre clinique observé chez le patient (110, 111) (**Figure 10**).

Pour conclure, il faut savoir qu'environ 40% de la population générale est positive pour ces allèles de prédisposition mais seul 1% développera la pathologie suite à une exposition au gluten (48, 98). À contrario, moins d'1% des patients cœliaques sont négatifs pour ces allèles prédisposantes du HLA (112). En conséquence de ces observations, le système HLA est un facteur génétique prédisposant majeur mais il ne mène pas à lui seul au développement de la maladie. En réalité il explique 40% de son héritabilité, sous-entendant donc que les 60% restant reposent sur d'autres déterminants génétiques (113).



**Figure 10: risque de développement de la MC associé aux différentes combinaisons des allèles pour le HLA-DQ2 et le HLA-DQ8.** Les génotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8 sont constitués de chaînes  $\alpha$  et de chaînes  $\beta$  indiquées respectivement en rouge et en orange. À gauche, l'homozygotie HLA-DQ2 ne comporte que des molécules du HLA-DQ2 et présente le risque le plus sévère de développer la MC tandis qu'une hétérozygotie comporte une allèle HLA-DQ2 et une autre allèle DQ, associée alors avec un risque réduit. Un faible nombre d'individus comporte uniquement une chaîne  $\alpha$  ou une chaîne  $\beta$ , on parle de demi-hétérodimère, associé au risque le plus faible de développer la maladie. À droite, les génotypes HLA-DQ8. Ici aussi l'homozygotie est uniquement constituée de chaînes HLA-DQ8 et l'hétérozygotie d'une chaîne DQ8 et d'une autre chaîne DQ. Adapté de (121).

## B. Association à d'autres gènes

C'est ici que les études d'association pangénomiques (GWAS, Genome Wide Association Studies) appliquées aux patients cœliaques rentrent en jeu. L'objectif de ces études génétiques à large échelle est d'identifier des variabilités alléliques spécifiques des patients, lesquelles seraient alors potentiellement importantes dans la pathogenèse de la MC. Ces méta-analyses ont permis de cerner davantage la cartographie génétique de la maladie en révélant l'identité de 43 variants génomiques à risque, hors zone HLA et recouvrant 64 gènes candidats (114-120). On notera néanmoins que ces 43 loci comptent pour environ 15% de la variance de la génétique là où la région du HLA compte pour

environ 40% (115, 121). Aussi, bien que leurs rôles n'aient pas encore été prouvés comme essentiels au décours de la maladie, 28 sur 43 de ces variants génétiques sont impliqués dans des processus immunitaires tant innés qu'adaptatifs qui, comme nous le verrons, ne sont pas étrangers à la mécanistique de la pathologie. Il s'agit notamment de différentes cytokines et chimiokines ou encore différents facteurs impliqués dans l'homéostasie des cellules B et surtout des cellules T, principaux acteurs cellulaires médiant la réponse anti-gluten.

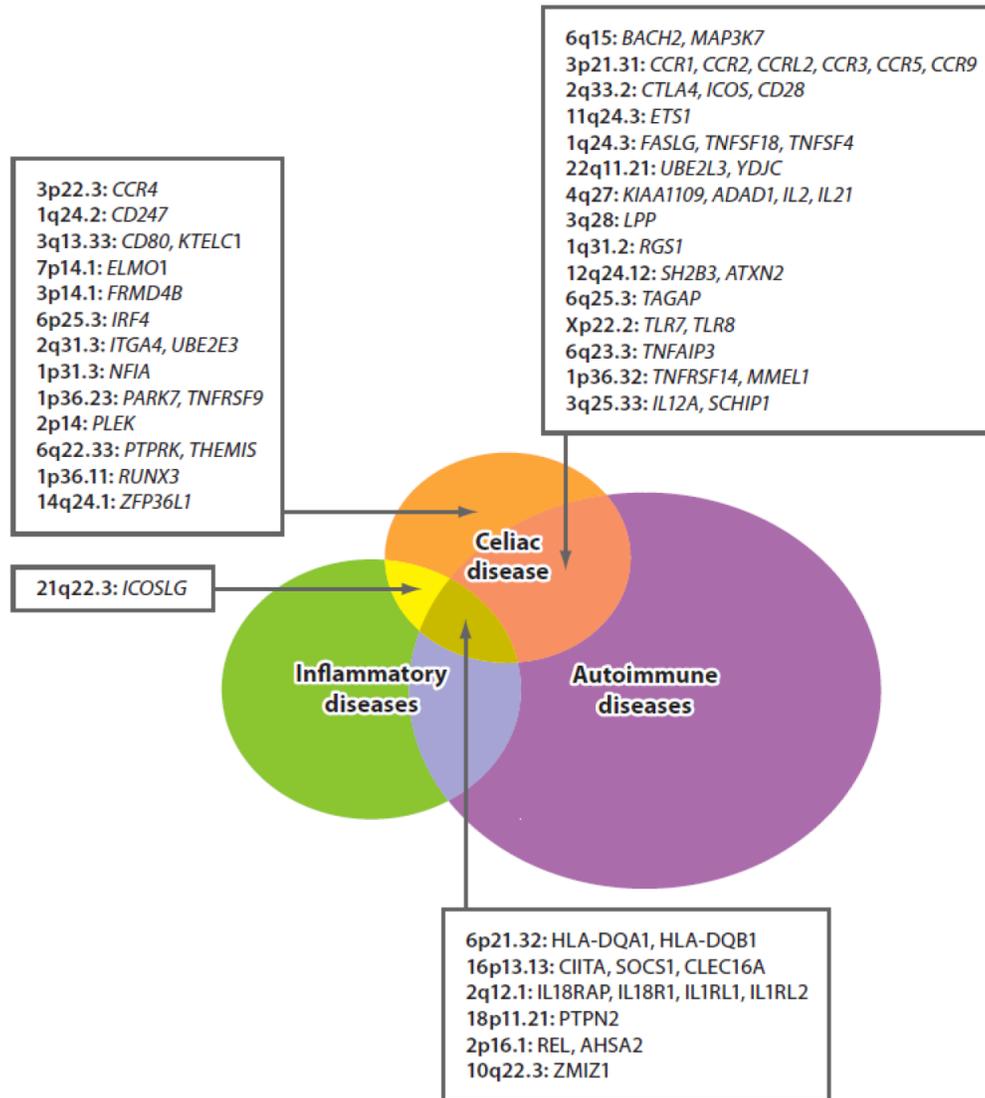
Citons quelques exemples. Notamment *IL12A*, codant pour l'IL-12. Dans un contexte immunologique classique, cette cytokine est produite par les CPA lors de la présentation de l'antigène aux cellules T naïves et favorise une polarisation de ces derniers vers un profil T helper 1 (Th1) avec production d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Ces LTh1 producteurs d'IFN- $\gamma$  sont précisément impliqués dans la maladie (122, 123). Un autre exemple concerne l'IL-2, cytokine clé de la régulation des cellules T, ainsi que l'IL-21, impliquée dans l'homéostasie et l'activation des cellules T, des cellules naturelles tueuses (NK) ou encore des LB et ici aussi identifiées comme facteurs de risque chez le patient cœliaque. De manière très intéressante, mais néanmoins dans un contexte indépendant de la MC, il a été démontré que l'IL-21 peut agir en synergie avec l'IL-15, une autre cytokine pro-inflammatoire surexprimée dans la muqueuse des patients cœliaques. Cette synergie conduit à l'expansion et à l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup>, lesquels sont, rappelons-le, responsables de l'atrophie villositaire dans le cadre de la MC (124, 125). Toujours dans le contexte des cellules T, le gène *CTLA4* codant pour la protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques et impliquée dans la suppression de l'activation des cellules T, ressort également comme candidat sérieux dans plusieurs études GWAS (126-128). Finalement, un autre candidat, hors contexte immun, montre une association particulièrement puissante et code pour la forme 9B de la myosine (*MYO9B*) (129). Cette dernière est suspectée d'influencer la barrière épithéliale intestinale via le contrôle des

jonctions serrées, influençant ainsi la perméabilité cellulaire ce qui *in fine* favoriserait le passage du gluten dans la Lp. Cependant son implication reste pour l'heure ambiguë (130).

Un autre élément qu'il convient de garder à l'esprit avec ce type d'analyse est que les variants génétiques qu'elles permettent d'identifier ne sont pas toujours des acteurs intervenant directement dans la pathologie mais ils influenceraient plutôt l'expression d'autres acteurs qui sont eux directement impliqués dans la pathogenèse. Par exemple, la cytokine pro-inflammatoire IL-15 et l'interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) ne révèlent aucun polymorphisme particulier dans un contexte cœliaque mais elles sont clairement surexprimées dans la muqueuse intestinale des patients. Cette surexpression peut être la conséquence d'un ou de plusieurs variants alléliques particuliers influençant alors d'une manière ou d'une autre l'expression de ces cytokines (120).

Finalement un dernier point intéressant soulevé par ces études génomiques est la similitude que l'on retrouve entre le tableau des variabilités identifiées dans un contexte cœliaque et celui identifié dans le contexte d'autres pathologies auto-immunes, telles le diabète de type I ou la polyarthrite rhumatoïde. Ces pathologies étant liées à des dérégulations du système immunitaire, il n'est pas surprenant qu'elles puissent potentiellement partager un chevauchement de leur paysage génétique et donc des mécanismes biologiques communs (**Figure 11**) (115, 131).

En conclusion, ces recherches dévoilent progressivement une nouvelle facette de la maladie, celle d'une pathologie polygénique dont la complexité pourrait influencer ses différentes formes d'expression. Cependant, cette cartographie génétique complexe n'est pas suffisante pour le développement de la maladie, elle nécessite également l'intervention de facteurs environnementaux et immunologiques.



**Figure 11: chevauchements entre certains facteurs de risques génétiques de la maladie cœliaque, des pathologies auto-immunes et des pathologies inflammatoires de l'intestin.** Ces régions de chevauchement consistent en différents candidats génétiques ressortant simultanément dans les études GWAS réalisées dans ces trois domaines d'investigation (79).

### **1.2.5.2 Facteurs environnementaux**

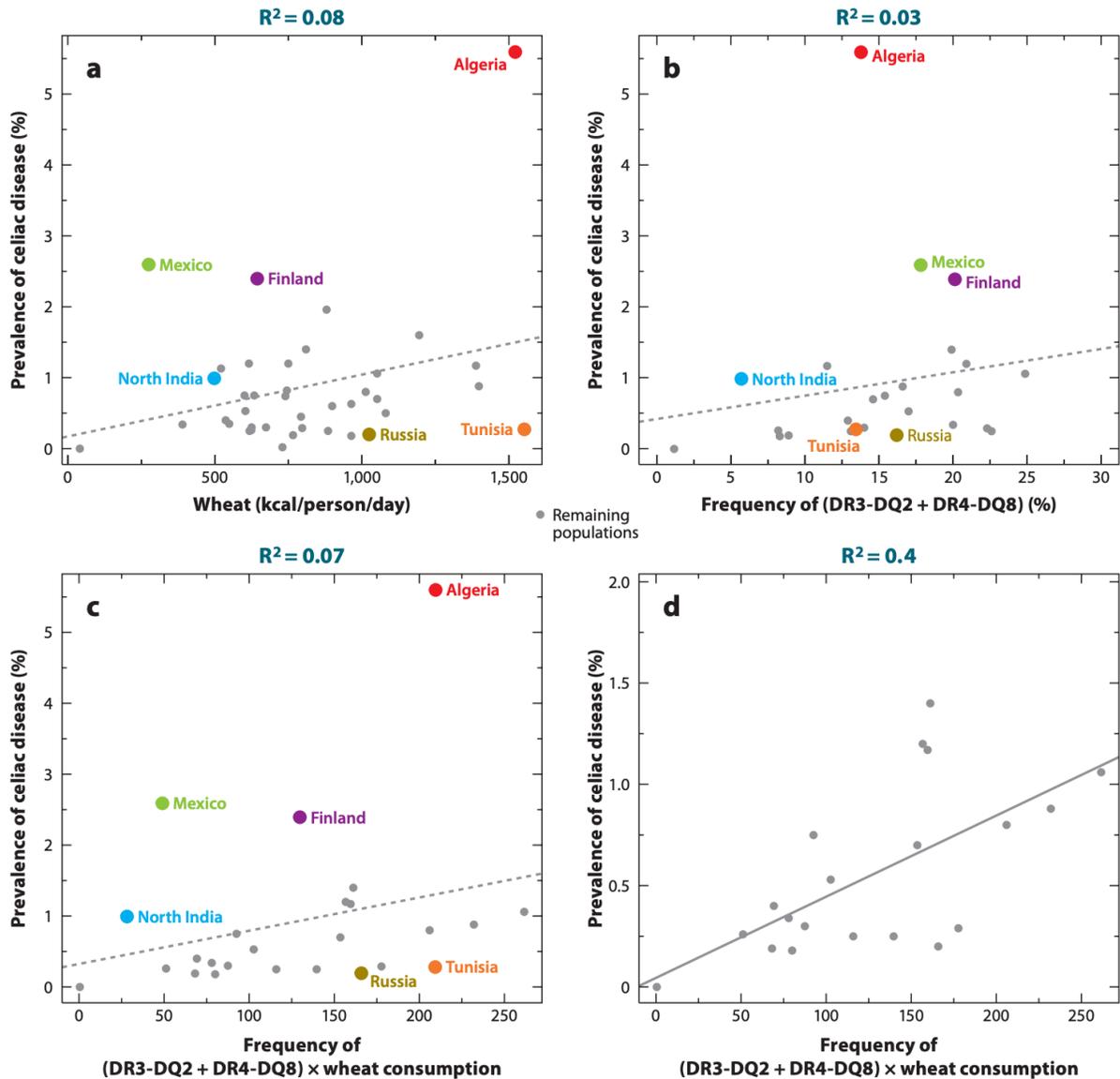
#### **A. Le gluten**

Contrairement à la majorité des maladies auto-immunes, l'antigène environnemental impliqué dans la maladie cœliaque est connu depuis longue date. Comme nous l'avons vu, c'est la consommation de gluten issu des céréales de notre alimentation qui est identifiée comme le facteur étiologique principal impliqué dans la survenue de la maladie chez les individus prédisposés (43, 79).

Plus précisément, et comme définit au point 1.2.2, c'est la fraction composée par les prolamines qui en est la cause. Rappelons-nous que ces dernières sont riches en glutamine et en proline, ce qui leur permet d'une part de résister au catabolisme enzymatique du tractus digestif tout en étant un excellent substrat pour la tTGII présente notamment au niveau de la bordure en brosse et de la Lp intestinale. Certaines de ces prolamines vont ainsi induire directement un stress cellulaire au niveau de l'épithélium (132) là où d'autres vont, après déamination et présentation dans un contexte HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, induire une réponse immunitaire gluten-spécifique (56, 133-135). Nous décrivons en détail cette réponse immunitaire gluten-spécifique ultérieurement, retenons ici qu'elle résulte du transport du gluten au travers de l'épithélium intestinal, de sa déamination par la tTGII et de sa liaison aux molécules du HLA.

Cependant, même si l'expression de l'haplotype HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 et la consommation de gluten constituent jusqu'à ce jour les deux pièces maîtresses dans le puzzle de la MC, elles ne sont pas suffisantes à elles seules. En effet, on ne peut pas constamment prédire l'incidence de la pathologie en associant uniquement la fréquence de ces allèles dans une population par rapport à sa consommation de gluten (79) (**Figure**

**12).** Ceci sous-entend donc l'implication d'autres facteurs génétiques, mais également d'autres facteurs environnementaux. L'exemple le plus couramment cité dans la littérature pour illustrer ce concept est celui de la région de Carélie, s'étalant entre la Finlande et la Russie. Dans cette population, l'ensemble des individus partagent un paysage génétique similaire et sont exposés aux mêmes quantités de gluten dans leur diète. Cependant, la fraction finlandaise présente une incidence de 2% là où la fraction russe présente une incidence 0,2%. Une telle disparité démontre donc que si le gluten et l'haplotype HLA sont ici indispensables, d'autres facteurs environnementaux pourraient promouvoir ou, inversement, prévenir la survenue de la pathologie.



**Figure 12: corrélation entre la prévalence de la maladie cœliaque, la consommation de blé et la fréquence des haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8. (a)** Corrélation entre la prévalence de la MC et la consommation de blé. **(b)** Corrélation entre la prévalence de la MC et la somme des fréquences des haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8. **(c)** Corrélation entre la MC et le produit des fréquences HLA-DQ2+HLA-DQ8 et la quantité de blé consommée. **(d)** Corrélation entre la MC et le produit des fréquences HLA-DQ2+HLA-DQ8 et la quantité de blé consommée après exclusion des populations aberrantes : Algérie, Finlande, Mexique, Inde du nord et Tunisie (79).

## **B. Autres facteurs environnementaux**

D'autres facteurs environnementaux pourraient donc s'ajouter dans la liste déjà complexe des composantes nécessaires au développement de la MC. Tout comme les facteurs génétiques non associés aux HLA, ces facteurs environnementaux non associés au gluten pourraient intervenir eux aussi dans les variabilités observées au niveau du spectre de la symptomatologie, de l'évolution ou encore de la palette d'âges d'apparition de la maladie. Parmi les suspects, nous retrouvons la composition du microbiome, l'âge auquel le gluten est introduit dans l'alimentation ou encore la survenue d'infections intestinales.

### **Le microbiome intestinal**

Tel que discuté au point 1.1.2.2, les influences du microbiome sur la santé de l'Homme est un domaine en pleine effervescence. Notamment, les études de métagénomique ont clairement mis en évidence la triangulation existante au niveau des interactions entre le microbiome, l'alimentation et le système immunitaire de l'hôte. Aujourd'hui, il est évident que ces interactions peuvent être dérégulées et contribuer à l'émergence de phénotypes pathologiques tels les maladies inflammatoires de l'intestin, et en ce qui nous concerne, la MC (136).

Appliquée au tableau cœliaque et sans rentrer dans trop de détails, retenons que la tendance générale de ces investigations est l'identification d'une dysbiose chez le patient. Plus précisément, on constate des différences en termes de composition et de diversité entre les patients cœliaques non traités, traités et les individus sains. Plusieurs études ont pu démontrer un déséquilibre favorisant les genres plus immunogènes comme les *Bacteroides* et défavorisant les genres immunoprotecteurs tels les *Bifidobacterium*

(137-139). Un autre élément mis en lumière par ces études est l'influence directe de la diète sans gluten sur le microbiome du patient, avec une diminution de certains genres bactériens chez les individus cœliaques traités (140).

Bien que ces différences soient clairement identifiées, l'étude du microbiome dans le contexte cœliaque est encore jeune et parfois inconsistante au niveau des résultats obtenus. En effet, certaines études ne parviennent pas à mettre en évidence l'existence de cette dysbiose (141). Les différentes approches méthodologiques, l'échantillonnage (analyses fécales VS analyses de biopsies) ainsi que les différences au niveau des populations étudiées (régions, âges, ...) peuvent constituer un biais majeur expliquant ces variabilités dans l'étude du microbiome (142). Ces différences entretiennent donc la question selon laquelle la dysbiose est une cause ou une conséquence de la MC. La littérature actuelle apporte des éléments de réponse alimentant les deux possibilités et il n'y a nul doute que les études à venir vont très probablement permettre de mieux nuancer la causalité de la conséquence.

### **Les infections virales intestinales**

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études ont mis en lumière un rôle potentiel des infections intestinales dans la survenue de la MC. Les acteurs les plus fréquemment incriminés sont les réovirus, responsables de la gastro-entérite. En 2006, l'étude prospective de Stene et collègues a démontré qu'une fréquence élevée d'épisodes infectieux à rotavirus augmentait sensiblement mais significativement le risque de développer la maladie dans une cohorte de jeunes patients positifs pour le génotype HLA-DQ2 et HLA-DQ8 (143). Deux autres études du groupe de Puccetti, publiées en 2006 et 2013, suggèrent une implication des rotavirus dans la pathogenèse de la MC notamment via un mécanisme de mimétisme moléculaire. Plus précisément, les patients cœliaques

ayant été infectés par ce virus présentent des IgA sériques capables de reconnaître à la fois la protéine virale VP7 mais aussi l'enzyme endogène tTGII que nous savons impliquée dans la pathogenèse de la MC. Ces anticorps ont la capacité de moduler l'expression de différents gènes au niveau des cellules épithéliales intestinales, notamment impliqués dans l'intégrité de la barrière épithéliale. Ceci est corroboré avec une autre de leurs observations démontrant directement une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale *in vitro* lorsque la lignée cellulaire intestinale humaine T84 est cultivée en présence de ces anticorps (144, 145).

Très récemment, le groupe de nos collaborateurs a pu démontrer qu'une infection à réovirus ou norovirus survenant en parallèle de l'exposition à un antigène oral, tel le gluten, conduit à une réponse de type Th1 pro-inflammatoire, participant pleinement à la perte de la TO face à cet antigène. En effet, l'infection virale est ici capable d'induire l'expression du facteur régulateur 1 de l'interféron (IRF1) au niveau des CD. Ces dernières produisent alors de l'IL-12 et de l'IL-27 promouvant à leur tour une réponse Th1 encourageant la rupture de la TO. Ils ont également observé que ces effets dépendaient de la souche virale considérée (95).

En conclusion, retenons ici que malgré des implications épidémiologiques et expérimentales de plus en plus évidentes, le rôle des infections virales intestinales dans la survenue de la MC reste actuellement quelque peu nébuleux suite à l'absence de l'identification d'un mécanisme clair dans le déclenchement de la pathologie.

### **Période d'introduction du gluten et allaitement**

La quantité ainsi que la période d'introduction du gluten dans la diète du nourrisson sont également deux facteurs à considérer dans l'émergence de la pathologie.

En effet, plusieurs études démontrent que l'introduction de gluten en quantité importante avant l'âge de 4 mois augmente le risque de survenue de la pathologie (146, 147). L'exemple le plus spectaculaire couramment cité dans la littérature pour illustrer ce concept est cette étude suédoise d'Ivarson et collègues (146). Ce dernier a démontré que l'épidémie de MC observée à la fin des années 1980 en Suède chez les enfants de moins de 2 ans est probablement due à la modification des recommandations gouvernementales en matière de diversification de la palette alimentaire chez les jeunes enfants. Ces modifications étaient en faveur d'une augmentation des quantités de gluten ce qui s'est accompagné d'une explosion de la fréquence de la maladie passant de 1/1000 à 1/300. Un point intéressant relevé par ce groupe est que les patients cœliaques issus de cette étude ont été allaités deux mois de moins que les sujets sains, sous-entendant donc que l'allaitement maternel présente un effet protecteur, en particulier lorsqu'il est maintenu en parallèle de l'introduction du gluten dans la diète du nourrisson (148).

Cependant, d'autres études cliniques, plus récentes, n'ont trouvé quant à elles aucune association entre l'introduction précoce de gluten, l'allaitement et le risque de développer la pathologie (149-151). Enfin, certains travaux montrent également que l'introduction du gluten après 6 mois d'âge est également associée à une plus haute incidence de la pathologie là où l'introduction de petites quantités entre 4 et 6 mois a plutôt un effet protecteur (152).

Dès lors, malgré une certaine hétérogénéité au niveau des résultats obtenus et donc l'absence de conclusions précises (153), une fenêtre d'âge semble se dégager de ces études en ce qui concerne l'adéquate introduction du gluten dans l'alimentation du nourrisson, laquelle s'étend entre 4 et 6 mois. Toute introduction en dehors de cette fenêtre, en grande quantité et non accompagnée d'un allaitement maternel pourrait donc davantage prédisposer le nourrisson. Finalement, les données concernant un rôle protecteur de

l'allaitement maternel sont également sujet à controverse (154). Retenons que son rôle supposé dans la protection de la survenue de la maladie peut s'expliquer par deux mécanismes. Premièrement, le lait maternel contient de faible quantité de gliadine et de TGF- $\beta$ , lesquels pourraient alors faciliter le développement d'une TO face au gluten. Ensuite, il est reconnu de longue date que le lait maternel contient toute une batterie de facteurs immunoprotecteurs protégeant notamment le nourrisson des infections gastro-intestinales qui, nous l'avons vu, peuvent rendre la muqueuse fertile au développement de la MC. Les recommandations pédiatriques actuelles sont basées sur ces observations et encouragent donc l'introduction du gluten entre 4 et 6 mois tout en maintenant l'allaitement maternel.

## **1.2.6 Signes cliniques, diagnostic et traitements**

### **1.2.6.1 Signes cliniques**

Comme nous l'avons introduit dans la définition de l'iceberg cœliaque au point 1.2.3, la MC fait partie de ces pathologies dont le spectre varie suivant l'âge et la forme considérés. En effet, certains individus vont présenter une symptomatologie gastro-intestinale très sévère, d'autres une forme plutôt modérée, alors que certains resteront complètement asymptomatiques. Aussi, de nombreux individus présentent une symptomatologie atypique extra-intestinale.

La forme classique de la pathologie atteint généralement les jeunes individus à partir de 6 mois d'âge avec une symptomatologie touchant le tractus digestif telle que distension et douleur au niveau de la paroi intestinale, diarrhées chroniques et malabsorption. D'autres symptômes découlent directement de ce syndrome de malabsorption notamment une rupture évidente de l'évolution staturo-pondérale, un

ensemble d'anomalies biologiques dues aux multiples carences et finalement un retard de croissance général (69). La forme silencieuse quant à elle touche plutôt les adultes et est caractérisée par une symptomatologie digestive ténue, même si les altérations de la muqueuse sont belles et bien présentes (155). Finalement on distingue alors les formes atypiques étant caractérisées par des symptômes extra-digestifs. Parmi ces atteintes, on notera la dermatite herpétiforme, l'ostéoporose, des troubles reproductifs, l'ataxie cérébrale et autres troubles neurologiques ou plus grave encore les différents lymphomes épithéliaux qui y sont associés (156, 157). Ce tableau symptomatique, complexe, rend bien évidemment le diagnostic de la maladie difficile.

#### **1.2.6.2 Diagnostic**

Si la pathologie est suspectée sur base de ces symptômes évocateurs, le processus du diagnostic peut être engagé et ce dernier s'organise en trois axes. Le premier, non invasif, est un examen sérologique attestant de la présence des anticorps spécifiques de la pathologie, lesquels disparaissent suite à l'éviction du gluten dans l'alimentation du patient. Le second, invasif, consiste en un examen histologique sur biopsie duodénale chez le patient consommant du gluten et chez qui la séropositivité a été préalablement validée. Le troisième est l'observation d'une rémission complète de la sérologie et des atteintes histologiques lorsque le patient est placé en diète sans gluten (158). La positivité pour ces trois critères assure un diagnostic certain pour le praticien et le patient. La figure 13 décrit l'algorithme classique du diagnostic (69).

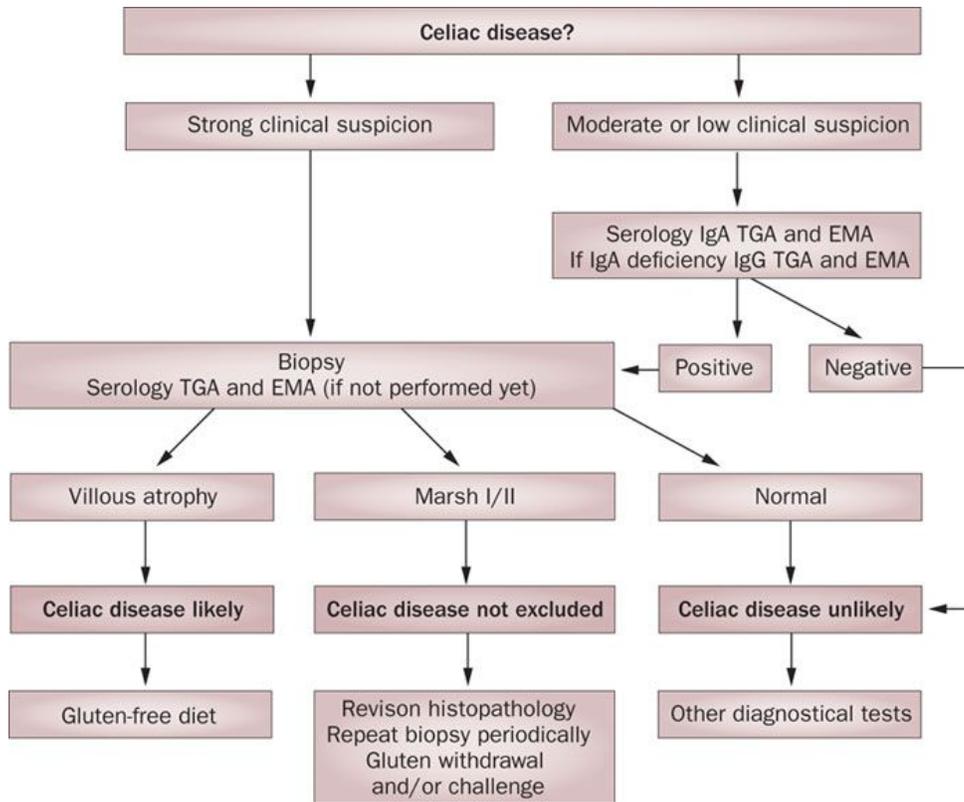


Figure 13: algorithme diagnostique de la maladie cœliaque selon Tack et collègues (69).

### A. La biopsie histologique et la classification de Marsh

Le diagnostic histologique repose sur la collecte de plusieurs biopsies intestinales via réalisation d’une endoscopie digestive haute et permet au pathologiste d’apprécier la présence d’une altération de la muqueuse intestinale dépendante du gluten, l’appréciation se faisant comparativement à un tissu sain. Cette atteinte du tissu intestinal se développe progressivement au court de la maladie et présente différents stades évolutifs, initialement décrits par Michael Marsh en 1992 et connu comme étant la classification de Marsh (49). Celle-ci permet au praticien de classifier la sévérité des dommages observés de manière systématique sur base d’une appréciation de la

lymphocytose intraépithéliale, de l'hyperplasie cryptique et de l'atrophie villositaire. Néanmoins, cette première classification ne permet pas de sous-catégoriser la sévérité de l'atrophie villositaire. C'est donc en 1999 que Oberhuber modifie la classification de Marsh en sous-développant le stade III en stade III a-b-c, ces derniers permettant une appréciation plus subtile de l'atrophie observée (159) (**Table 1 et figure 14**).

- **Marsh 0 : lésions pré-infiltrées**

La muqueuse apparaît normale mais passera rapidement au stade Marsh I en cas d'exposition au gluten.

- **Marsh I : lésions infiltrées**

La muqueuse apparaît normale mais présente un début de lymphocytose intraépithéliale supérieure à 30 lymphocytes comptés pour 100 cellules épithéliales.

- **Marsh II : lésions infiltrées hyperplasiques**

Le stade I est ici accompagné d'une hyperplasie des cryptes. La lymphocytose intraépithéliale évolue et la Lp est épaissie suite à l'infiltration de cellules impliquées dans l'inflammation.

- **Marsh III : lésions destructives**

La lymphocytose et l'hyperplasie cryptique s'accompagnent ici de différents grades d'atrophie villositaire :

IIIa : atrophie partielle

IIIb : atrophie subtotale

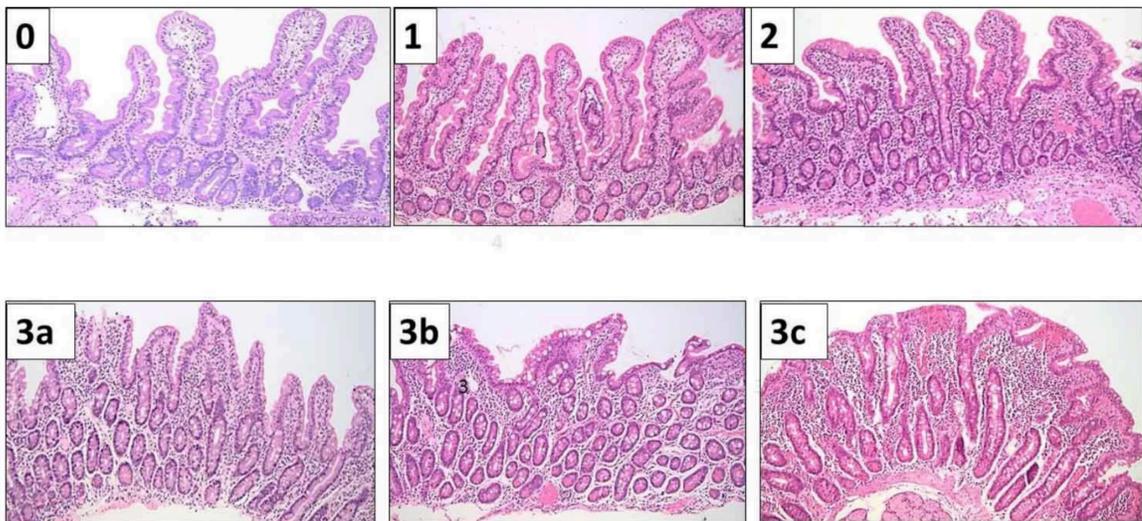
IIIc : atrophie totale

- **Marsh IV : lésions hypoplasiques**

Il s'agit de l'altération ultime de la muqueuse intestinale qui apparait entièrement plate. Elle s'observe principalement chez les patients atteints de la forme réfractaire au régime sans gluten.

Marsh class	Type of lesion	Villous architecture	Crypts	IELs
Marsh I	Infiltrative	Normal	Normal	>30/100 enterocytes
Marsh II	Infiltrative-hyperplastic	Normal	Hyperplasia	>30/100 enterocytes
Marsh III				
3A	Flat destructive	Mild villous atrophy	Hyperplasia	>30/100 enterocytes
3B	Flat destructive	Moderate villous atrophy	Hyperplasia	>30/100 enterocytes
3C	Flat destructive	Total villous atrophy	Hyperplasia	>30/100 enterocytes
Marsh IV	Atrophic-hypoplastic	Total villous atrophy	Hyperplasia	>30/100 enterocytes

**Table 1: classification de Marsh-Oberhuber (378).**



**Figure 14: évolution progressive de l'atrophie villositaire et de l'hyperplasie cryptique dans la maladie cœliaque suivant la classification de Marsh-Oberhuber.** Coloration hématoxyline-éosine. <https://drmarius.com/gp/coeliac-disease>

Il faut savoir que ces altérations histologiques se présentent sous la forme de patch au niveau de l'intestin grêle proximal et c'est la raison pour laquelle le prélèvement de plusieurs échantillons est recommandée, généralement entre 4 et 6 (49). Aussi, l'orientation du tissu doit être parfaite afin d'assurer une excellente coupe transverse, assurant ainsi l'observation des villosités dans leur intégralité. Un échantillon mal orienté peut très facilement conduire à de fausses interprétations.

Finalement, précisons que l'étude anatomopathologique de la biopsie duodénale est un véritable pivot pour le diagnostic, cependant cette histologie reste évocatrice, elle n'est pas spécifique (160). Aussi, l'existence d'une corrélation directe entre la sévérité des symptômes du patient et le degré d'atteinte de la muqueuse intestinale n'est pas claire. Certaines études ne rapportent aucune corrélation (161, 162) là où d'autres groupes parviennent à l'observer (163-165).

## **B. La sérologie cœliaque**

Bien que l'appréciation de cette atrophie villositaire soit un standard d'autorité dans le diagnostic de la maladie, elle reste, comme toute étude histologique, parfois délicate d'interprétation. Dès lors le diagnostic histologique est complété par un diagnostic sérologique via une simple prise de sang. On notera que la prise de sang est généralement réalisée avant même la biopsie, cette dernière étant beaucoup plus invasive par rapport à la sérologie.

La sérologie cœliaque est donc un outil diagnostique puissant puisqu'elle est extrêmement spécifique. En effet, elle se caractérise par la présence d'auto-anticorps de type IgA dirigés contre l'endomysium (EMA) et contre l'enzyme tTGII (tTGA) et d'anticorps dirigés contre la gliadine déamidée par cette même enzyme (DGPA) (166). On notera

également la présence d'anticorps contre la gliadine non déamidée (AGA) mais ces derniers sont beaucoup moins spécifiques puisqu'on les retrouve également dans d'autres contextes inflammatoires de l'intestin. La découverte de ces anticorps spécifiques a littéralement changé la face du diagnostic de la pathologie et a rapidement mené au développement de techniques permettant de les identifier aisément. Grâce à cette approche on peut maintenant tester les individus suspectés de présenter la pathologie mais également tester l'efficacité de l'adhésion à la diète sans gluten (46, 167, 168).

L'identification initiale des auto-anticorps dirigés contre l'endomysium est basée sur une technique de marquage en immunofluorescence réalisée soit sur des coupes d'œsophages de singes soit sur des coupes de cordons ombilicaux humains (169). Ces anticorps se lient au tissu conjonctif entourant les muscles lisses et fournissent un profil tout à fait distinctif en immunohistochimie. Cette technique présente une spécificité et une sensibilité excellente, de respectivement 99% et 90% mais reste coûteuse et uniquement qualitative (160, 170). Aussi, les travaux de Dieterich identifiant la tTGII comme l'auto-antigène ciblé dans l'endomysium a mené aux techniques d'identification directe de cette enzyme (50, 51). Les auto-anticorps dirigés contre la tTGII sont ainsi dosés par simple ELISA assurant une spécificité et une sensibilité elles aussi remarquables, toutes deux d'environ 95%. Le dosage de ces anticorps est plus intéressant que les précédents dans la mesure où la technique ne requiert aucun tissu biologique. Elle apporte également un aspect quantitatif et est plus rapide (50, 51, 171). L'ensemble de ces caractéristiques en font l'outil de diagnostic le plus utilisé jusqu'à ce jour.

Finalement les IgG et les IgA dirigés contre la gliadine peuvent également être dosés par ELISA et employés dans le diagnostic de la pathologie (172). Ces anticorps sont des marqueurs sérologiques intéressants puisque leur détection dépend entièrement de

la présence du gluten dans l'alimentation du patient, permettant donc de monitorer l'adhérence à la diète sans gluten (173). Cependant, et même si l'isotype IgA est plus sensible et spécifique que l'IgG, ils sont également présents dans la sérologie des patients atteints d'autres types de pathologies intestinales, ainsi que chez les individus sains (173). Ce dosage est maintenant remplacé par celui des IgG et des IgA dirigés contre la fraction déamidée du gluten, lesquels présentent une meilleure spécificité et sensibilité (174).

Aussi, et comme évoqué précédemment, une corrélation entre le taux des auto-anticorps IgA dirigés contre la tTGII et le degré d'atteinte de la muqueuse intestinale a pu être mise en évidence (163-165). Un autre élément intéressant à inclure dans cette partie dédiée au diagnostic est que la déficience en IgA est environ 15 fois plus présente dans la population cœliaque que la population générale (175), ce qui peut donc déboucher sur un faux négatif. Il est donc nécessaire de considérer en parallèle le dosage des IgA totales du patient lorsque les tests identifiant l'isotype IgA sont employés. Si cette déficience est observée, la détection de l'isotype IgG est dans ce cas utilisée pour le diagnostic (176).

Plus spécifiquement maintenant, les auto-anticorps ciblant la tTGII sont produits localement au niveau de la muqueuse intestinale du patient et peuvent, en plus de se retrouver dans le torrent circulatoire, être présents sous la forme de dépôts tissulaires (177). Cette observation a été faite pour la première fois au début des années 1970 avec la mise en évidence de dépôts extracellulaires d'IgA au niveau de la muqueuse intestinale des patients sous gluten (178). Ces observations ont été corroborées et affinées depuis lors avec l'observation de ces dépôts au niveau de la membrane basale sous-épithéliale et des vaisseaux sanguins de la muqueuse intestinale (179-181). Aussi, ces dépôts sont observables chez les rares individus présentant une sérologie négative pour la tTGII, démontrant donc que ces auto-anticorps sont, quelques soient les cas, produits par tous les patients cœliaques (179). Il a été également démontré que ces dépôts apparaissent

avant même le développement de la réponse inflammatoire et de l'atrophie villositaire, pouvant ainsi s'inscrire dans les nouvelles méthodes de diagnostic (182-184).

### **C. Le typage HLA**

En plus des standards histologiques et sérologiques, le génotypage du patient pour la présence de l'haplotype HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 peut également s'inclure dans le confort du diagnostic cœliaque, notamment dans le cadre d'une patientèle présentant une symptomatologie incertaine (185, 186). Cependant, souvenons-nous que 40% de la population générale présente ce fond génétique alors que seulement 1% de cette même population est souffrante. La seule détection de ces haplotypes est donc loin d'affirmer à elle seule le diagnostic clinique. Par contre, ce génotypage peut être utilisé comme méthode d'exclusion de la pathologie puisque moins d'1% des individus cœliaques sont négatifs pour ces allèles (187). Ce test est donc plutôt employé pour sa valeur prédictive négative particulièrement élevée. En conclusion, la présence de l'une ou l'autre allèle est suggestive, mais certainement pas pathognomonique.

### **D. Réponse à la diète sans gluten**

Finalement, une fois que le diagnostic est établi sur base des précédents éléments, le patient sera pris en charge afin de le guider dans le suivi d'une diète sans gluten. Ce régime sera discuté au point suivant. Retenons pour l'instant qu'il est la seule arme thérapeutique efficace jusqu'à ce jour et que la réponse positive du patient face à l'instauration de cette diète fait également partie du diagnostic clinique. En effet, son suivi s'accompagne rapidement d'une amélioration de la condition de l'individu. Dans la majorité des cas, on observe une amélioration de la symptomatologie dans les semaines suivant l'instauration de cette diète. Il faut attendre quelques mois pour voir la sérologie

et les altérations de la muqueuse se normaliser (65, 188, 189). Néanmoins, le retour complet d'une architecture épithéliale saine n'est pas toujours garanti et peut prendre plusieurs années, spécialement chez l'adulte (190, 191). On notera que la confirmation du diagnostic suite au suivi de cette diète peut prendre un certain délai, lequel varie selon la sévérité des symptômes initiaux ainsi que selon l'âge du patient (158).

### **1.2.6.3 Traitements**

#### **A. La diète sans gluten**

La MC peut facilement évoluer vers de sérieuses complications si elle n'est pas prise en charge correctement (67, 192, 193). Depuis son instauration dans les années 1950 jusqu'à ce jour, c'est encore et toujours l'éviction complète et à vie du gluten dans le régime alimentaire qui s'offre comme voie thérapeutique pour le patient. Comme nous venons de le voir, le suivi strict de cette diète va permettre un soulagement de la symptomatologie du patient avec correction de l'atrophie villositaire et retour à la normale du statut sérologique. Le suivi de cette diète à long terme permettra également d'éviter les complications néoplasiques. Elle est bien souvent associée à différentes suppléments alimentaires permettant de corriger les carences du patient, notamment en fer, folates, vitamines D et calcium.

Si la théorie d'un tel régime apparaît simple sur papier, cette restriction diététique est en réalité un réel défi pour le patient et la compliance est souvent décevante. En effet, on estime qu'entre 20 à 80% des patients cœliaques sont infidèles à cette solution diététique, particulièrement les adolescents (194-196). Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce constat, comme la contamination des aliments sans gluten lors de leur production, leur coût élevé et leur disponibilité, leur faible appétence et finalement les restrictions

sociales que cette diète implique (30, 196). Aussi, cette approche n'est pas toujours efficace, c'est le cas des patients souffrant d'une forme sévère de MC appelée forme réfractaire et touchant 5% des patients (77). On observe chez ces individus une persistance de l'atrophie villositaire et ce malgré le suivi de la diète sans gluten. Ces patients évoluent dans 30% des cas vers la complication majeure de la maladie, le lymphome à cellules T, dont le taux de survie est de 50% (197). Sur base de ces éléments, on comprend facilement pourquoi il est urgent de développer de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement de cette pathologie.

## **B. Alternatives à la diète sans gluten**

Le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de la MC est un pipeline en plein essor (198-202) mais dont l'évolution reste relativement lente, notamment suite à l'absence de modèles animaliers complets pour cette pathologie, lesquels permettraient de davantage comprendre sa physiopathologie et donc de développer et tester en parallèle de nouvelles approches thérapeutiques. Néanmoins, les investigations cliniques et pré-cliniques dans le domaine proposent tout de même plusieurs candidats thérapeutiques prometteurs. Actuellement, les approches reposent sur deux axes. Le premier consiste à détoxifier le gluten avant sa consommation ou bien directement *in situ* durant le processus de digestion intraluminale. Le deuxième axe quant à lui consiste à réduire la réponse inflammatoire chronique touchant la muqueuse intestinale du patient en ciblant les différents acteurs de la réponse immunitaire anti-gluten. Citons quelques exemples relevant de ces potentielles thérapies.

## **Thérapie orale par compléments enzymatiques**

Comme vu précédemment, l'immunogénicité du gluten réside notamment dans sa capacité à résister aux enzymes du tractus digestif compte tenu de sa richesse en résidus proline et glutamine. Ainsi, l'approche visant à détoxifier le gluten est principalement basée sur l'utilisation de compléments enzymatiques issus de différentes bactéries, lesquelles présentent une activité catabolique de type prolyl-endopeptidases, avantageuse pour la digestion du gluten. Ces compléments ont l'intérêt de résister aux enzymes du tractus digestif tout en fonctionnant à un pH comparable à celui de l'estomac et vont donc permettre la dégradation du gluten en fractions non immunogènes pour l'organisme (203-207).

## **Vaccination peptidique**

En ce qui concerne les thérapies manœuvrant sur la réponse immunitaire, une approche originale et prometteuse consiste à développer un vaccin comportant un ensemble de peptides immunodominants du gluten afin de rééduquer l'immunité mucosale vers une tolérance à ce dernier. On aurait donc ici une véritable approche curative. La phase I de l'étude Nexvax-2 a révélé des résultats très encourageants (208, 209). Néanmoins, la phase II a été récemment stoppée durant l'été 2019 dans la mesure où les résultats obtenus chez les patients traités ne différaient pas du groupe placebo. Quel que soit l'avenir de cette voie thérapeutique, on soulignera ici que les épitopes reconnus entre les patients HLA-DQ8 et HLA-DQ2 sont différents, ce qui impliquera donc le développement de deux vaccins spécifiques de l'haplotype exprimé l'individu.

## **Inhibiteurs de la tTGII**

Il est maintenant évident que la tTGII joue un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie puisqu'elle augmente considérablement l'affinité du gluten pour les molécules HLA-DQ8 et HLA-DQ2 via sa déamidation. L'idée d'inhiber cette enzyme dans le contexte de la maladie est donc une approche logique très séduisante (210-212) et deux inhibiteurs ont démontré des résultats très encourageant *in vitro* (213). L'étude menée au laboratoire et décrite au chapitre trois a notamment utilisé deux inhibiteurs de la tTGII en collaboration avec l'équipe du Dr. Koshla et leur utilisation à des fins thérapeutiques a pour la première fois fourni des résultats très prometteurs *in vivo*.

## **Antagonistes de l'interleukine-15**

D'autres résultats, eux aussi très encourageants, ont été obtenus via l'utilisation d'antagonistes de l'IL-15 chez les patients souffrant de sprue réfractaire (214-216). En effet, et comme nous le verrons en détail au point 1.2.2.3.C, cette interleukine est une cible potentielle de choix. Elle est surexprimée dans la muqueuse intestinale du patient et joue un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la maladie, notamment au niveau de la perte de la TO au gluten, au niveau de la réponse cytotoxique des lymphocytes intraépithéliaux et finalement au niveau du stress cellulaire épithélial.

Notamment, l'AMG-714, un anticorps monoclonal dirigé contre cette interleukine, a été récemment testé dans un essai clinique de phase IIa (217). Cette étude en double aveugle compare deux doses (150mg et 300mg) de l'antagoniste et un placebo. Le traitement est administré 1 fois toutes les deux semaines durant 12 semaines chez des sujets cœliaques consommant en parallèle 2,5g de gluten par jour. Bien que l'AMG-714 ne permette pas la prévention des altérations de la muqueuse aux doses employées, on

observe néanmoins une diminution de l'inflammation de cette muqueuse dans les deux groupes recevant le traitement. Aussi, les patients traités rapportent une diminution des symptômes associés à la pathologie. Bien que ces résultats soient très encourageants, ils positionnent ce type de thérapie comme un adjuvant au régime sans gluten et non pas comme une alternative thérapeutique complète, l'idée étant plutôt de protéger le patient en cas d'une exposition accidentelle au gluten.

On conclura donc cette partie dédiée aux traitements alternatifs en insistant qu'actuellement, la diète sans gluten reste l'ultime thérapie efficace dans la protection du patient cœliaque. Bien qu'encourageantes, ces thérapies alternatives sont encore immatures et n'ont actuellement pas la prétention de remplacer cette habitude diététique. Néanmoins, elles pourront très certainement s'appliquer en parallèle de ce régime, allouant ainsi au patient une marge de manœuvre plus importante en ce qui concerne ses restrictions alimentaires.

Cette vue d'ensemble de la maladie est maintenant terminée. Les rappels concernant la physiologie intestinale ainsi que la connaissance de l'ensemble des acteurs intervenant dans la MC va maintenant nous permettre d'envisager les détails mécanistiques de sa physiopathologie.

### **1.3 Immunopathogenèse de la maladie cœliaque**

#### **1.3.1 Le passage du gluten dans la lamina propria**

Il est clair que les interactions entre les peptides de gluten et le paysage génétique du patient débouchent sur une puissante réponse immunitaire caractéristique de la MC. La question est maintenant de comprendre comment ces peptides immunogéniques

traversent la barrière épithéliale, hautement imperméable, et quels sont les facteurs pouvant encourager ce passage conduisant à la perte de la TO au gluten une fois ce dernier dans la Lp. Il semble en effet que la perméabilité intestinale soit altérée chez le patient cœliaque ce qui potentialiserait une réponse anormale face au gluten (218-220).

Les entérocytes jouent évidemment un rôle central dans l'absorption des molécules issues du bol alimentaire et ces procédés reposent sur ce que l'on appelle la perméabilité intestinale. On distingue le passage para-cellulaire et le passage trans-cellulaire. L'absorption du gluten n'échappe pas à la règle de ces deux mécanismes, il rejoint la Lp soit via un passage para-cellulaire entre les jonctions épithéliales, soit via transcytose au travers des entérocytes depuis leur pôle apical vers leur pôle basal. L'étude de la perméabilité intestinale dans le cadre de la MC constitue un pan complet de la recherche dans ce domaine (221). Nous aborderons donc ici les bases et les mécanismes élémentaires aidant à la compréhension des points ultérieurs.

### **1.3.1.1 Passage para-cellulaire**

Comme nous l'avons vu au point 1.1.3, l'épithélium intestinal régule le passage des molécules entre la lumière intestinale et la sous-muqueuse, assurant ainsi une TO ou une réponse immunitaire selon l'antigène considéré. Ces cellules épithéliales sont étroitement connectées les unes aux autres par un ensemble de protéines de jonction : les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. Ces protéines garantissent l'intégrité de l'épithélium intestinal et régulent le passage para-cellulaire des antigènes alimentaires jusqu'au niveau de la Lp (222). Tout défaut dans le fonctionnement de ces protéines implique donc une augmentation de la perméabilité de l'épithélium, ce qui est précisément soupçonné chez le patient cœliaque.

Dans un premier temps, il a été montré que les peptides immunogéniques de gluten peuvent diffuser simplement au travers des jonctions de l'épithélium intestinal (219, 220, 223). Ensuite, plusieurs études ont pu démontrer l'existence d'altérations au niveau de ces jonctions épithéliales directement médiées par les peptides de gluten. Par exemple, l'expression de la zonula occludens-1, une jonction serrée, est clairement diminuée chez le patient cœliaque et cette expression revient à un taux normal lorsque le patient est placé sous diète sans gluten (224, 225). Dans la même optique, on observe également une diminution de l'expression des jonctions adhérentes E-cadhérines (226). Finalement, la culture de tissus intestinaux en présence de différents peptides de gluten a démontré une augmentation de la perméabilité de ces tissus chez la souris (227). L'ensemble de ces résultats laisse donc penser que les peptides de gluten sont capables d'une part de moduler l'intégrité épithéliale en interférant avec différentes protéines de jonction, altérant ainsi la résistance de la barrière intestinale, ce qui d'autre part, favorise le passage de ces peptides dans la Lp. *In fine*, il y a une augmentation de la réponse immunitaire face à ce dernier.

Cependant, même si ces résultats constituent une piste intéressante, ils ne sont pas suffisants. Nous avons vu que 40% de la population générale exprime le HLA-DQ2 ou le HLA-DQ8, consomment du gluten, et ne présentent pourtant aucune intolérance au gluten. Ce constat est appuyé par des études montrant que des souris humanisées pour le HLA-DQ8 et consommant du gluten ne développent pas la MC (228). Les altérations de la barrière épithéliale médiées par le gluten ne sont donc probablement pas suffisantes pour induire la perte de la TO et d'autres facteurs environnementaux doivent probablement intervenir dans ces lésions.

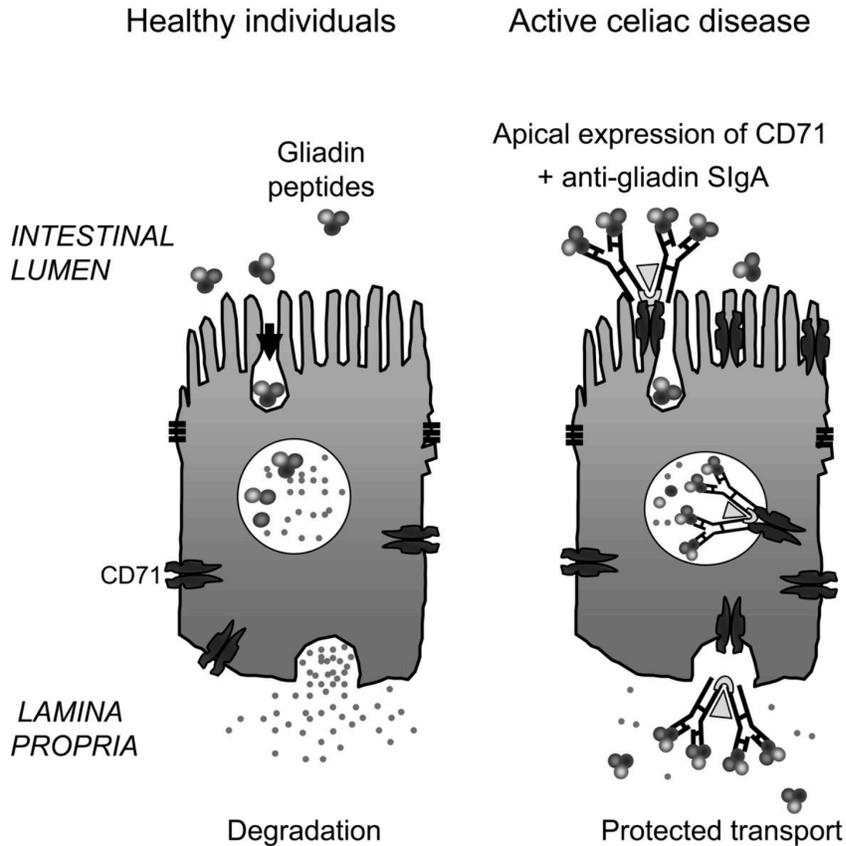
### **1.3.1.2 Passage trans-cellulaire**

Parallèlement à la voie paracellulaire, les antigènes alimentaires, gluten inclus, peuvent rejoindre la sous-muqueuse par transcytose épithéliale. Ce mécanisme repose sur l'internalisation des macromolécules soit par endocytose non spécifique soit par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques. Ce transit depuis le pôle apical vers le pôle basal des entérocytes s'accompagne d'une digestion des peptides ainsi internalisés mais permet un passage quasi intact des peptides de gluten vu leur résistance à la digestion. Aussi, certains travaux ont pu démontrer que ce mécanisme est exacerbé en présence de cytokines pro-inflammatoires surexprimées dans la muqueuse du patient cœliaque, comme par exemple l'IFN- $\gamma$ . Notamment, cette cytokine semble influencer différents mécanismes impliquant la plasticité du cytosquelette (229, 230).

Un autre mécanisme impliqué dans le passage transcellulaire de la gliadine est particulièrement intéressant dans le contexte cœliaque. Il s'agit de la transcytose des peptides de gluten médiée par la forme sécrétée des IgA anti-gliadine (231). Initialement, il faut savoir que la muqueuse intestinale comporte une quantité importante de PCs sécréteurs d'IgA et d'IgM de spécificités multiples et directement impliqués dans la protection de la muqueuse et la neutralisation des antigènes présents dans la lumière intestinale. Les IgA dimériques et les IgM pentamériques produits par ces PCs sont captées par le récepteur des immunoglobulines polymériques à la surface basale des entérocytes puis véhiculées jusqu'au pôle apical par rétro-transcytose, où elles seront alors sécrétées dans la lumière. Dans un contexte cœliaque, les IgA sont notamment produites par les PCs spécifiques du gluten ayant massivement infiltré la Lp du patient. Une fois sécrétés dans la lumière intestinale, leur spécificité assure un couplage aux peptides de gliadine. L'aspect séduisant de ce mécanisme est que le complexe SIgA-gliadine présent dans la lumière intestinale présente une certaine affinité pour le

récepteur de la transferrine (CD71) exprimé à la surface apicale des entérocytes. Ce récepteur intervient initialement dans le recyclage de la transferrine, impliquée dans le métabolisme du fer par les érythrocytes mais il a été démontré qu'il possède une certaine affinité pour les IgA (232). La fixation du complexe SIgA-gliadine au CD71 assure alors le passage transcellulaire de ce complexe, protégeant la gliadine de la digestion lysosomale et assurant son passage dans la Lp (231) (**Figure 15**). On notera qu'il y a surexpression du CD71 par l'épithélium des patients cœliaques et ceci semble être dû à la carence en fer encourue par ces patients.

Ensemble, ces mécanismes démontrent que différents facteurs environnementaux et immunologiques peuvent altérer la fonction de la barrière épithéliale du patient cœliaque et augmenter la pénétrance du gluten dans la Lp, conduisant *in fine* à la réponse immunitaire spécifique de la maladie. Cette réponse présente aussi bien un visage inné qu'adaptatif.



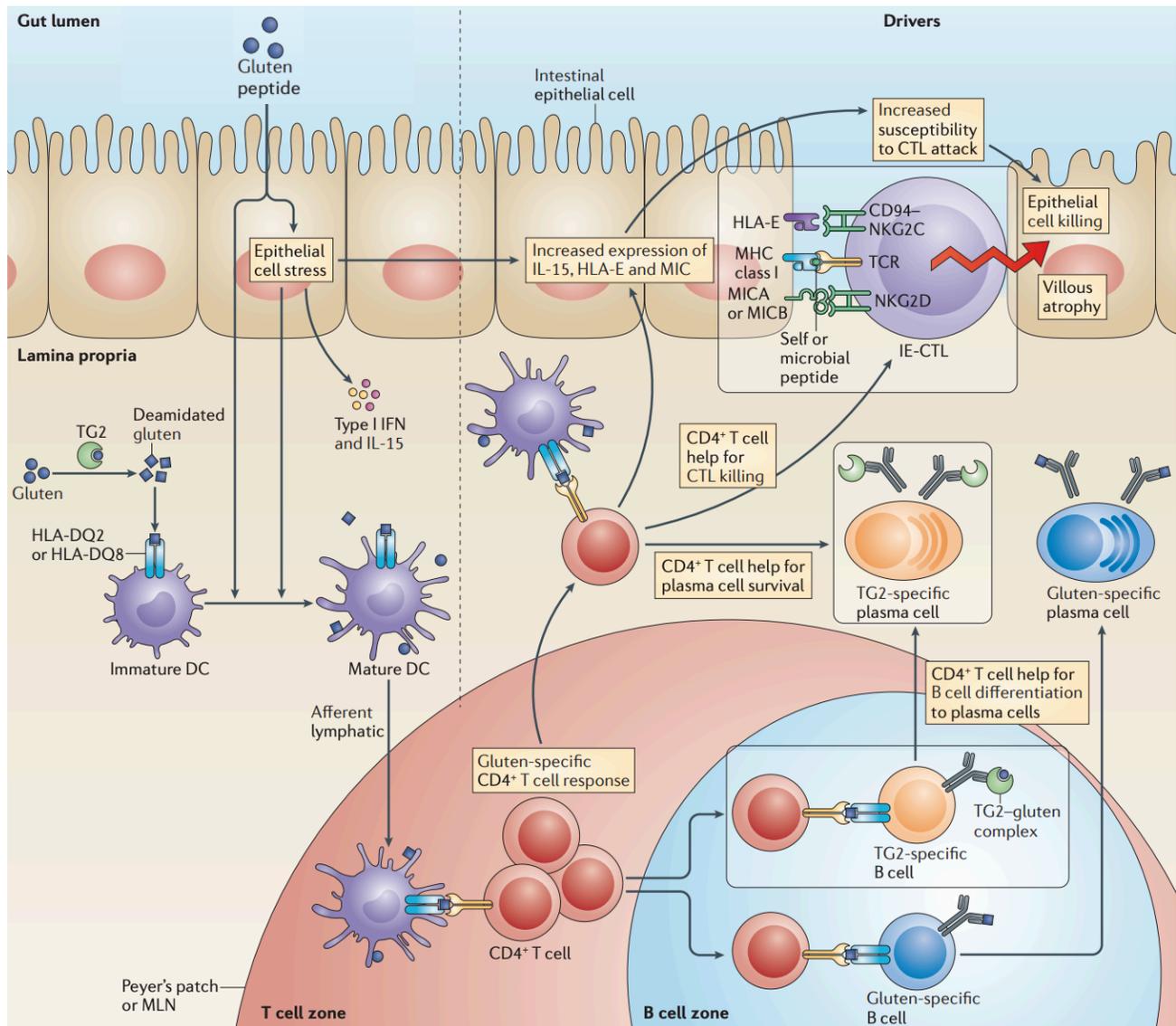
**Figure 15: transport des complexes IgA-gliadine médié par le récepteur à la transferrine, le CD71.** Les patients cœliaques présentent une expression élevée du récepteur à la transferrine au niveau du pôle apical des entérocytes. Ce récepteur est capable de fixer les complexes SIgA-gliadine et assure leur rétro-transcytose depuis la lumière intestinale jusqu'à la Lp, tout en les protégeant de la dégradation des protéases lysosomales des entérocytes. Adapté de (231).

### 1.3.2 Immunopathogénèse de la maladie cœliaque

#### 1.3.2.1 Vue d'ensemble

Dans des conditions physiologiques normales, les peptides de gluten absorbés au travers de la barrière intestinale n'induisent aucune réponse délétère. L'homéostasie et

la TO vue au point 1.1.3 sont maintenues, notamment grâce à l'activité des cellules T régulatrices sécrétrices de facteurs immunosuppresseurs tels le TGF- $\beta$  ou encore l'IL-10 (233). Les conditions pro-inflammatoires de la muqueuse du patient cœliaque orientent plutôt une réponse immunitaire aberrante faisant intervenir des composantes innées et adaptatives dont l'interdépendance conduit *in fine* au développement de l'atrophie villositaire (**Figure 16**). Ce processus est engagé lors du passage du gluten dans la Lp du patient. Ce dernier sera déamidé par la tTGII, permettant alors aux CD de le présenter aux cellules T spécifiques dans un contexte HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 dépendant. Pour des raisons qui seront détaillées au point suivant, cette présentation du gluten déamidé conduit à la polarisation des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten non pas en LTreg mais bien en LTh1 pro-inflammatoires (122, 234, 235). Ces LTh1 migrent alors traditionnellement dans la Lp où leurs cytokines agissent à différents niveaux, notamment en recrutant davantage de cellules pro-inflammatoires, en augmentant le stress cellulaire des entérocytes et en stimulant la cytotoxicité des LIEs envers ces derniers. Ceci mène précisément à la destruction épithéliale. Parallèlement, l'activation des CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten évolue également vers un profil Th2, fournissant ici l'aide nécessaire aux LB évoluant en PCs sécréteurs d'anticorps contre le gluten et d'auto-anticorps contre la tTGII (**Figure 16**). Nous allons ici décomposer ces mécanismes qui, ensembles, constituent la cascade immunologique responsable de la destruction de la muqueuse intestinale du patient. Nous accorderons une importance particulière à deux acteurs absolument essentiels : l'IL-15 et la transglutaminase II tissulaire.



**Figure 16: pathogenèse de la maladie cœliaque.** Le gluten ingéré traverse aisément la muqueuse intestinale du patient dont la perméabilité est altérée suite à différents facteurs tels les infections virales. Le gluten absorbé est alors déamidé par la tTGII présente dans la Lp puis processé par les cellules dendritiques. Ces dernières présentent ici un profil pro-inflammatoire suite à la surexpression de l'IL-15 dans la muqueuse du patient. Elles migrent classiquement dans les ganglions mésentériques et les plaques de Peyer avoisinantes et assurent l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Ces dernières fournissent l'aide nécessaire au développement de la réponse humorale caractéristique de la maladie et génèrent également différents types de signaux pro-inflammatoires aidant à l'activation des LIEs, lesquels détruisent l'épithélium sur base de la reconnaissance de signaux de stress. Adapté de (236).

### **1.3.2.2 La réponse immunitaire adaptative**

#### **A. Les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten**

##### **Activation des cellules T CD4<sup>+</sup>**

Une des caractéristiques majeures de la réponse adaptative au gluten dans un contexte de MC est la présence dans la muqueuse intestinale de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de la gliadine restreintes HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 et sécrétant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-21. Ces cellules sont tout à fait uniques aux patients cœliaques puisqu'absentes de biopsies d'individus sains (237-239). Cette réponse adaptative repose sur deux éléments primordiaux. Premièrement, c'est la modification post-traductionnelle subie par la gliadine via la tTGII qui permet d'expliquer pourquoi les molécules HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 des CPA sont si efficaces dans leur capacité à présenter les peptides de gliadines aux cellules T CD4<sup>+</sup> (103). Deuxièmement, ces mêmes CPA présentent un profil beaucoup moins tolérogène que dans des conditions physiologiques saines et cette transition phénotypique est notamment due à leur exposition chronique face à l'IL-15, massivement exprimées dans la muqueuse du patient (132, 240-242). Ce profil pro-inflammatoire explique pourquoi ces CD favorisent la polarisation des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten en LTh1 et non pas en LTreg (**Figure 16**). Finalement, il convient de noter que la réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten est principalement polyclonale étant donné l'existence des multiples épitopes immunogéniques du gluten. Cependant, certains d'entre eux sont immunodominants et démontrent une affinité importante pour des TCR bien particuliers, ce qui peut orienter la réponse vers un profil monoclonal (105).

Une fois activés, ces LTh1 vont jouer un rôle pivot dans l'intensité de la réponse immunitaire intestinale de la maladie. Il a d'ailleurs été démontré que le facteur de

transcription T-bet, impliqué dans la différenciation de ce phénotype, est augmenté chez le patient cœliaque (243). Ces derniers vont initier la cascade immunologique conduisant au développement de l'atrophie villositaire, notamment par sécrétion massive d'IFN- $\gamma$  et d'IL-21 (122, 244-246). Ils seraient également à l'origine de l'activation des cellules B spécifiques du gluten et de la tTGII discutée au prochain point.

### **Sécrétion de cytokines pro-inflammatoires**

L'IFN- $\gamma$  sécrété par ces cellules LTh1 joue un rôle fondamental dans la pathogenèse de la MC puisqu'il intervient à de nombreux niveaux et probablement via différents relais d'actions. Premièrement, rappelons que l'IFN- $\gamma$  est impliqué dans les altérations de l'intégrité des cellules épithéliales, augmentant ainsi la perméabilité de la barrière intestinale (230). Ensuite, cette cytokine augmente l'expression de molécules de stress cellulaire par les entérocytes ainsi que l'expression de récepteurs NK activateurs par les lymphocytes intraépithéliaux, un mécanisme clé dans la survenue de l'atrophie villositaire et sur lequel nous reviendrons rapidement (247, 248). Toujours dans le cadre de l'atrophie villositaire, l'IFN- $\gamma$  stimule les fibroblastes dans leur production de métalloprotéinases matricielles et ces endopeptidases sont impliquées dans le remodelage tissulaire par dégradation de la trame épithéliale (249). Parallèlement, et certainement à cause de cette altération du tissu intestinal, l'IFN- $\gamma$  est capable d'augmenter l'expression de la tTGII dans la muqueuse des patients cœliaques ce qui génère un feedback positif puisque davantage de gluten sera déamidé et présenté à ces cellules CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten et productrices d'IFN- $\gamma$  (250). Enfin, l'IFN- $\gamma$  augmente également l'expression des molécules du HLA-DQ par les CPA ce qui entretient, voir augmente la présentation du gluten déamidé aux cellules T CD4<sup>+</sup> (251). Sur base de ces résultats incriminant l'IFN- $\gamma$  dans l'altération de ces fonctions immunitaires, on peut comprendre aisément pourquoi les expérimentations basées sur une neutralisation de

cette cytokine permette de prévenir les dommages tissulaires apparaissant sur un fond de consommation de gluten (252).

Cette réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten est nécessaire au développement de la maladie mais elle n'est pas suffisante à elle seule. Différentes études sur modèles murins humanisés exprimant le HLA-DQ8 ou le HLA-DQ2 démontrent que lorsque ces modèles consomment du gluten, il y a en effet une production de cytokines pro-inflammatoires similaire à celle observée chez les patients telles que l'IFN- $\gamma$  et l'IL-21 mais cependant, il y a maintien d'une réponse régulatrice et l'atrophie villositaire ne peut être observée (253, 254). D'autres facteurs sont nécessaires en parallèle de cette réponse adaptative et sont probablement issus de la réponse immunitaire innée.

A titre d'exemple, on citera l'IFN- $\alpha$ , une autre cytokine que l'on retrouve également en grande quantité dans la muqueuse du patient cœliaque et principalement produite par les macrophages. Un exemple éloquent couramment employé dans la littérature et illustrant toute la puissance de cette cytokine dans le cadre cœliaque est celui des patients souffrant d'hépatite C et nécessitant un traitement à l'IFN- $\alpha$ . Certains d'entre eux vont développer la maladie, laquelle disparaît lorsque l'arrêt du traitement est combiné au suivi d'une diète sans gluten (255-257). Notamment, l'IFN- $\alpha$  va promouvoir un profil pro-inflammatoire au niveau des CPA mais aussi stimuler la production d'IFN $\gamma$  par ces CPA et par les CD4<sup>+</sup> (95, 258).

## B. Les lymphocytes intraépithéliaux

### Populations de lymphocytes intraépithéliaux

La forme potentielle de la pathologie cœliaque décrite au point 1.2.3 est le meilleur exemple cité dans la littérature pour illustrer le concept suivant lequel la réponse immunitaire adaptative traduisant la perte de la TO au gluten est spécifique mais non suffisante pour l'induction d'une atrophie villositaire. Aussi, le modèle murin développé par l'équipe du Dr. Jabri en 2011 appuie en ce sens. Brièvement, ce dernier est caractérisé par l'expression de l'HLA-DQ8 à la surface de ses APC et par la surexpression de l'IL-15 au niveau de la LP et des GM. Lorsque cette souris consomme du gluten, elle va développer une rupture de la TO au gluten mais sans atrophie villositaire (242). Dès lors, en parallèle à cette perte de la TO, le gluten est également incriminé dans d'autres mécanismes adaptatifs conduisant à l'altération de l'épithélium et dont les principaux acteurs cellulaires sont les LIEs.

Ces derniers sont des lymphocytes résidants et jouent un rôle de sentinelles patrouillant entre les cellules épithéliales et assurant une surveillance permanente ainsi qu'une protection de l'hôte contre les pathogènes envahissants présents dans la lumière intestinale. Cette population est hétérogène et son ontogénie complexe, elle diffère notamment selon la région intestinale considérée ainsi qu'en fonction de l'espèce considérée (259). Retenons simplement ici qu'il existe un type A et un type B. Le type A, dit conventionnel, couvre les populations  $CD8\alpha\beta^+ TCR\alpha\beta^+$  et  $CD4^+ TCR\alpha\beta^+$  que l'on retrouve à la fois chez l'Homme et chez la souris. Le type B, dit non conventionnel, couvre une population  $CD8\alpha\beta^{+/-} TCR\gamma\delta^+$  chez l'Homme contre une population  $CD8\alpha\alpha^+ TCR\alpha\beta^+$  et  $CD8\alpha\alpha^+ TCR\gamma\delta^+$  chez la souris. Chez l'Homme, le phénotype  $TCR\alpha\beta^+$  prédomine tandis que chez la souris, on retrouve une fréquence sensiblement identique de  $TCR\alpha\beta^+$  et  $TCR\gamma\delta^+$ .

Dans les deux espèces, les  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+$  sont mineurs par rapport aux  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\beta^+$ . Ces lymphocytes  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\beta^+$  sont notamment activés suite à l'engagement de leur TCR avec l'antigène présenté dans un contexte de CMH de classe I et suite à l'engagement de leurs récepteurs de type NK avec leurs ligands, à savoir des molécules de stress exprimées en surface des cellules cibles (259), que sont les entérocytes dans le cadre de la MC.

Une lymphocytose intraépithéliale, décrite pour la première fois en 1971, constitue une des signatures de la MC (260). Cette dernière est largement supérieure chez les individus atteints de la MC par rapport aux individus sains (261). Bien qu'elle ne soit pas complètement spécifique de la maladie, l'infiltration et la migration des LIEs vers la surface apicale des villosités reste une excellente indication de la pathologie. Sur le plan cellulaire, l'infiltrat est principalement constitué des populations  $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD8}\alpha\beta^+$  et  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  (262). L'expansion et l'activation aberrante des LIEs sont directement corrélées à la présence de gluten et l'éviction de ce dernier s'accompagne dans la plupart des cas d'une diminution de son intensité.

Un élément intéressant est la proportion et le rôle supposé de ces deux populations de lymphocytes dans cette infiltration de l'épithélium. En ce qui concerne la population  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ , il a été démontré qu'elle constitue la fraction prédominante de l'infiltrat total et de manière surprenante, elle persiste malgré le suivi d'une diète sans gluten et la résolution des dommages épithéliaux. Ceci suggère que ces lymphocytes ne dépendent pas de l'exposition au gluten et qu'ils n'interviennent pas directement dans la destruction épithéliale. Ils pourraient réguler négativement l'activité des  $\text{TCR}\alpha\beta^+$ , jouant ainsi un rôle protecteur dans la survenue des lésions (263-266). Actuellement, on suppose que cette population est générée suite à l'expansion des clones déjà résidants dans l'épithélium soit suite à l'infiltration de nouveaux lymphocytes activés et recrutés depuis la périphérie

(265, 267). Cependant leur rôle reste incertain dans la pathologie. L'histoire est différente pour la population  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  et plusieurs éléments les incriminent directement dans la survenue de l'atrophie villositaire. Bien que leur proportion soit inférieure à celle des  $\text{TCR}\gamma\delta^+$ , la fréquence de cette population est directement corrélée à la sévérité des lésions intestinales et à la consommation de gluten ce qui fait de ces derniers les principaux acteurs responsables de l'atrophie villositaire (263).

### **Activation des lymphocytes intraépithéliaux**

Actuellement, l'activité cytotoxique des cellules T  $\text{CD8}^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$  de l'épithélium intestinal peut s'expliquer soit par une activation directe du TCR par le complexe gluten-CMH I, soit par une activation des récepteurs NK (105). La seconde explication est la plus couramment acceptée, mais il convient de ne pas ignorer la première.

Ainsi, l'activation des cellules T  $\text{CD8}^+$  par présentation du gluten au TCR est suspectée dans la mesure où les lésions intestinales et l'activation des cellules T diminuent simultanément lorsque le gluten est éliminé de la diète du patient. Les résultats de Mazarella et collègues ont ainsi démontré que la culture de cellules T  $\text{CD8}^+$  issues de la muqueuse de patients cœliaques avec des cellules épithéliales intestinales préalablement stimulées au gluten aboutit à la production de granzyme-B et d'IFN- $\gamma$  par ces cellules T  $\text{CD8}^+$ . Cette étude démontre également que dans un tel contexte, les cellules T  $\text{CD8}^+$  induisent l'apoptose des cellules épithéliales (268). Cependant, les lymphocytes T  $\text{CD8}^+$  spécifiques du gluten identifiés dans cette étude proviennent de la Lp et non pas de l'épithélium. Quelques années plus tard, les travaux de Han et collègues ont mis en évidence que l'activation des cellules T  $\text{CD8}^+ \text{TCR}\alpha\beta^+$  et  $\text{TCR}\gamma\delta^+$  était simultanée et non consécutive à celle des cellules T  $\text{CD4}^+$  chez des patients suivant une diète sans gluten et soumis à une épreuve au gluten (269). Ces  $\text{CD8}^+$  sont caractérisés par un répertoire du

TCR assez restreint sous-entendant donc que ces cellules sont spécifiques du gluten et donc directement réactivées en présence de ce dernier. Ils pourraient également recevoir une aide des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Un autre argument en faveur de leur spécificité est apporté par la maladie de Crohn, elle aussi associée à une inflammation médiée par les cellules Th1 de la Lp mais ne développant aucune lymphocytose intraépithéliale (270). Ces résultats sont discutables dans la mesure où d'autres études apportent des résultats en faveur de l'absence de toute spécificité de ces LIEs pour le gluten (108, 237). L'utilisation de différents peptides immunogéniques induit la lymphocytose mais aucun clone spécifique de ces peptides ne peut être détecté à partir de cette population envahissante. Leur activation est ici considérée comme l'une des résultantes de l'activation des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Davantage d'investigations sont donc nécessaires dans ce domaine sujet à la controverse et où très peu de données sont disponibles en faveur de l'existence de ces cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Actuellement, le paradigme de leur activation est plutôt associé à l'expression de récepteurs de l'immunité innée, notamment grâce à l'omniprésence de l'IL-15 dans la muqueuse du patient (271).

En effet, le postulat le plus couramment accepté est l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> dans un contexte indépendant du TCR et faisant intervenir une reprogrammation de l'expression de leurs récepteurs NK (NKr) ainsi que des ligands (247, 272, 273) de ces récepteurs. Premièrement, chez les patients cœliaques, ces LIEs présentent une augmentation de l'expression des récepteurs NK activateurs tels que le NKG2D et le NKG2C/CD94. Les ligands du NKG2D sont les protéines de stress cellulaire de classe Ib, MICA et MICB (MHC class I-related chain A and B) tandis que le ligand du NKG2C/CD94 est la molécule non classique du CMH de classe I, le HLA-E. Ces ligands sont exprimés à la surface de cellules en état de stress cellulaire (274). Deuxièmement, ces LIEs présentent à l'inverse, une diminution de l'expression du récepteur NK inhibiteur NKG2A/CD94 (247,

271, 272, 275). Troisièmement, ces LIEs, lorsque comparés à ceux d'individus sains, expriment une plus grande quantité de protéines cytotoxiques telles le granzyme B et la perforine (275). En conséquence, ce profil « NK like » a été défini comme étant suffisant pour promouvoir leur activité cytotoxique contre les cellules épithéliales, sans qu'il y ait nécessité d'activer leur TCR (247, 272). On notera un autre point crucial, les cellules épithéliales du patient cœliaque expriment davantage de protéines de stress MICA/MICB et HLA-E, ce qui en fait donc simultanément des cibles parfaites pour ces LIEs (123).

Les mécanismes responsables de cette programmation hautement cytotoxique des LIEs via ces récepteurs ne sont pas complètement élucidés, cependant, la surexpression de l'IL-15 dans le compartiment épithélial fait définitivement partie des principaux suspects (123, 272, 276).

### **C. Les cellules B spécifiques du gluten et de la tTGII**

#### **Le modèle haptène-porteur**

Parallèlement à cette réponse cellulaire, les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten aident au développement d'une réponse humorale tout à fait spécifique de la maladie et caractérisée par une importante plasmocytose au niveau de la Lp des patients (277-279) et par une signature sérologique discutée au point 1.2.6.2.B. En plus de cette plasmocytose et de cette sérologie, la réponse humorale s'accompagne de l'apparition de dépôts en IgA au niveau de la surface de l'épithélium et de sa membrane basale (179, 182, 280, 281). La présence de ces dépôts ne concerne que les individus souffrant de la pathologie et disparaissent dès le suivi d'une diète sans gluten, sous-entendant donc que leur production dépend du gluten. Les travaux de Dieterich et collègues ont ensuite démontré que ces anticorps sont en effet dépendants du gluten, a contrario, ils ne sont

pas spécifiques de ce dernier mais bien de la transglutaminase II tissulaire (50). Dans la même année, Ludwig Sollid a proposé un modèle permettant d'expliquer comment la consommation d'un antigène exogène conduit à la production d'auto-anticorps contre un antigène endogène tel que la transglutaminase II (282), permettant ainsi d'expliquer pourquoi la formation des anticorps contre cette enzyme est absolument dépendante de l'exposition du patient au gluten.

Ce modèle propose que l'interaction entre la tTGII et le gluten aboutit à la formation d'un complexe tTGII-gliadine, à l'image d'un complexe « haptène-porteur » (Sollid, 1997). Ce complexe est donc aussi bien reconnu par le récepteur des lymphocytes B spécifiques du gluten que par celui des lymphocytes B spécifiques de la tTGII. Comme nous l'avons déjà évoqué, ces cellules expriment les molécules du HLA de classe II et sont d'excellentes CPA. Ce complexe est alors internalisé par les deux types de cellules B et présenté aux cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten qui, grâce à la reconnaissance du gluten dans ce complexe tTGII-gliadine via leur récepteur, fournissent l'aide nécessaire aux cellules B spécifiques du gluten et aux cellules B spécifiques de la tTGII. Ces dernières peuvent ensuite évoluer en PCs sécréteurs d'anticorps de type IgG et IgA ciblant l'enzyme. Ce modèle haptène-porteur permet donc d'expliquer, premièrement, pourquoi ces anticorps sont observés malgré l'absence de cellules T CD4<sup>+</sup> tTGII spécifiques et, deuxièmement, pourquoi ces auto-anticorps chutent en parallèle du retrait du gluten dans l'alimentation des patients (51, 283, 284).

### **Implication des anticorps dans la pathogénèse**

L'étude du potentiel rôle pathogénique des cellules B dans la maladie et plus particulièrement des anticorps est un domaine en plein essor étant donné le succès des thérapies déplétant ces cellules B dans d'autres pathologies auto-immunes (285). Un des

mécanismes impliquant clairement les IgA anti-gliadine est la transcytose médiée par le récepteur à la transferrine que nous avons détaillé au point 1.3.1.2 et qui favorise le passage de la gliadine dans la Lp (231, 286). Ces anticorps anti-gliadine peuvent également augmenter la capture de cette dernière par les CPA de l'antigène et par conséquent favoriser sa présentation aux cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten (287, 288).

Le rôle des auto-anticorps anti-tTGII est un domaine plus nébuleux. Les principales données actuelles résultent d'études *in vitro*, démontrant que ces anticorps semblent être impliqués dans l'augmentation de la perméabilité de l'épithélium (144), dans l'inhibition de la différenciation des entérocytes (289), dans la stimulation de la prolifération des cellules épithéliales (290) ou encore dans l'induction de leur apoptose (291). La présence de leurs dépôts tissulaires au niveau de la muqueuse intestinale de patient cœliaque latents n'ayant pas d'atrophie villositaire (182) semble les impliquer dans les étapes initiales du développement de la maladie mais aucun mécanisme n'a été actuellement identifié.

Une autre facette de la pathologie cœliaque dans laquelle les dépôts en IgA semblent avoir un rôle certain est la dermatite herpétiforme, une manifestation cutanée de la pathologie. Le patient présente ici des lésions cutanées sous forme de cloques accompagnées de prurit, principalement au niveau des genoux, des coudes et des fesses (292, 293). Sur le plan immun, les lésions cutanées, contrairement aux lésions intestinales, ne présentent aucune lymphocytose. A contrario, elles sont caractérisées par un infiltrat de neutrophiles avec dépôt granuleux d'IgA dirigés contre la transglutaminase III tissulaire, l'isoforme que l'on retrouve au niveau du compartiment cutané. En développant un modèle murin humanisé exprimant le HLA-DQ8 sur fond NOD, Marietta et collègues ont pu démontrer que la consommation de gluten par ces souris s'accompagne de manifestations cutanées similaires à la dermatite herpétiforme avec

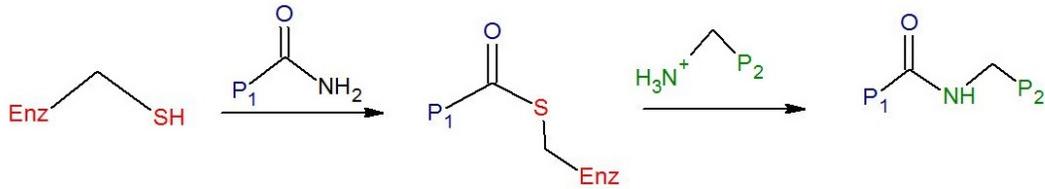
dépôts en IgA et infiltration de neutrophiles (294). Aussi, tout comme les patients, ces manifestations disparaissent lorsque les souris sont mises en diète sans gluten. Cependant, aucun type d'IgA spécifique de la tTGII, de la tTGIII ni du gluten n'a pu être détectés dans le sérum de ces souris. Finalement, une autre équipe a pu appuyer le rôle potentiel de ces anticorps dans la survenue de la dermatite herpétiforme puisque l'injection de sérum de patients cœliaques ou de patients souffrant de dermatite herpétiforme dans des souris SCID greffées de peau humaine s'accompagne de lésions dans le greffon. Le même résultat est obtenu avec l'injection d'anticorps anti-tTGIII (295).

#### **D. Importance de la tTGII**

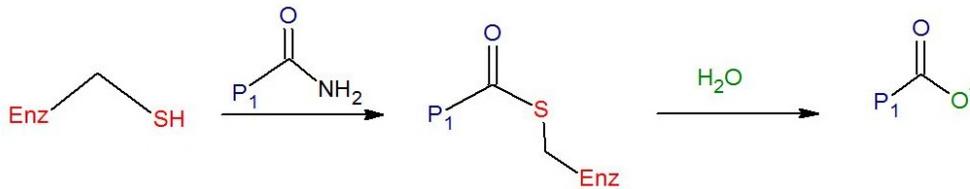
##### **Caractéristiques**

Le rôle central de la tTGII est maintenant indiscutable dans le contexte de la MC. Cette enzyme est non seulement nécessaire à la déamidation du gluten en vue de sa présentation aux cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de ce dernier mais elle est également l'auto-antigène de la pathologie. Elle appartient à la superfamille des transglutaminases, comportant les isoformes I à VIII. Contrairement aux autres isoformes, la tTGII n'est pas spécifique d'un type tissulaire ou même cellulaire, elle est exprimée de manière ubiquitaire et peut se définir comme un véritable couteau suisse cellulaire. En effet, elle intervient dans de nombreux mécanismes variés tels l'apoptose, la transduction de signaux, l'endocytose, l'adhésion cellulaire ou encore la formation de la matrice extracellulaire (296-298). Son activité calcium dépendante permet la catalyse de nombreuses modifications post-transcriptionnelles protéiques, principalement via son activité de transamidation, de déamidation et de cross-linking (299). La transamidation

### Isopeptide bond Formation



### Glutamine deamidation



**Figure 17: réaction de transamidation et de déamidation médiées par la tTGII.** L'enzyme permet le transfert d'un acyle entre le groupement  $\gamma$ -carboxamide d'une glutamine présente sur une première protéine et le groupement  $\epsilon$ -amine d'une lysine d'une seconde protéine. La cystéine du site actif de l'enzyme réagit avec le groupement  $\gamma$ -carboxamide de la glutamine (sur la première protéine) et forme un intermédiaire de réaction réagissant alors directement avec le groupement amine de la lysine (sur la seconde protéine), formant ainsi un lien peptidique entre les deux protéines (transamidation). En l'absence de l'amine, l'intermédiaire de réaction réagit avec une molécule d'eau, transformant ainsi la glutamine en glutamate (déamidation). Adapté de (300).

consiste en la réaction entre la cystéine du site actif de l'enzyme et la chaîne latérale d'un résidu glutamine d'une première protéine via la formation d'un lien thioester. L'intermédiaire de réaction ainsi formé réagit directement avec une amine primaire, bien souvent sur la lysine d'une seconde protéine, servant ici de substrat accepteur d'acyle.

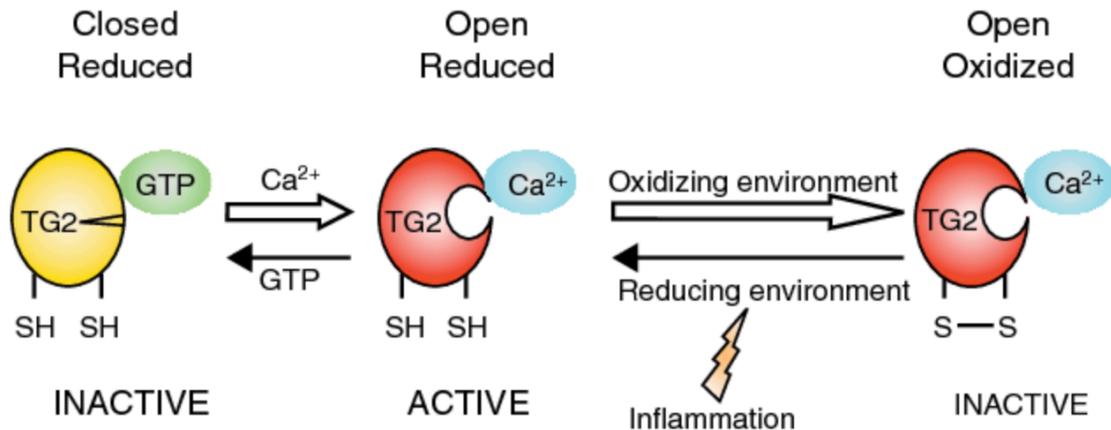
Cette étape permet d'établir une liaison covalente isopeptidique entre les deux protéines considérées dans la réaction de liaison et libère le site actif de l'enzyme. La déamidation quant à elle prend lieu en l'absence d'amine primaire, favorisant l'hydrolyse de l'intermédiaire de réaction, ce qui aboutit à la conversion d'un résidu glutamine d'une protéine en résidu glutamate (300) (**Figure 17**). Parallèlement à ces deux principales fonctions, la littérature décrit également la tTGII comme capable de fixer et d'hydrolyser

le GTP en GDP, jouant ainsi le rôle de GTPase dans la signalisation cellulaire dépendante des protéines G, faisant notamment intervenir la phospholipase C (301). Elle est aussi décrite comme ayant une activité de protéine kinase (302) et d'isopeptidase (303).

C'est la concentration en calcium et en ces nucléotides GTP/GDP, variant entre le milieu extra et intracellulaire, ainsi qu'entre les compartiments cellulaires considérés, qui va dicter la fonction de l'enzyme (304). Brièvement, la structure tertiaire du domaine catalytique de cette enzyme présente des caractéristiques lui permettant d'alterner deux conformations. On distingue une conformation ouverte, permettant l'activité de transamidation et régulée par la fixation d'ions calciques et on distingue la conformation fermée, assurant la fonction de GTPase et régulée par la présence du couple nucléotidique GTP/GDP (305).

Dans les conditions physiologiques normales, la tTGII est principalement localisée en intracellulaire et est présente sous sa conformation fermée suite à la faible calcémie des cellules et la plus haute concentration en GTP. Son activité enzymatique est donc inhibée (306). Un stress cellulaire s'accompagne bien souvent d'un flux calcique vers le compartiment intracellulaire, lequel semble être à l'origine de la translocation de l'enzyme vers le milieu extracellulaire (304). Ce dernier présente une concentration calcique plus importante que le milieu intracellulaire et la concentration en GTP/GDP est plus faible, favorisant alors la conformation ouverte de l'enzyme (305). Précisons un second niveau de contrôle : cette forme ouverte peut-être soit ouverte-inactive soit ouverte-active. La forme ouverte-inactive est due à la présence de ponts disulfures inhibiteurs entre les résidus glutamines de l'enzyme. La réduction de ces ponts disulfures permet alors la transition vers la forme ouverte-active et inversement, l'oxydation de cette forme ouverte permet une inactivation rapide de l'enzyme. Ces transitions

dépendent du potentiel d'oxydoréduction du milieu extracellulaire (307) (**Figure 18**). On comprend donc qu'en favorisant un potentiel réducteur, l'environnement inflammatoire de la muqueuse cœliaque permet l'activation de l'enzyme, déamidant ainsi davantage les peptides de gluten.



**Figure 18: oxydo-réduction, conformation et état d'activation de la tTGII.** En présence de GTP et d'une faible calcémie (environnement intracellulaire), la tTGII est réduite, sa conformation est fermée et son activité enzymatique est inactive. Lorsqu'elle est relarguée dans le milieu extracellulaire, l'enzyme évolue dans un environnement dont la concentration en GTP est faible et la calcémie plus élevée. Généralement, l'environnement extracellulaire est oxydatif et favorise la présence de ponts disulfures sur l'enzyme, elle est donc oxydée, en conformation ouverte mais son activité enzymatique est toujours nulle. En cas de conditions inflammatoires, l'environnement acquiert un potentiel réducteur et réduit les ponts disulfures, l'enzyme est ainsi réduite, sa conformation est toujours ouverte et son activité devient maintenant active (307).

### Régulation de la tTGII dans la MC

La tTGII se retrouve notamment en grande quantité dans le compartiment intestinal mais elle reste principalement inactive en condition physiologique normale. Les mécanismes conduisant à son activation dans le cadre cœliaque restent indéterminés mais la littérature actuelle oriente de plus en plus vers la destruction tissulaire et l'IFN- $\gamma$  comme étant responsables de son activation.

En effet, différentes études ont pu clairement démontrer que l'injection intrapéritonéale de Poly I:C chez la souris active le TLR3 et aboutit à une nécrose tissulaire, ces dommages étant accompagnés d'une activation de la tTGII (308, 309). Ces observations sont en accord avec les recherches de Siegel et collègues démontrant que la tTGII inactive du compartiment intracellulaire peut rapidement gagner le compartiment extracellulaire et être activée suite à la survenue de lésions (310). D'autres études ont pu démontrer le rôle important de l'IFN- $\gamma$  puisque la tTGII est activée de manière dose-dépendante par ce dernier dans des lignées cellulaires intestinales ainsi que dans la muqueuse des patients cœliaques (250, 311). A l'origine de ce dernier mécanisme IFN- $\gamma$  dépendant, il semblerait que cette cytokine stimule la production de thioredoxine par les monocytes. Cette molécule est capable de reconnaître et d'activer spécifiquement la tTGII par la réduction de ses ponts disulfures (312). Ainsi, l'augmentation de l'activation de la tTGII augmente la déamination du gluten, lequel promeut la différenciation de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> producteur d'IFN- $\gamma$ , entretenant ainsi une boucle positive.

### **Implication la tTGII dans la MC**

L'implication de la tTGII dans diverses pathologies inflammatoires peut s'expliquer dans la mesure où son activité enzymatique peut pleinement participer à l'entretien d'un contexte inflammatoire chronique, notamment en induisant la voie NF- $\kappa$ B (313, 314). Aussi, son rôle dans les modifications post-traductionnelles des protéines peut expliquer les changements de propriétés antigéniques de ces protéines, lesquelles sont alors impliquées dans la pathogenèse et l'inflammation de la maladie considérée. Rappelons-nous ici les conséquences de la déamination du gluten par la tTGII dans la pathologie cœliaque.

Il a été démontré que la transcription et la traduction de cette enzyme est augmentée dans la muqueuse intestinale du patient, aussi bien dans le compartiment intracellulaire que dans la matrice extracellulaire (315-317). Son activité est également augmentée (318), néanmoins, ces observations ne semblent pas s'inscrire dans les signes spécifiques de la pathologie puisqu'on les retrouve également dans d'autres conditions inflammatoires de l'intestin (316, 319). Ce qui rend la tTGII cruciale dans l'immunopathogénèse de la maladie c'est premièrement sa capacité à déamider le gluten et deuxièmement sa capacité à former un complexe haptène-porteur avec ce dernier. Comme nous l'avons vu au point 1.2.5.1.A, le premier événement permet d'augmenter l'envergure de la réponse T spécifique du gluten et le second événement, vu au point 1.3.2.2.B, aide à l'induction d'une réponse humorale spécifique de la maladie.

### **1.3.2.3 La réponse immunitaire innée : importance de l'interleukine-15**

#### **A. Contexte**

De nombreuses études ont pu démontrer que l'expression de l'IL-15 est augmentée chez les patients cœliaques, aussi bien dans l'épithélium que dans la Lp de la muqueuse intestinale (240, 275, 320, 321). Cette dualité spatiale dans sa surexpression lui permet d'agir aussi bien sur des acteurs de l'immunité innée qu'adaptative et comme nous le verrons au chapitre 3, elle est très certainement impliquée dans des mécanismes participant au développement de l'atrophie villositaire. En effet, elle est notamment responsable de l'expansion et de la survie des LIEs précédemment discutés et de l'augmentation de leur activité cytotoxique (247, 272). Aussi, nous verrons qu'elle est à l'origine de l'augmentation de l'expression des protéines de stress cellulaire par les entérocytes. Finalement, le modèle murin présenté dans ce travail repose en outre sur la surexpression de cette cytokine dans la muqueuse intestinale de la souris, tel qu'observé

chez le patient. Il convient donc ici de s'intéresser à sa biologie tout en intégrant son implication dans le contexte de la MC.

## **B. Caractéristique et régulation**

L'IL-15 est une cytokine pléiotropique de 15kDa découverte en 1994 par l'équipe du Dr. Thomas A. Waldmann (322). Cette cytokine appartient à la famille des cytokines à chaîne  $\gamma$  rejoignant ainsi l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9 et l'IL-21. Ces cytokines partagent la chaîne  $\gamma$  au niveau de leur récepteur hétérotrimérique. L'IL-15 est exprimée par une large audience cellulaire, aussi bien dans la lignée hématopoïétique que non hématopoïétique, ce qui l'implique dans des mécanismes aussi bien immuns que non immuns (320, 323, 324).

Plus précisément, c'est l'expression de son transcrit qui est ubiquitaire, on le retrouve notamment dans de nombreux organes tels le foie, les muscles, le cerveau ou encore l'intestin ainsi que dans de nombreux types cellulaires tels les cellules épithéliales, les fibroblastes, les myocytes ou encore les monocytes, macrophages et les cellules dendritiques (323, 324). L'histoire est différente en ce qui concerne la forme active de cette cytokine puisqu'elle est extrêmement difficile à détecter dans les conditions physiologiques normales. Son expression semble être principalement restreinte aux cellules dendritiques et aux monocytes (325). Cette différence entre la présence du transcrit et celle de la protéine implique l'existence de mécanismes de régulation finement contrôlés au niveau post-transcriptionnel. Ces mécanismes interviennent sur 3 niveaux : celui de la traduction, du transport intracellulaire et de la présentation (326, 327).

Premièrement, l'ARNm contient de multiples codons start AUG en amont de la région 5' non traduite ce qui réduit significativement l'efficacité de sa traduction (328). Deuxièmement, l'épissage alternatif est à l'origine de deux transcrits pour l'IL-15, lesquels diffèrent au niveau de la longueur du peptide signal (329, 330). L'isoforme courte (SSP, short signal peptide), faite de 21 acides aminés, n'est pas sécrétée et reste dans le compartiment cytoplasmique et nucléaire. L'isoforme longue (LSP, long signal peptide), faite de 48 acides aminés, est la forme qui sera transpréparée aux cellules cibles. Finalement on notera la présence d'un régulateur inhibiteur au niveau de la région carboxy-terminale de la séquence codante. L'importance de ces 3 mécanismes dans le contrôle de l'expression de l'IL-15 est illustrée par leur inhibition, conduisant à une synthèse 250 fois plus élevée de la protéine.

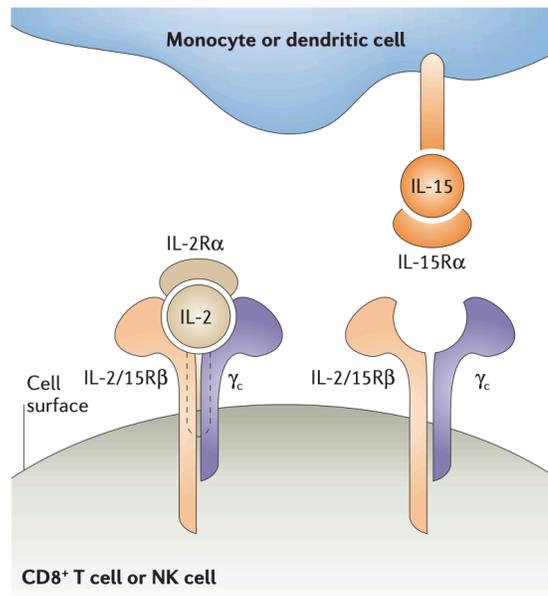
Aussi, le fait que la traduction de l'ARNm soit soumise à un tel contrôle tout en étant rapidement activée lorsqu'un stress cellulaire survient démontre que cette cytokine présente un rôle central dans la signalisation face à un danger puisqu'elle peut rapidement agir sur les cellules cibles (320). Notamment, l'IL-15 joue un rôle clé dans la différenciation, la prolifération et la survie des cellules NK, des lymphocytes T NK, des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des LIEs (331). Une telle rapidité dans sa signalisation permet l'induction immédiate d'une réponse et donc de protéger l'hôte face à une infection. Dans un même temps, une telle restriction de sa traduction sous-entend qu'une surexpression de la cytokine peut présenter des effets délétères.

### **C. Récepteur et voie de signalisation**

Tel qu'illustré par la figure 19, la signalisation de l'IL-15 fait intervenir des composants du récepteur de l'IL-2. En effet, cette signalisation se fait via un récepteur hétérotrimérique formé d'une part par la chaîne IL-2/15R $\beta$  et par la chaîne  $\gamma$ , communes

aux deux cytokines, et d'autre part par la chaîne IL-15R $\alpha$ , spécifique de l'IL-15 (332, 333). On notera qu'au même titre que l'IL-15, le transcrite codant pour IL-15R $\alpha$  est exprimé dans de nombreux types tissulaires et cellulaires (325). Plus précisément, ce complexe hétérotrimérique fonctionne par transprésentation et implique donc un contact direct entre la cellule émettrice et la cellule cible. Concrètement, la cellule productrice exprime la chaîne IL-15R $\alpha$  en surface cellulaire, laquelle présente une affinité extrême pour l'IL-15. Ce complexe IL-15R $\alpha$ /IL-15 sera alors trans-présenté à la cellule cible, qui elle, exprime le complexe formé par l'IL-2/15R $\beta$  et la chaîne  $\gamma$  (323).

L'activation de ce complexe permet l'induction d'une voie de signalisation JAK/STAT. Plus précisément, IL2/15R $\beta$  s'associe à JAK1 laquelle phosphoryle STAT3 et la chaîne  $\gamma$  s'associe à JAK3 laquelle phosphoryle STAT5. La résultante transcriptionnelle dépendra du type cellulaire et du contexte biologique considérés (320) mais ce sont généralement les voies AKT, MAPK et PI3K qui sont ensuite engagées, encourageant alors la prolifération et la survie cellulaire ainsi qu'une certaine résistance à l'apoptose (334, 335).



**Figure 19: complexes des récepteurs de l'interleukine-15 et de l'interleukine-2.**

L'IL-15 est une cytokine associée à la membrane de la cellule qui la produit, elle s'associe au monomère membranaire IL-15R $\alpha$  pour être ensuite transprésentée à la cellule cible exprimant les complexes IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma_c$ . Le complexe hétérotrimérique ainsi formé assure alors la signalisation en aval. L'IL-2 est quant à elle sécrétée par la cellule productrice sous la forme d'un complexe IL2R $\alpha$ /IL-2. Une fois sécrétée, l'IL-2 se fixe alors sur le complexe IL-2/15R $\beta$  et  $\gamma_c$  exprimés en surface de la cellule cible. C'est ce complexe qui est commun dans la signalisation des deux cytokines (325).

#### D. Interleukine-15 VS Interleukine-2

L'IL-15 et l'IL-2 partagent donc la sous-unité IL-2/15R $\beta$  ainsi que la chaîne  $\gamma_c$  et diffèrent uniquement au niveau de la sous-unité  $\alpha$  qui leur est spécifique, IL-15R $\alpha$  pour la première et IL-2R $\alpha$  pour la seconde. Aussi, ces deux cytokines, lorsqu'elles sont comparées *in vitro*, présentent des effets assez similaires sur l'homéostasie des lymphocytes T et des cellules NK (336). Ces observations ont donc suggéré l'existence d'une certaine redondance entre ces deux cytokines mais les modèles de souris knock-out pour l'une ou l'autre de ces cytokines ont permis de mettre en lumière leurs actuelles différences (323).

Les souris IL-2 KO présentent une expansion massive des lymphocytes et meurent principalement de complications associées à cette lymphoprolifération (337). Ce phénotype démontre toute l'importance de l'IL-2 dans son rôle immunorégulateur, notamment au niveau des cellules T régulatrices, empêchant ainsi la survenue de pathologies auto-immunes. Aussi, contrairement à l'IL-15, l'IL-2 s'avère plutôt être une cytokine « produite par les lymphocytes T pour les lymphocytes T » et est principalement sécrétée (325). Les souris IL-15 KO démontrent quant à elles une chute des cellules NK, des LIEs et des lymphocytes NK-like démontrant son rôle fondamental dans l'homéostasie de ces types cellulaires (338). Inversement, les souris surexprimant cette cytokine développent des leucémies avec expansion des cellules NK et des CD8<sup>+</sup> (339). On comprend davantage ici l'importance d'une régulation stricte au niveau de l'expression de cette cytokine et pourquoi toute dérégulation l'implique dans des processus immunopathologiques majeures.

#### **E. Implication de l'IL-15 dans la MC**

Étant donné le rôle essentiel de l'IL-15 dans l'homéostasie de l'immunité innée et adaptative, toute dérégulation de son expression présente d'importantes conséquences. Elle est d'ailleurs l'une des signatures classiques observées dans les pathologies auto-immunes ou l'organe cible va bien souvent surexprimer cette cytokine (320, 340). Cette dérégulation se retrouve notamment dans la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, le diabète de type I, le psoriasis ou encore les pathologies inflammatoires de l'intestin. L'ensemble de ces pathologies est caractérisé par une lymphocytose au niveau du tissu cible et par une destruction de ce dernier. La MC n'échappe pas à cette caractéristique et comme déjà discuté, le patient présente une surexpression de la cytokine dans sa muqueuse intestinale. Aussi, chez la souris, la seule surexpression de l'IL-15 au niveau des

entérocytes s'accompagne d'une altération du tissu, incriminant donc directement cette cytokine dans les altérations de la réponse immunitaire intestinale (276).

Ainsi, plusieurs études ont pu démontrer que la réponse générée par l'IL-15 au niveau des LIEs d'individus cœliaques est plus intense comparée à celle des LIEs d'individus sains. Notamment, leur migration, prolifération, production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  ainsi que l'activité cytotoxique contre les cellules épithéliales sont exacerbées (275, 321, 341). En accord avec cette dernière observation, l'IL-15 est également directement responsable de l'augmentation de l'expression des récepteurs activateurs cytotoxiques CD94/NKG2C et NKG2D à la surface des LIEs (271-273). Les recherches de Bertrand Meresse et collègues ont d'ailleurs pu démontrer que les LIEs issus de biopsies cœliaques étaient capables de présenter un effet cytotoxique par la seule activation du NKG2D. En parallèle, le traitement de CD8<sup>+</sup> effecteurs circulant avec de l'IL-15 permet l'obtention du même résultat (272). Cette habilité des LIEs du patient cœliaque semble être due à leur exposition chronique à cette cytokine (272). L'ensemble de ces résultats a permis de converger vers le concept abordé au point 1.3.2.3.B, suivant lequel les LIEs du patient cœliaque sont activés de manière indépendante du TCR via une reprogrammation transcriptionnelle de leur fonction cytotoxique grâce à l'IL-15.

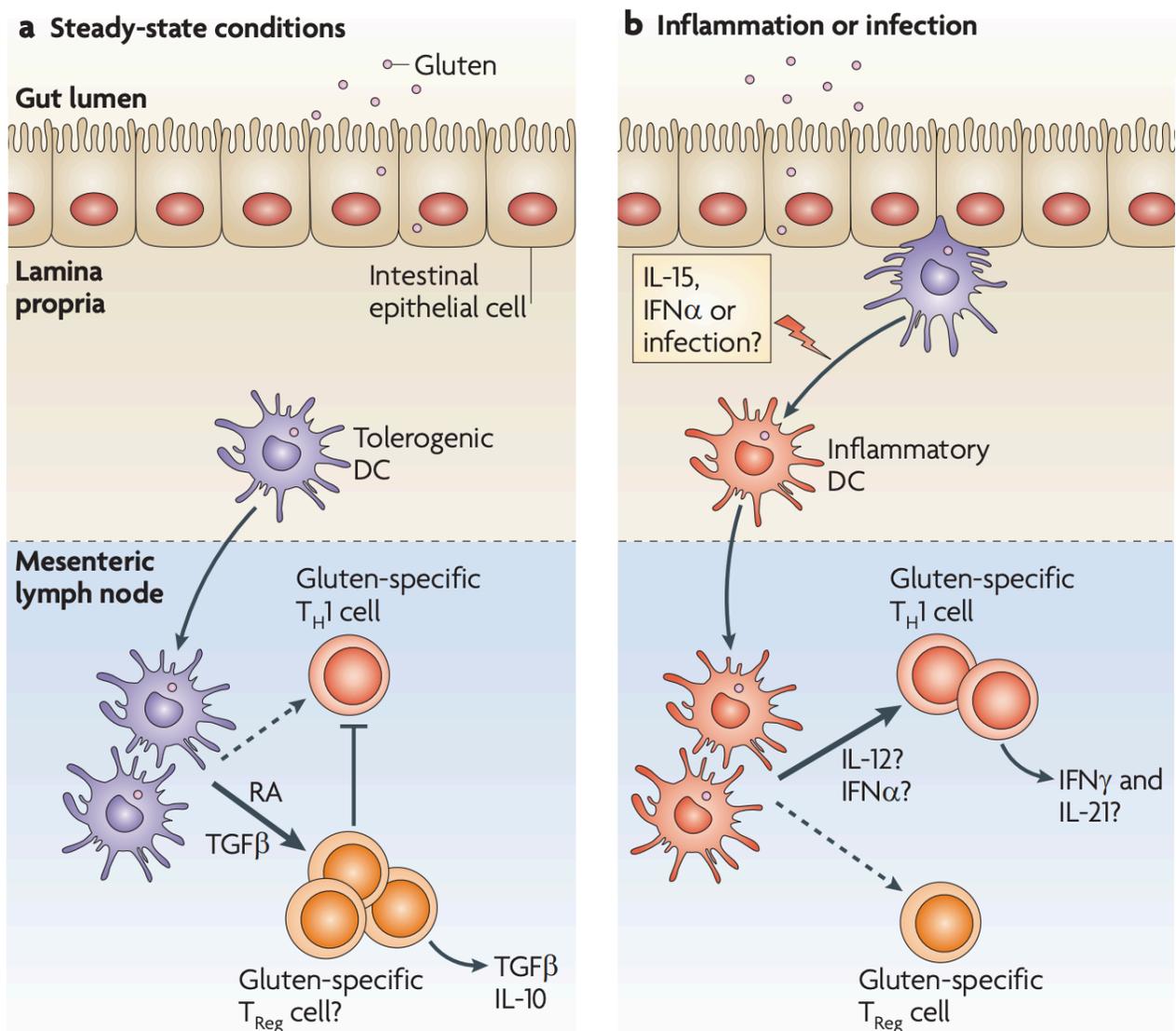
D'autre part, l'IL-15 peut directement influencer le phénotype des cellules épithéliales (321). En effet, les patients cœliaques consommant du gluten présentent une augmentation de l'expression de protéines de stress cellulaire telles MICA/MICB et HLA-E à la surface des cellules épithéliales et cet effet semble être relayé par l'intermédiaire de l'IL-15. Ainsi, et comme nous l'avons vu, l'interaction précise entre les récepteurs cytotoxiques activateurs et ces ligands de stress permettrait le relargage de la perforine et du granzyme-B à l'encontre des cellules épithéliales en état de stress cellulaire, assurant ainsi la lyse de l'épithélium (247, 272). Cette situation peut être contrecarrée par

la déplétion de l'IL-15 avec un anticorps déplétant la cytokine (276, 342) démontrant donc le rôle clé de cette interleukine dans la survenue de cette cascade cytotoxique. D'ailleurs, un autre exemple parlant de lui-même est le patient cœliaque réfractaire souffrant d'atrophie villositaire même sous régime d'exclusion. Chez ces formes sévères, l'IL-15 joue un rôle prépondérant dans la destruction de l'épithélium et sa suppression pourrait donc constituer une piste thérapeutique intéressante (214, 217, 343).

En plus de ces effets sur le compartiment épithélial, la surexpression de l'IL-15 dans la Lp lui permet d'interférer sur le développement de la réponse des cellules T régulatrices (241) (**Figure 20**). Premièrement, l'IL-15 altère l'activité immunosuppressive du TGF- $\beta$  grâce à sa capacité d'induction de la voie des MAPK. Brièvement, l'IL-15 induit la phosphorylation de JNK, laquelle induit phospho-c-jun qui à son tour altère la fixation de Smad3 (Small Mothers Against Decapentaplegic) sur les promoteurs cibles du TGF- $\beta$ , inhibant ainsi son activité régulatrice, notamment au niveau des CD8<sup>+</sup> (344). Aussi, l'IL-15 peut rendre les cellules T effectrices résistantes à l'effet immunosuppresseur des cellules T régulatrices. Ce mécanisme semble faire intervenir la voie de signalisation PI3K (345).

Parallèlement à ces résultats, une des recherches du Dr. Abadie a pu mettre en évidence que l'IL-15 surexprimée dans la Lp agit en synergie avec l'acide rétinoïque pour rendre les CD pro-inflammatoires et promouvoir leur production d'IL12/p70. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves activées par ces CD vont alors évoluer vers un profil Th1 pro-inflammatoire sécrétant de l'IFN- $\gamma$ . Un modèle de souris humanisé pour le HLA-DQ8 surexprimant l'IL-15 dans la Lp et exposé au gluten développe une réponse immunitaire contre le gluten caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre le gluten et la tTGII (242). Ces résultats soulignent donc clairement l'implication de l'IL-15 dans la perte de la TO au gluten.

Enfin, certains résultats suggèrent que l'IL-15 favorise l'expression de l'IL-21 par les cellules T CD4<sup>+</sup> (124). L'IL-21 fait partie des cytokines pro-inflammatoires clés de la maladie au même titre que l'IFN- $\gamma$ . Sa production IL-15 dépendante via les cellules T CD4<sup>+</sup> fait partie des pistes envisagées dans l'explication de la synergie existante entre les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten et l'IL-15 pour l'activation des LIEs.



**Figure 20: induction de la réponse inflammatoire anti-gluten suite à la perte du profil tolérrogène des cellules dendritiques. (a)** Le développement de la TO à un antigène alimentaire est classiquement assuré par les cellules dendritiques sécrétant des facteurs tolérrogènes tels le  $TGF-\beta$ , assurant la polarisation des cellules  $T CD4^+$  vers un profil Treg. **(b)** La muqueuse du patient cœliaque est caractérisée par l'expression de signaux pro-inflammatoires tels que l'IL-15, participant à la perte du profil tolérrogène des cellules dendritiques, favorisant alors la polarisation des cellules  $T CD4^+$  vers un profil Th1 sécréteur d' $IFN-\gamma$  et d'IL-21 (123).

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats sous-entend que la surexpression précise de l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale participe pleinement à la rupture de la TO et à la survenue de l'atrophie villositaire. En effet, nous avons vu que sa surexpression dans l'épithélium joue un rôle clé dans l'activité cytotoxique aberrante des LIEs à l'encontre de l'épithélium, lui-même en état de stress cellulaire. En parallèle, nous venons de voir que sa surexpression dans la Lp est à l'origine de mécanismes contribuant au développement d'un environnement pro-inflammatoire altérant directement les fonctions immunorégulatrices et encourageant donc la perte de la TO (346). Cependant, les raisons expliquant la surexpression de l'IL-15 dans un contexte cœliaque reste matière d'investigation. Mention et collègues ont notamment pu démontrer que les entérocytes de patients cœliaques expriment davantage l'IL-15 en surface par rapport aux individus sains, cependant il n'y a aucune différence notable au niveau de l'expression transcriptionnelle (240). Ceci sous-entend donc que la dérégulation de l'expression de cette cytokine trouve probablement sa source au niveau post-transcriptionnel. Les facteurs génétiques et/ou environnementaux à l'origine de cette dérégulation restent actuellement peu connus.

### **1.3.3 Conclusion**

Au vu des derniers points discutés, l'immunopathogenèse de la MC peut se voir comme le reflet d'une interaction complexe entre l'immunité innée et adaptative. En effet, l'activation des LIEs cytotoxiques conduisant à l'atrophie villositaire dépend d'un ensemble de signaux issus d'une part des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten et d'autre part de l'IL-15. Néanmoins, plusieurs questions restent actuellement sans réponse et le dialogue précis entre les cellules T CD4<sup>+</sup> de la Lp, les cellules T CD8<sup>+</sup> intraépithéliales et l'IL-15 reste énigmatique. Si la spécificité des CD4<sup>+</sup> est relativement bien cernée, celle des CD8<sup>+</sup> intraépithéliaux reste à préciser. Aussi, les mécanismes qui conduisent à la

surexpression de l'IL-15 dans la muqueuse intestinale du patient restent eux aussi un domaine d'investigation incomplet. Finalement, les raisons d'une augmentation de l'expression et de l'activité de la tTGII chez le patient ne sont pas clairement établies et il en est de même pour le potentiel rôle pathogénique des auto-anticorps ciblant cette enzyme.

Les données épidémiologiques et les résultats obtenus *in vitro* au cours de ces dernières décennies aident peu à peu à déchiffrer cette physiopathologie complexe. Néanmoins, c'est le développement d'un modèle animal complet qui permettra au final de bien intégrer le rôle respectif des différents acteurs ainsi que leurs interactions dans la cascade menant à cette immunopathogénèse. Le prochain et dernier chapitre de cette introduction consiste en une revue de la littérature concernant les modèles animaliers existant dans le domaine.

## **1.4 Modèles animaux de la maladie cœliaque**

### **1.4.1 Contexte**

Un des principaux facteurs actuels limitant la résolution du puzzle cœliaque et l'évolution des nouvelles stratégies thérapeutiques dans le domaine est l'absence d'un modèle animal préclinique, récapitulant l'ensemble des caractéristiques de la maladie observées chez le patient. Initialement, les principaux modèles d'étude étaient basés sur l'utilisation de lignées cellulaires intestinales, de cellules T spécifiques issues de biopsies de patients ou même de cultures de biopsies complètes. Bien évidemment, ces techniques *in vitro* présentent leurs avantages et leurs limites dans l'étude de la maladie, ce qui a peu à peu mené aux tentatives de développer différents modèles d'étude *in vivo*.

Cependant, cette tâche présente un certain paradoxe puisque développer un modèle murin afin d'améliorer la compréhension d'une pathologie requiert initialement une bonne compréhension de cette dernière. Dès lors, et au vu de la complexité de la MC, transférer les « bons ingrédients » de la pathologie de l'Homme à la souris est une entreprise ardue, parsemée d'essais-erreurs.

Ainsi, le grêle des modèles serait celui qui aurait la capacité de développer spontanément le spectre complet de la maladie suite à la seule consommation de gluten par l'animal. On parle ici d'une réponse CD4<sup>+</sup> Th1 gluten spécifique. On parle également d'une lymphocytose intra-épithéliale accompagnée d'une activation des LIEs et d'un stress cellulaire au niveau épithélial, menant à l'atrophie villositaire et à l'hyperplasie cryptique. On parle finalement d'une réponse humorale complète avec plasmocytose, production d'anticorps anti-gliadine et auto-anticorps anti-tTGII. Un tel outil serait précieux et permettrait de disséquer le rôle et la mécanistique des différentes composantes de la maladie, aussi bien sur le plan inné qu'adaptatif. Comprenant l'importance d'un tel outil, il y a donc eu durant ces deux dernières décennies une véritable course au développement d'un modèle « parfait » et de nombreux groupes s'en sont rapproché, sans jamais l'atteindre (228, 242, 254, 294, 347-352). Bien qu'ils aient permis d'éclairer certains aspects de la pathogenèse, aucun d'entre eux n'a, à ce jour, réussi à développer un phénotype complet reflétant fidèlement celui observé chez le patient. Pour une question de clarté, ces modèles sont résumés à la table 2.

L'évolution de ces modèles a très rapidement convergé vers la nécessité d'exprimer l'un ou l'autre haplotype de prédisposition génétique (228, 349, 351) et certains d'entre eux présentent la capacité de reproduire la réponse pro-inflammatoire Th1 gluten spécifique avec production massive d'IFN- $\gamma$  tout en présentant également une lymphocytose intra-épithéliale. Cependant aucun ne s'accompagne simultanément de

l'atrophie villositaire, qui, comme nous l'avons vu au point 1.2.6.2.A, est un des critères de diagnostic faisant autorité dans le domaine. Ce puzzle incomplet a néanmoins permis une avancée majeure dans le domaine et orienté vers le concept suivant lequel la réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire contribue, d'une façon ou d'une autre, au recrutement et à la prolifération des cellules T CD8<sup>+</sup> intraépithéliales, sans pour autant les activer puisque la destruction épithéliale n'est pas observée. Il manquerait donc un élément clé, qui permettrait non seulement l'activation des LIEs mais aussi le développement d'un stress épithélial, conduisant ensemble à la destruction de l'épithélium. Cependant, les mécanismes conduisant à la destruction progressive du tissu épithélial restent nébuleux. La question principale est de comprendre le dialogue entre le stress cellulaire épithélial et l'immunité adaptative permettant l'activation des LIEs au-delà d'un certain seuil inflammatoire, assurant ainsi le développement de l'atrophie villositaire.

Les études réalisées chez l'Homme et la souris ont pu, comme nous l'avons vu, identifier l'IL-15 comme facteur majeur dans la survenue du stress épithélial, dans l'activation des LIEs et dans les mécanismes de perte de la TO. Notamment, les recherches de Setty et collègues ont pu démontrer en 2015 que les patients cœliaques potentiels développent une réponse adaptative anti-gluten mais n'expriment pas d'IL-15 dans leur épithélium intestinal ni de récepteurs NK activateurs à la surface de leurs LIEs. Ces patients potentiels ne développent pas d'atrophie villositaire. Inversement, et de manière très intéressante, les parents d'individus cœliaques ne développent aucune réponse adaptative au gluten mais surexpriment par contre l'IL-15 dans leur épithélium et les LIEs expriment des niveaux élevés de récepteurs NK activateurs. Ces individus, bien que non cœliaques, présentent des altérations structurelles au niveau de leur épithélium intestinal (353). Ces deux observations clés ont amené les auteurs à conclure que c'est précisément la synergie opérant entre la réponse adaptative au gluten et le stress épithélial qui permet

l'induction d'une activation suffisante des LIEs pour la destruction des cellules épithéliales et le développement de l'atrophie villositaire. Dès lors, et sur base de l'immunopathogénèse discutée au point 1.3.2.3, nous comprenons pourquoi cette interleukine a été rapidement suspectée comme étant cet ingrédient manquant dans le développement d'un modèle complet de la MC.

Le point suivant détaille quelques modèles murins brièvement abordés précédemment et insiste plus particulièrement sur ceux exprimant le HLA-DQ8, haplotype utilisé dans le modèle humanisé que nous avons développé. Ce point discute également de modèles incluant l'expression de l'IL-15, puisqu'ici aussi, il s'agit d'un élément majeur dans l'ingénierie de notre souris. Finalement nous passerons au chapitre 2 et 3 de ce manuscrit afin de détailler la caractérisation de ce nouveau modèle proposé par notre équipe et constituant le corps de mon travail doctoral. Nous verrons que l'exposition de ce modèle au gluten permet pour la première fois l'obtention simultanée d'une réponse Th1 gluten spécifique, d'une réponse humorale tout aussi spécifique ainsi que de l'activation suffisante des LIEs conduisant *in fine* à l'atrophie villositaire.

Espèce	Souche / transgène	Schéma expérimental	Association au CMH de classe II	Anticorps anti-gliadine	Anticorps anti-TG2	Lymphocytose intra-épithéliale	Atrophie villositaire	Référence(s)
Rat	Wistar-AVN	Injection de gliadine et d'IFN- $\gamma$ dans la boucle duodénale	non	non déterminés	non déterminés	non déterminée	non	(368)
Rat	Wistar-AVN	I.p. d'IFN- $\gamma$ et diète sous gluten dès la naissance	non	non déterminés	non déterminés	augmentée	très légère	(340)
Souris	C57Bl/6 et transfert en Rag-/-	Transfert de cellules T CD +CD45RB/lowCD25- de C57Bl/6 sensibilisées au gluten en souris Rag-/-	oui	IgA et IgG2c	non	non déterminée	oui	(338)
Souris	MHC class II KO / HLA-DQ8Tg	Immunsation avec gluten/CFA suivi de 3 semaines de gavage au gluten	oui	IgG	non	augmentée	non	(220,341)
Souris	NOD / MHC class II KO / HLA-DQ8Tg	I.p. toxine pertussique + I.p. gluten/CFS 3 jours après + gavage 2x par semaine	oui	IgG	non	inchangée	non	(285)
Souris	NOD / MHC class II KO / HLA-DQ8Tg	Gavage hebdomadaire à la gliadine et à la toxine cholérique	oui	IgG	IgA	augmentée	non	(339)
Souris	HLA-DQ2-DR3 / MHC class II KO / Human CD4 T cells	Immunsation avec gluten/CFA/toxine pertussique suivi de 18 semaines de diète au gluten	oui	faible, IgA	faible, IgA	non déterminée	non	(249)
Souris	HLA-DQ2.5 / MHC class II KO	Injection de cellules T spécifiques du gluten en contexte HLA-DQ2 + diète en gluten	oui	non déterminés	non déterminés	non déterminée	non	(337)
Souris	IL-15 +/- (T3b promoter)	Aucun	non	plasmocytose	plasmocytose	augmentée	spontanée après 3 mois	(350,267)
Souris	IL-15 +/- (T3b promoter) / OT-II Tg	Exposition chronique à l'ovalbumine alimentaire	non	non déterminés	non déterminés	augmentation de l'expression du granzyme B	spontanée après 3 mois	(342)
Souris	IL-15 +/- (Dd promoter) HLA-DQ8Tg	Gavage au gluten tous les deux jours sur une période de 10 jours	oui	IgG et IgA	IgG et IgA	augmentée	non	(233)

**Table 2 : modèles animaux de la maladie cœliaque**

## 1.4.2 Modèles clés existants

### 1.4.2.1 Modèles humanisés exprimant le HLA-DQ8

#### A. Importance du système HLA

L'implication des gènes du système HLA dans la survenue de nombreuses pathologies auto-immunes est maintenant reconnue depuis longue date (354). Dès lors, le concept d'humaniser les modèles murins pour l'expression de ces gènes de prédisposition a rapidement émergé dans le domaine et constitue maintenant un prérequis quasi indispensable dans leur développement. L'intérêt d'inclure un tel transgène réside dans sa capacité à façonner le répertoire des cellules T de la souris à l'image de la biologie humaine, incluant par conséquent des restrictions du répertoire probablement impliquées dans la pathogenèse de la maladie considérée. La question venant naturellement à l'esprit est de savoir comment ces molécules du HLA humain vont interagir avec le TCR des cellules T CD4<sup>+</sup> murines ? Plusieurs solutions ont été apportées, notamment des hétérodimères chimériques tout à fait fonctionnels où le monomère  $\alpha$  de la molécule du CMH reste endogène à la souris tandis que le monomère  $\beta$ , responsable de la présentation de l'antigène, est issu de l'Homme (355). Une autre approche est celle d'inclure le transgène humain pour le HLA et le transgène humain pour le CD4 afin de permettre une interaction tout à fait spécifique (356). Finalement, et même si les conséquences sur le répertoire des cellules T restent peu décrites, certaines études suggèrent que les molécules du HLA humain peuvent tout à fait interagir avec le CD4 murin (357, 358). Quelle que soit la technique utilisée, ce type de souris humanisé est donc maintenant largement employé pour l'étude de pathologies auto-immunes humaines. La MC n'échappe pas à l'utilisation de ces souris, avec, dans son contexte, l'emploi de l'HLA-DQ2 ou de l'HLA-DQ8.

## **B. Black *et al*, 2002**

Un premier modèle cœliaque basé sur l'expression de l'HLA-DQ8 humain a été développé par les équipes du Dr. Sheila David et Joseph Murray. Ce modèle repose sur l'expression de l'HLA-DQ8, l'élimination du CMH de classe II murin et l'expression du CD4 humain. De manière succincte, ces souris ont été immunisées par une émulsion de gluten/adjuvant de Freund et les cellules T des ganglions lymphatiques ont ensuite été récupérées une semaine plus tard pour être restimulées *in vitro* avec du gluten. Cette prolifération a pu être inhibée en utilisant un anticorps dirigé contre le HLA-DQ, démontrant sa dépendance à l'haplotype humain. Dans un autre schéma expérimental, les souris ont également été immunisées tel que précédemment mais cette fois par voie intrapéritonéale puis gavées au gluten pour une semaine. Les cellules T du compartiment intestinal ont ensuite été récupérées et restimulées au gluten, ce qui a permis la détection des cytokines IL-10 et TGF- $\beta$ , attestant ici d'un profil régulateur et du développement d'une réponse tolérogène. En accord avec ces données, le modèle ne développe pas d'atrophie villositaire (228).

## **C. Marietta *et al*, 2002 VS Galipeau *et al*, 2011**

Ce modèle a ensuite été repris par l'équipe du Dr. Joseph Murray et croisé sur un fond NOD, terrain fertile pour le développement de caractéristiques auto-immunes (359). Ce modèle a dans un premier temps été pré-immunisé à la toxine pertussique puis immunisé par une émulsion de gluten/adjuvant de Freund par voie intrapéritonéale. Enfin, ces souris ont été gavées au gluten 2 fois par semaine pour des durées variables oscillant entre 2 et 5 mois. Ce schéma expérimental a mené au développement d'une condition ressemblant fortement à la dermatite herpétiforme dans 17% des souris et le

passage en diète sans gluten permet le retour des conditions saines. Néanmoins, ce modèle ne développe pas d'atrophie villositaire (294).

On remarquera que ce modèle a également été exploité par l'équipe du Dr. Elena Verdu en 2011 sous un schéma expérimental différent. Ici le modèle est gavé par une suspension de gluten et de toxine cholérique une fois par semaine, durant 3 semaines et passe en diète contenant du gluten dès le premier gavage. Cette exposition au gluten conduit à des dysfonctions de la barrière intestinale et à la production des auto-anticorps dirigés contre la tTGII, sans pour autant promouvoir le développement d'une d'atrophie villositaire. De manière très intéressante, lorsque le schéma expérimental survient après déplétion des cellules T régulatrices, le modèle développe une insulite sévère, attestant ainsi du lien étroit mais encore peu compris entre le diabète de type I et la MC (349).

#### **1.4.2.2 Modèles exprimant l'interleukine-15**

Comme nous l'avons vu au point 1.3.2.3.C, l'IL-15 est surexprimée dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale des patients cœliaques, ce qui l'incrimine profondément dans l'immunopathogenèse de la maladie. Notamment, rappelons-nous ici qu'elle agit directement sur les LIEs de l'épithélium intestinal et induit l'expression du récepteur activateur NKG2D et augmente leur activité cytotoxique (272). Ces résultats attestant du rôle central de l'IL-15 dans la pathogenèse de la maladie ont ainsi conduit au développement de modèles murins surexprimant cette cytokine, soit spécifiquement dans l'épithélium intestinal, soit, nous le verrons, dans les autres compartiments à l'exception de l'épithélium intestinal.

#### **A. Ohta *et al*, 2002 et Yokoyama *et al*, 2009**

Ainsi, certaines équipes se sont attelées à développer des modèles surexprimant spécifiquement l'IL-15 dans le compartiment épithélial intestinal. Une telle spécificité dans l'expression spatiale de l'IL-15 est assurée ici par l'utilisation d'un modèle où la transcription de l'IL-15 est contrôlée via le promoteur T3b, spécifique des cellules épithéliales intestinales (276, 360). De manière intéressante, ces souris développent spontanément une lymphocytose intraépithéliale caractérisée par une légère augmentation de la fréquence des LIEs exprimant le récepteur activateur NKG2D. Aussi, ces modèles développent une atrophie partielle de leurs villosités. Cependant, il faut noter que ces études ne renseignent pas l'influence que cette surexpression de l'IL-15 dans l'épithélium peut avoir sur la réponse immunitaire adaptative face à un antigène alimentaire. Aussi, l'absence de cette composante adaptative dans ce modèle pourrait expliquer pourquoi la fréquence des LIEs NKG2D<sup>+</sup> parmi la population totale de LIEs reste relativement faible et donc pourquoi l'atrophie villositaire n'est que partielle dans ces souris.

#### **B. Korneychuk *et al*, 2014**

Les deux études précédentes ont donc mis en lumière cette nécessité d'incorporer une réponse immunitaire adaptative en parallèle du stress épithélial encouru. Ainsi, l'équipe du Dr. Cerf-Bensussan a exploité le modèle précédemment décrit et l'a croisé avec le modèle murin bien connu OTII TCRtg dont les cellules T CD4<sup>+</sup> expriment toutes un TCR spécifique pour l'ovalbumine, un antigène alimentaire modèle. Lorsque ces souris OTII IL-15 transgéniques sont exposées à l'ovalbumine durant 3 mois, elles présentent un retard de croissance, une atrophie villositaire et une expansion des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Cependant, il s'avère que la population des lymphocytes OT-II CD4<sup>+</sup>

s'orientent quant à eux vers un profil de cellules T régulatrices migrant dans la Lp, les GM et la rate (352). L'atrophie villositaire observée dans ce modèle est donc probablement uniquement dépendante de la présence de l'IL-15 dans l'épithélium du modèle T3b-IL-15 transgénique tel qu'observé précédemment par Ohta et collègues (360).

### **C. De Paolo *et al*, 2011**

Le modèle murin développé en 2011 par DePaolo et collègues vise à déterminer si l'expression simultanée de l'haplotype HLA-DQ8 sur les CPA et de l'IL-15 dans la Lp permet le développement d'une pathologie cœliaque au spectre complet (242). Pour ce faire le modèle D<sup>d</sup>-IL-15tg du Dr. Caligiuri a été croisé avec le modèle CMH II KO/HLA-DQ8 du laboratoire du Dr. David discuté précédemment.

Le modèle développé par l'équipe du Dr. Caligiuri repose sur l'utilisation d'un transgène astucieusement développé sur trois points fondamentaux (323). Premièrement, ce transgène, référé comme Dd-IL-15tg, est construit d'une manière telle qu'il est capable de contourner les trois mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de la cytokine discutés précédemment. Deuxièmement, la séquence leader de l'IL-15 est remplacée par celle de l'IL-2. Finalement, ce construit est sous le contrôle du promoteur H-2D<sup>d</sup>, à savoir le promoteur des molécules du CMH de classe I, virtuellement exprimé dans tous les types cellulaires ou presque. En particulier et de manière fort intéressante, ces souris surexpriment l'IL-15 partout à l'exception de l'épithélium intestinal. Aussi, et au vu des fonctions biologiques de l'IL-15 discutée précédemment, on comprend aisément pourquoi le phénotype de ces souris Dd-IL-15tg est caractérisé par une expansion massive des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des cellules NK. Au final, ces souris évoluent vers une lymphocytose massive et multisystémique avec développement d'un tableau leucémique.

Ainsi, le modèle obtenu par DePaolo et collègues est la souris HLA-DQ8/D<sup>d</sup>-IL-15tg, référée dans ce manuscrit comme DQ8-IL-15<sup>LP</sup>, LP référant à l'expression de l'IL-15 dans la lamina propria. Ce modèle constitue à ce jour le modèle le plus fidèle de la pathologie observée chez l'Homme, même s'il reste incomplet. En effet, lorsque ces souris sont gavées au gluten durant 10 jours, on observe une augmentation du nombre de LIEs traduisant l'apparition d'une lymphocytose. Aussi, ces souris présentent une sérologie positive pour les anticorps anti-gluten et pour les auto-anticorps anti-tTGII, traduisant une perte de la TO dans ce modèle. En accord avec ces observations, lorsque les cellules de la Lp sont récupérées et restimulées *in vitro* avec de la gliadine, on observe une augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , sous-entendant donc la présence de cellules T spécifiques du gluten.

Néanmoins, ce modèle ne présente aucune atrophie villositaire, sous-entend donc que la perte de la TO et la prolifération des LIEs ne sont pas suffisantes pour induire la destruction épithéliale. Ceci s'explique probablement par la construction D<sup>d</sup>-IL-15Tg puisque la molécule H2-D<sup>d</sup> n'est pas exprimée par les cellules épithéliales intestinales. Dès lors ce modèle ne reflète pas complètement la pathologie cœliaque active où l'IL-15 est surexprimée simultanément dans la Lp et dans l'épithélium. Cette souris ressemble à un patient cœliaque latent qui, comme nous l'avons vu, présente une lymphocytose intra-épithéliale et une sérologie cœliaque positive, sans pour autant développer d'atrophie villositaire. Dès lors, l'absence de l'IL-15 dans l'épithélium de ce modèle est probablement l'ingrédient manquant à ajouter afin d'obtenir une activation cytotoxique des LIEs qui soit suffisante. Le modèle développé au chapitre 3 confirme cette hypothèse.

L'ensemble de ces observations démontre que le spectre complet de la maladie ne survient ni suite au développement d'une réponse immunitaire adaptative dans la Lp, ni suite à une lymphocytose avec stress épithélial, si ces deux éléments sont considérés

séparément dans le temps. C'est probablement la présence simultanée de ces deux facettes de l'immunité (le HLA prédisposant et l'IL-15 dans la Lp pour la partie adaptative et l'IL-15 dans l'Ep pour la partie innée) qui va assurer leur synergie au travers des deux compartiments de la muqueuse intestinale et donc permettre le dépassement d'un certain seuil d'activation. Ceci mènera *in fine* à la perte de la TO dans la Lp et à la destruction du tissu épithélial intestinal, dans un même temps et dans un seul et même modèle.

## Chapitre 2. Objectifs de la thèse doctorale

Le chapitre 1 maintenant terminé, nous comprenons pourquoi la MC est une pathologie auto-immune suscitant un grand intérêt dans le domaine de l'immunologie et de l'auto-immunité. La connaissance de l'antigène déclencheur, la connaissance de la susceptibilité génétique de l'individu et la facilité d'accès du tissu cible permettent une étude plus aisée des interactions entre l'hôte et son environnement ainsi que des facteurs pouvant influencer le déroulement de la maladie. Ce sont précisément ces éléments qui ont permis une évolution du savoir assez rapide au cours des 50 dernières années mais ces avancements ont également révélé toute la complexité du paysage cœliaque.

Malgré les avancées réalisées, il nous manque justement quelques pièces dans la mosaïque de la pathologie. Ainsi, la compréhension de sa pathogenèse, du spectre de sa symptomatologie, du paysage génétique et des facteurs environnementaux nécessaires à son développement reste incomplète. C'est au travers des progrès réalisés dans la précision et l'affinement des modèles murins que subsistent ces réponses. **Ainsi, le but de cette thèse doctorale a été de générer et de caractériser un nouveau modèle murin humanisé développant pour la première fois le spectre complet d'une entéropathie spécifique au gluten. Ceci inclut la lymphocytose intraépithéliale, l'expression des récepteurs NK activateurs et de molécules cytotoxiques au niveau de ces LIEs, la production d'anticorps contre le gluten et contre la tTGII, une réponse inflammatoire et finalement, l'atrophie villositaire.** Un tel modèle nous a permis d'étudier en profondeur la pathogenèse de la maladie en manipulant les facteurs immunitaires ayant conduit à son ingénierie. Retirer, ajouter et combiner ces facteurs entre eux nous a permis de comprendre leurs rôles, leurs interactions et leur statut de potentielles cibles thérapeutiques. Une telle approche nous a également permis d'étoffer les résultats obtenus chez l'Homme.

Pour développer un tel modèle, nous avons tiré les enseignements de données cruciales issues de la littérature et ayant été discutées au travers du chapitre 1 :

**1.** De nombreuses données soulignent l'association génétique entre l'expression de l'HLA-DQ2 ou de l'HLA-DQ8 et la survenue de la pathologie. Cependant moins de 5% de la population exprimant ces haplotypes développent la maladie et les souris humanisées pour ces haplotypes développent une réponse immunitaire adaptative contre le gluten tout en maintenant une TO (228, 254, 347). **Conclusion : l'expression d'un haplotype de susceptibilité n'est pas suffisante à elle seule pour développer une perte de la TO au gluten.**

**2.** La littérature comporte également de nombreuses données soulignant le rôle de l'IL-15 dans la pathologie, une cytokine surexprimée dans la muqueuse des patients cœliaque actifs. Cette IL-15 permet l'accumulation des LIEs dans l'épithélium (275, 321) ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs NK activateurs et une diminution des récepteurs NK inhibiteurs à la surface cellulaire de ces derniers (247, 271, 272). Les modèles murins surexprimant cette cytokine dans l'épithélium intestinal confirment ces résultats et développent une lymphocytose des LIEs avec atrophie villositaire sans pour autant perdre leur TO (276, 352, 360). **Conclusion : l'expression de l'IL-15 dans l'épithélium permet l'expansion de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques et le développement d'une atrophie villositaire mais pas de perte de la TO.**

**3.** Le modèle précédemment développé par DePaolo, Abadie et collègues repose sur l'association de l'expression de l'HLA-DQ8 humain à la surexpression de l'IL-15 dans la Lp et conduit à la polarisation de la réponse adaptative anti-gluten vers une perte de la TO à ce dernier et s'accompagne d'une lymphocytose intraépithéliale sans pour autant

présenter une destruction du tissu (242). **Conclusion : l'expression de l'HLA-DQ8 sur les CPA et de l'IL-15 dans la lamina propria conduit à une perte de la TO et à une lymphocytose partielle mais n'est pas suffisante pour développer simultanément une atrophie villositaire.**

Dès lors, sur base de ces trois observations clés, nous avons émis l'hypothèse que c'est l'association simultanée entre la réponse adaptative au gluten (médié par le HLA-DQ8 et par l'IL-15 dans la Lp) et l'expression d'IL-15 dans l'épithélium qui est responsable du développement d'une MC complète incluant la perte de la TO et l'atrophie villositaire, dernière pièce manquante aux modèles murins actuels.

Le modèle développé dans ce travail repose donc sur la surexpression de l'IL-15 dans la Lp et dans l'épithélium ainsi que sur l'expression de l'HLA-DQ8 humain au niveau des CPA. Nous avons pour se faire croisé le modèle DQ8-IL-15<sup>LP</sup> précédemment développé par notre équipe (et nommée dans les travaux antérieurs DQ8-D<sup>d</sup>-IL-15tg) à la souche DQ8-villin-IL-15tg (référée comme DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>) exprimant l'IL-15 dans l'épithélium intestinal grâce au promoteur spécifique des cellules épithéliales intestinales, villin. La souris triple transgénique ainsi générée est la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>. Nous verrons en détail dans le chapitre 3 que la consommation de gluten par cette souris s'accompagne d'une perte de la TO au gluten avec cellules T CD4<sup>+</sup> gluten spécifiques productrices d'INF- $\gamma$  et production des anticorps spécifiques de la maladie. Ce modèle présente également un stress cellulaire épithélial et une lymphocytose avec activation des LIEs, médian l'atrophie villositaire. De manière très importante, ce spectre est entièrement dépendant de la consommation de gluten, de l'expression simultanée de l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse et de celle de l'HLA-DQ8 humain.

## Chapitre 3. The interplay between IL-15, gluten and HLA-DQ8 drives the development of coeliac disease in mice

### Authors:

Valérie Abadie<sup>†\*1,2,3</sup>, Thomas Lejeune<sup>†1,2</sup>, Sangman M. Kim<sup>†3,4,17</sup>, Brad A. Palanski<sup>8</sup>, Jordan D. Ernest<sup>3,4</sup>, Olivier Tastet<sup>7</sup>, Jordan Voisine<sup>3,4</sup>, Valentina Discepolo<sup>3</sup>, Eric V. Marietta<sup>11,12,13</sup>, Mohamed Fahmy<sup>14,16</sup>, Cezary Ciszewski<sup>3,4</sup>, Romain Bouziat<sup>3,4</sup>, Kaushik Panigrahi<sup>3</sup>, Irina Horwath<sup>11</sup>, Matthew A. Zurenski<sup>3</sup>, Ian Lawrence<sup>3</sup>, Anne Dumaine<sup>14</sup>, Vania Yotova<sup>14</sup>, Jean-Christophe Grenier<sup>14</sup>, Joseph A. Murray<sup>11</sup>, Chaitan Khosla<sup>8,9,10</sup>, Luis B. Barreiro<sup>14,15,16,17</sup> and Bana Jabri<sup>\*3,4,5,6,7</sup>

### Affiliations:

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Infectiology, and Immunology, Faculty of Medicine, University of Montreal, <sup>2</sup>Sainte-Justine Hospital Research Centre, Montreal, Quebec, Canada <sup>3</sup>Department of Medicine, <sup>4</sup>Committee on Immunology, <sup>5</sup>Department of Pathology, <sup>6</sup>University of Chicago Coeliac Disease Center, <sup>7</sup>Section of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Department of Pediatrics, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA. <sup>8</sup>Department of Chemistry, <sup>9</sup>Department of Chemical Engineering, <sup>10</sup>Stanford ChEM-H; Stanford University, Stanford, CA, USA. <sup>11</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, <sup>12</sup>Department of Immunology, <sup>13</sup>Department of Dermatology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA. <sup>14</sup>Department of Genetics, Sainte-Justine Hospital Research Centre, <sup>15</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medicine; University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>16</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine; University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada, <sup>17</sup>Department of Medicine, Section of Genetic Medicine, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA, <sup>18</sup>Department of Biology, University of San Francisco, San Francisco, CA, USA

†These authors contributed equally to this work.

\*Co-senior and corresponding authors: bjabri@bsd.uchicago.edu (B.J.); vabadie@medicine.bsd.uchicago.edu (V.A.)

### **Contributions :**

Avant de passer au corps de cet article, il convient de préciser que ce dernier est le résultat d'une réflexion de très longue haleine guidée par les recherches préalablement réalisées au cours de la carrière du Dr. Bana Jabri. Aussi, ce projet a débuté en 2011 par le Dr. Abadie lors de ses activités de recherches post-doctorales dans le laboratoire du Dr. Jabri. De nombreuses personnes ont ensuite collaboré sur ce projet jusqu'à ce jour et plus particulièrement, ce travail a évolué sous forme d'une collaboration entre le laboratoire du Dr. Jabri à l'université de Chicago et le laboratoire du Dr. Abadie à l'université de Montréal une fois cette dernière installée en tant que chercheuse principale à Montréal. J'ai rejoint l'équipe du Dr. Abadie en janvier 2015 ou j'ai alors directement entamé mes activités de recherche sous sa supervision. J'ai débuté le projet en établissant dans un premier temps les souches HLA-DQ8, DQ8-IL-15<sup>LP</sup>, DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> et IL-15<sup>LPxIEC</sup>. Une fois l'ensemble des souches obtenues aussi bien à Montréal qu'à Chicago, nous avons pu débiter les expérimentations décrites dans ce manuscrit, lesquelles se sont ajoutées à certaines expériences réalisées ultérieurement à mon arrivée au laboratoire. Sangman Michael Kim et Jordan Ernest étaient responsables des expérimentations réalisées à Chicago, j'étais responsable des expérimentations réalisées à Montréal et ce, suivant le schéma décrit ci-dessous :

- **Comparaison des souches DQ8-IL-15<sup>LP</sup> vs DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> vs DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> :** 2 expériences réalisées à Chicago par Sangman et Jordan, 2 expériences réalisées à Montréal par moi-même.
- **Comparaison des souches DQ8 vs DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> :** 2 expériences réalisées à Chicago par Sangman et Jordan et 2 expériences réalisées à Montréal par moi-même.

- **Comparaison de souches IL-15<sup>LPxIEC</sup> vs DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>** : 5 expériences réalisées à Montréal par moi-même.
- **Analyse transcriptionnelle comparative des souches DQ8 vs IL-15<sup>LPxIEC</sup> vs DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>** : ces expériences ont été réalisées en 2012 et à Chicago par Valérie Abadie et Cezary Ciszewski. L'analyse bio-informatique a été réalisée par l'équipe du Dr. Luis Barreiro.
- **Expérience en diète sans gluten** : 2 expériences réalisées à Chicago par Sangman et Jordan et 2 expériences réalisées à Montréal par moi-même.
- **Expérience de gavage au gluten vs diète classique** : 1 expérience réalisée à Montréal par moi-même.
- **Expérience de déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>** : 4 expériences réalisées à Montréal par moi-même.
- **Expérience de déplétion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>** : 4 expériences réalisées à Chicago par Sangman et Jordan.
- **Expérience de neutralisation de l'IL-21 et de l'IFN- $\gamma$**  : 2 expériences réalisées à Montréal par moi-même et 3 expériences réalisées tous ensemble à Chicago lors de notre déménagement à l'université de Chicago en 2018.
- **Expérience de neutralisation de l'IL-15** : 4 expériences réalisées à Montréal par moi-même. Ces résultats ne sont pas inclus dans le manuscrit.
- **Expérience d'inhibition de la tTGII** : 4 expériences réalisées à Chicago par Sangman et Jordan, avec l'aide de Brad Palansky du laboratoire du Dr. Koshla basé à l'université de Stanford.

Quel que soit le lieu où les expériences ont été réalisées, chacun était responsable du bon déroulement du schéma expérimental appliqué selon la question posée ainsi que de la récolte et du traitement des échantillons brutes et des analyses en cytométrie en flux obtenus le jour même des expériences. J'étais ensuite responsable de l'ensemble des qPCR, Sangman responsable des ELISA et le Dr. Abadie responsable des analyses morphométriques en

microscopie optique. Aussi, le Dr. Valentina Discepolo du laboratoire Jabri était responsable de la partie dédiée à la comparaison de la signature transcriptionnelle dépendante du gluten entre le modèle DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> et les patients cœliaques inclus dans notre recherche. Les analyses bio-informatiques résultantes ont été réalisées par le laboratoire du Dr. Luis Barreiro, principalement par Olivier Tastet et Mohamed Fahmy.

### 3.1 **Abstract**

Coeliac disease (CeD) is a complex, polygenic inflammatory enteropathy with autoimmune features caused by exposure to dietary gluten that occurs in a subset of genetically susceptible HLA-DQ8 and HLA-DQ2 individuals<sup>1-3</sup>. Attempts to develop a pathophysiologically relevant gluten- and HLA-dependent animal model that develops villous atrophy (VA) have failed. The need to develop non-dietary treatments for this common disorder is now widely recognized, but it is hampered by the lack of a preclinical model. Furthermore, while human studies have led to major advances in our understanding of CeD pathogenesis, direct demonstration of the respective roles of disease-predisposing HLA molecules, and adaptive and innate immunity in the development of tissue damage is missing. To address these unmet needs, we engineered a mouse model that reproduces the dual overexpression of IL-15 in the gut epithelium and the lamina propria (LP) characteristic of active CeD, expresses the predisposing HLA-DQ8 molecule, and develops VA upon gluten ingestion. We show that overexpression of IL-15 in both the epithelium and LP is required for the development of VA, demonstrating the location-dependent central role of IL-15 in CeD pathogenesis. Furthermore, our study reveals that CD4<sup>+</sup> T cells and HLA-DQ8 are required for VA development, because of their critical role in the licensing of cytotoxic T cells to mediate lysis of intestinal epithelial cells (IECs). Finally, it establishes that IFN- $\gamma$  and tissue transglutaminase 2 (tTGII) are central for tissue destruction. This mouse model, by reflecting the complex interplay between gluten, genetics and the IL-15-driven tissue inflammation found in CeD, represents a powerful preclinical model for the characterization of cellular circuits critically involved in intestinal tissue damage, and the identification and testing of new therapeutic strategies.

### **3.2 Introduction**

Organ-specific autoimmune disorders and CeD are complex immune-mediated disorders generally characterized by a strong MHC class II association and the destruction of specific tissue cell types. Subclinical forms such as latent autoimmune diabetes of the adult<sup>4</sup> and potential CeD<sup>5</sup> suggest that the presence of autoreactive and gluten-specific CD4<sup>+</sup> T cell responses are not sufficient to promote tissue destruction. This is further supported by animal models where induction of inflammatory antigen-specific beta-islet cells<sup>6</sup> or gluten-specific T cell responses<sup>7-9</sup> upon immunization with adjuvants and the driving pathogenic antigen are insufficient to induce tissue damage. In contrast to monogenic disease such as IPEX (Immunodysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked) syndrome, composite interplays between multiple genetic, environmental and host factors need to take place for the development of complex immune disorders. In particular, the cellular circuits and interactions driving tissue destruction remain to be defined.

CeD, an enteropathy induced by dietary gluten in HLA-DQ2 or HLA-DQ8 individuals, currently affects 1% of the global population<sup>10</sup>. Full-blown active CeD is characterized by the presence of small intestinal pathology associated with destruction of the gut epithelium, crypt hyperplasia, and a substantial infiltration of intraepithelial lymphocytes (IELs). CeD patients harbor HLA-DQ2 and HLA-DQ8 restricted gluten-specific T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-21 in the LP that are thought to be required for the production of disease-specific autoantibodies directed against tTGII and deamidated anti-gliadin antibodies (DGP)<sup>5,11,12</sup>. Currently, the only effective CeD treatment is a lifelong gluten-free diet (GFD)<sup>13</sup>. However, 30-40% of adult CeD patients fail to restore a completely normal intestinal morphology on a GFD<sup>13</sup>, and some develop major complications, such as refractory CeD, which is a cryptic intraepithelial lymphoma with

persistent VA<sup>14</sup>. Furthermore, the complete avoidance of gluten can be challenging and burdensome, explaining why compliance is often low<sup>15</sup>. This has led to the realization that alternative therapeutic options need to be developed<sup>16</sup> and has emphasized the need for a relevant HLA and gluten-dependent mouse model of CeD that recapitulates the intricacies of CeD pathogenesis. Despite significant advances of our understanding of CeD, a pathophysiologically mouse model of CeD that develops VA upon gluten feeding is still lacking<sup>17,18</sup>. Furthermore, the respective roles and interplay of IL-15, HLA molecules, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, and tTGII in CeD pathogenesis remain to be elucidated.

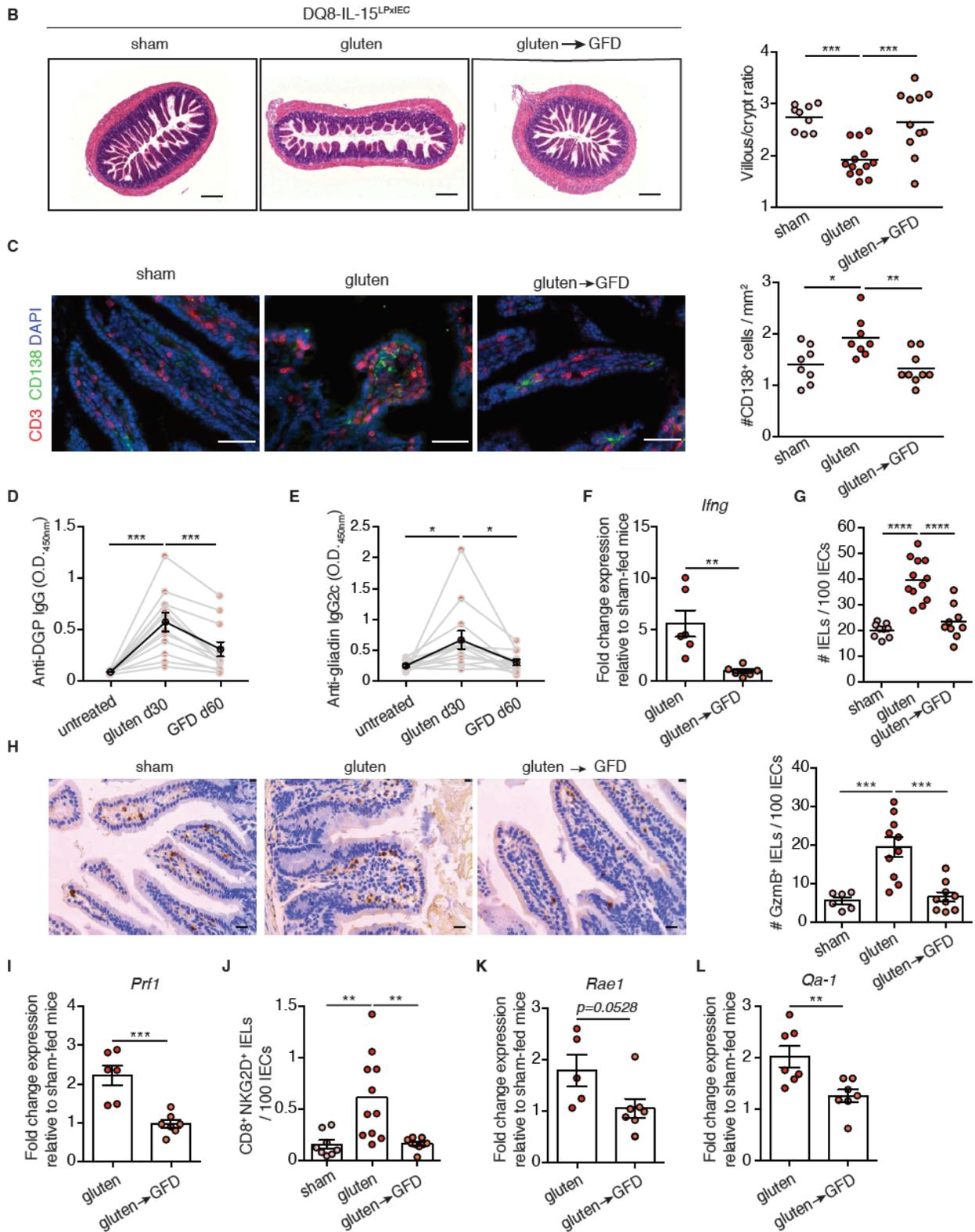
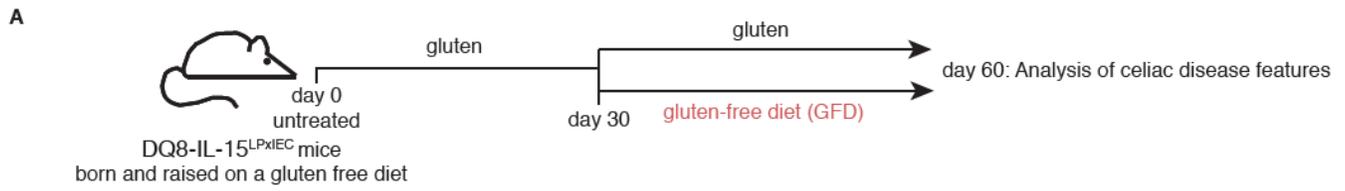
IL-15 is a proinflammatory cytokine induced under conditions of stress and inflammation that acts in a cell contact-dependent manner and is upregulated in organ-specific autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis and type 1 diabetes<sup>19</sup>. While IL-15 upregulation in the LP and mesenteric lymph nodes was shown to promote loss of oral tolerance and T-helper 1 (T<sub>H</sub>1) immunity to dietary antigens<sup>8</sup>, IL-15 upregulation in the epithelium was associated with an expansion of IELs and the upregulation of the activating NKG2D<sup>20</sup> and CD94/NKG2<sup>21</sup> receptors on IELs. In active CeD, IL-15 is upregulated in both the LP and in IECs. However, IL-15 upregulation in IECs is conspicuously absent in potential CeD patients who conserve a normal intestinal morphology despite exhibiting adaptive anti-gluten immunity<sup>22</sup>. In accordance with those potential CeD patients, DQ8-Dd-IL-15tg mice that overexpress IL-15 under the MHC class I promoter Dd, which drives IL-15 upregulation in the LP and mesenteric lymph nodes but not in IECs, developed T-helper 1 (T<sub>H</sub>1) immunity to dietary gluten but not VA<sup>8</sup>. To test the hypothesis that the development of VA requires IL-15 upregulation in IECs in combination with the loss of oral tolerance to gluten, we crossed the DQ8-Dd-IL-15tg mice (herein referred to as DQ8-IL-15<sup>LP</sup>) to villin-IL15tg (herein referred to as DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>) that express IL-15 under the villin promoter, which selectively drives expression in IECs<sup>23,24</sup>.

### 3.3 Results

In accordance with our hypothesis, while HLA-DQ8 mice failed to develop VA, approximately 75% of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice developed small intestinal tissue destruction upon 30 days of gluten feeding (**Extended Data Fig. 1A**). Importantly, the villous architecture was restored upon gluten exclusion (**Fig. 21A, B**). Furthermore, as in CeD patients, gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice developed plasmacytosis in the LP (**Fig. 21C and Extended Data Fig. 1B**). The presence of IgG antibodies against deamidated gliadin peptides (DGP) and anti-tTGII IgG and IgA antibodies are hallmarks of active CeD that are used for diagnosis of patients, the former being increasingly acknowledged as a more accurate serological marker for the diagnosis of CeD in children and IgA-deficient individuals<sup>5,25-27</sup>. We readily identified circulating anti-DGP IgG antibodies (**Fig. 21D and Extended Data Fig. 1C**). Even though there was not a strong correlation between titers and VA, the presence of high anti-DGP antibodies (O.D.<sub>450nm</sub>>0.8) was associated, as in humans, with the presence of VA<sup>5</sup> (**Extended Data Fig. 2A**). Despite our ability to detect IgA and tTGII colocalization in the small intestine (**Extended Data Fig. 2B**), we could not consistently detect anti-tTGII antibodies in the serum (**Extended Data Fig. 2C**). This may reflect the absence of a mouse homolog of the human VH5-51 gene segment that recognizes tTGII in its germline configuration<sup>28</sup>. Furthermore, as anticipated, we also detected native gliadin-specific IgG (**Extended Data Fig. 2D**) and IgA (**Extended Data Fig. 2E**) antibodies. The presence of circulating anti-gluten IgG2c antibodies (**Fig. 21E**) was indicative of gliadin-specific B cell activation by anti-gluten T<sub>H</sub>1 T cells. In accordance, IFN- $\gamma$ , the predominant cytokine associated with CeD in humans<sup>29</sup>, was upregulated in the LP of gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (**Fig. 21F**).

IELs expansion is a hallmark of CeD that is also used for the diagnosis of the disease<sup>5,30</sup>. Classically, intraepithelial cytotoxic T lymphocytes (IE-CTLs) in the coeliac

lesion express high levels of granzyme B and perforin<sup>22,31,32</sup>, and abnormally high surface expression of the activating NK receptors NKG2D and NKG2C/CD94, while lacking the inhibitory NKG2A/CD94<sup>20,33</sup>. The functional consequence of this surface NK receptor phenotype is the enhanced ability to kill cells bearing stress-induced MICA/B molecules and non-classical MHC class I molecule HLA-E, which are the main ligands for NKG2D and CD94/NKG2C, respectively<sup>20,33,34</sup>. DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice displayed a gluten- and IL-15-dependent expansion of IELs (**Fig. 21G and Extended Data Fig. 1D**), of which ten to fifty percent expressed IE-CTLs-associated cytotoxic molecules granzyme B (**Fig. 21H, Extended Data Fig. 1E-G and Extended Data Fig. 2F-H**) and perforin (**Fig. 21I**), and bear activating NKG2D (**Fig. 21J and Extended data Fig. 1H, I**), denoting their cytolytic potential. The acquisition of cytotoxic features by IELs was accompanied by the upregulation in the epithelium of the mouse NKG2D ligand, Rae-1 (mouse homolog of human MICA) (**Fig. 21K and Extended Data Fig. 1J**) as well as the non-classical MHC class I molecule Qa-1 (mouse ligand for CD94/NKG2 receptors) (**Fig. 21L**), which is recognized by NKG2C/CD94. Importantly, as seen in CeD patients<sup>11</sup>, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice developed adaptive anti-gluten immunity (**Fig. 21C-F, Extended Data Fig. 2B- E**), expansion of IE-CTLs with a killer phenotype (**Fig. 21G-J, Extended Data Fig. 1D-I, and Extended Data Fig. 2F-H**)), epithelial distress (**Fig. 21K-L and Extended Data Fig. 1J**) and tissue destruction (**Fig. 21B and Extended Data Fig. 1A**) in a gluten-dependent manner. Previous studies showed that OT-II TCR transgenic mice that express the TCR for ovalbumin in the context of IAb developed VA upon ovalbumin feeding only when they were crossed to IL-15tg mice that overexpress IL-15 under the intestine-specific promoter T3b35. The high frequency of dietary-antigen specific T cells and the high levels of epithelial IL-15 overexpression leading to the development of spontaneous VA at ten months of age suggest that, because critical checkpoints may be missing in this model, VA developed in a gluten-independent manner and in absence of the CeD-predisposing HLA molecules DQ2 or DQ8.

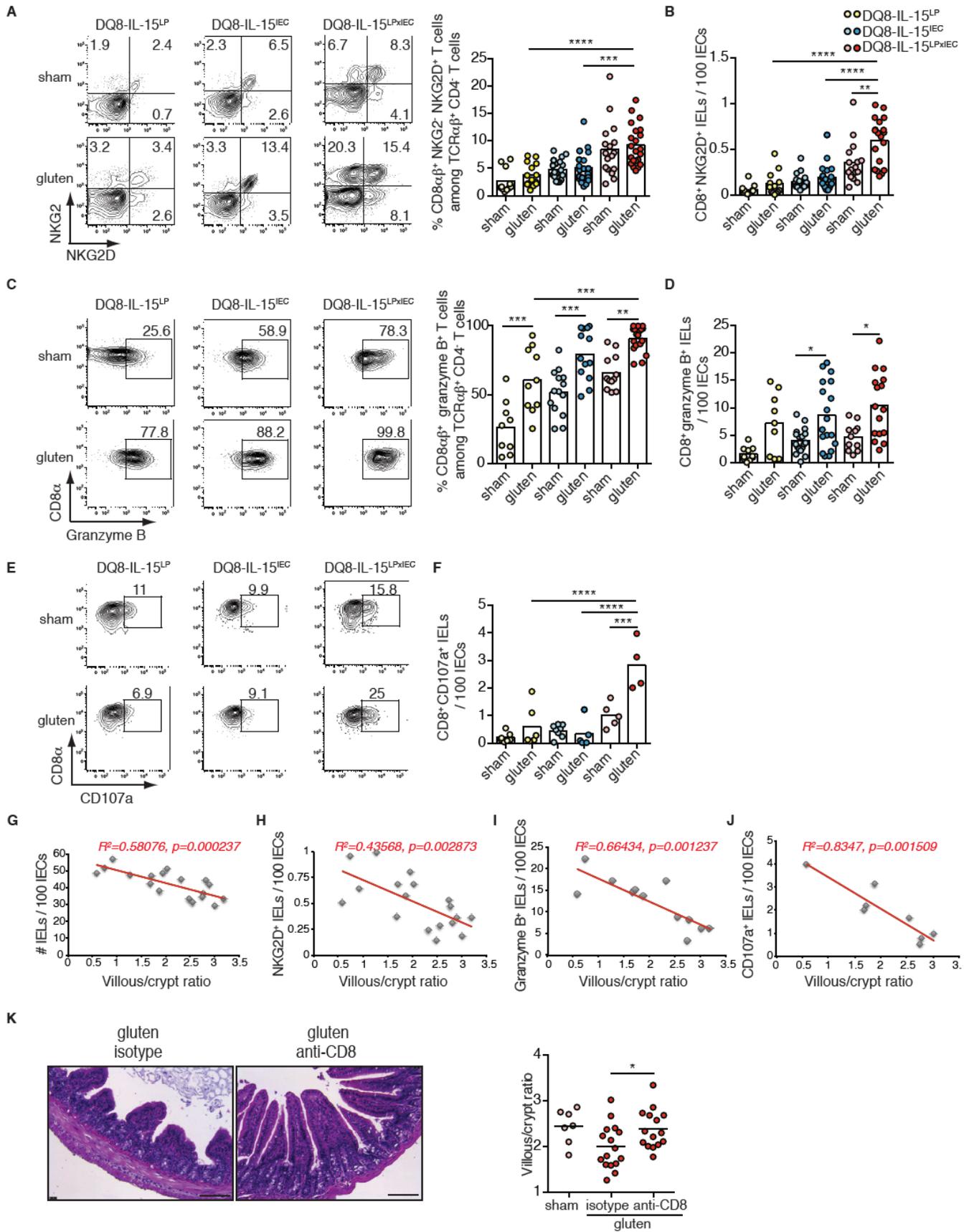


**Figure 21. DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice develop the hallmarks of CeD upon gluten feeding and recover on a GFD. (A-L)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a gluten-free diet (GFD) were maintained on a GFD (denoted “sham”), fed with gluten for 60 days (“gluten”), or fed with gluten for 30 days and then reverted to a GFD (“gluten→GFD”) for 30 days. **(A)** Experimental timeline. **(B)** Hematoxylin and eosin (H&E) staining of paraffin-embedded ileum sections. Scale bar, 200  $\mu$ m. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth (sham,  $n=9$  mice; gluten,  $n=13$  mice; gluten→GFD,  $n=11$  mice). **(C)** CD3 $\epsilon^+$  T cells (red) and CD138 $^+$  plasma cells (green) were distinguished by immunohistochemistry (IHC) staining of frozen ileum sections. Scale bar, 50  $\mu$ m. The graph depicts the number of CD138 $^+$  cells per section, normalized to lamina propria (LP) area (sham,  $n=8$  mice; gluten,  $n=8$  mice; gluten→GFD,  $n=9$  mice). **(D)** Serum anti-deamidated gliadin peptide (DGP) IgG levels were measured by ELISA. Sera were collected sequentially in the same mice ( $n=12$  mice) before gluten feeding (untreated), thirty days after gluten feeding (gluten d30), and thirty days after reversion to a GFD (GFD d60). The black line represents the average for each of the groups. **(E)** Serum anti-gliadin IgG2c levels were measured by ELISA as in (D) ( $n=12$  mice). **(F)** Expression of *IFN- $\gamma$*  in the LP was measured by qPCR. Relative expression levels in gluten ( $n=6$  mice) and gluten→GFD ( $n=6$  mice) groups were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. **(G)** Quantification of intraepithelial lymphocytes (IELs) among intestinal epithelial cells (IECs) was performed on H&E stained ileum sections (sham,  $n=8$  mice; gluten,  $n=12$  mice; gluten→GFD,  $n=9$  mice). **(H)** Granzyme B staining by IHC on paraffin-embedded ileum sections. Scale bar, 20  $\mu$ m. The graph depicts the average number of granzyme B $^+$  IELs / 100 IECs per mouse (sham,  $n=6$  mice; gluten,  $n=10$  mice; gluten→GFD,  $n=9$  mice). **(I)** Expression of *Prf1* in the intestinal epithelium was measured by qPCR. Analysis was performed as in (F) (gluten,  $n=6$  mice; gluten→GFD,  $n=7$  mice). **(J)** The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta^+$  CD4 $^-$  CD8 $^+$  cells. In parallel, IELs were quantified

among IECs on H&E stained ileum sections. NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (sham, *n*=8 mice; gluten, *n*=11 mice; gluten→GFD, *n*=9 mice). (K, L) Expression of *Rae1* (gluten, *n*=5 mice; gluten→GFD, *n*=7 mice) (K) and *Qa-1* (gluten, *n*=7 mice; gluten→GFD, *n*=7 mice) (L) in the intestinal epithelium as measured by qPCR. Analysis was performed as in (F). Data are representative of two to four independent experiments. Error bars, SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001; One-way analysis of variance (ANOVA) / Tukey's multiple comparison [(B-E), (G), (H)] and unpaired Student's *t*-test [(F), (I), (J), (K), (L)].

Studies in humans have suggested that adaptive T<sub>H</sub>1 anti-gluten immunity can take place independently from VA<sup>5,22,36-38</sup>. In agreement with this observation and our previous report<sup>8</sup>, DQ8-IL-15<sup>LP</sup> failed to develop VA (**Extended Data Fig. 3A**), despite mounting a T<sub>H</sub>1 anti-gluten immune response as assessed by the production of IFN- $\gamma$  (**Extended Data Fig. 3B**), the presence of anti-gluten IgG2c antibodies (**Extended Data Fig. 3C**), and anti-DGP antibodies (**Extended Data Fig. 3D**). In addition, similarly to CeD first degree relatives of family members overexpressing IL-15 in IECs in the absence of adaptive gluten immunity and VA<sup>22</sup>, DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> mice failed to develop VA and adaptive anti-gluten immunity, as assessed by the absence of anti-gluten IgG2c (**Extended Data Fig. 3C**) and anti-DGP antibodies (**Extended Data Fig. 3D**). Furthermore, analysis of the cytolytic phenotype of IE-CTLs concurred with the hypothesis that the combination of adaptive anti-gluten immunity and IL-15 overexpression in IECs is required for IE-CTLs to mediate tissue destruction by acquiring a fully activated killer phenotype<sup>11,22,39</sup>. More specifically, expansion of granzyme B<sup>+</sup> IE-CTLs expressing activating NK receptors in the absence of inhibitory CD94/NKG2A receptors (**Fig. 22A-D** and **Extended Data Fig. 3E-K**) as well as degranulation of IE-CTLs, as assessed by CD107 expression (**Fig. 22E, F**), was only observed in gluten-fed mice overexpressing IL-15 both in the LP and the epithelium. Finally, supporting the notion that IE-CTLs are the key effector cells mediating tissue destruction in CeD, the number of IE-CTLs with cytolytic functions correlated with the development of VA (**Fig. 22G-J**), and depletion of CD8<sup>+</sup> IE-CTLs in gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice was associated with a conservation of intestinal morphology (**Fig. 22K** and **Extended Data Fig. 4A-C**). Interestingly, upregulation of Rae-1 (**Extended Data Fig. 3L**) and Qa-1 (**Extended Data Fig. 3M**) occurred upon gluten exposure in mice overexpressing IL-15 either in the epithelium or in the LP. Furthermore, CD8<sup>+</sup> T cell depletion lead to a slight, but significant, reduction in Rae-1 (**Extended Data Fig. 4D**) and Qa-1 (**Extended Data Fig. 4E**) expression, suggesting a participation of IL-15 and IE-CTLs in the upregulation of specific tissue stress molecules. In contrast, CD8<sup>+</sup> T cell depletion had no impact on the adaptive gluten-specific

B cell response (**Extended Data Fig. 4F**). Taken together, these data demonstrate that IL-15 overexpression in IECs and in the LP need to synergize to activate IE-CTLs, thereby providing a mechanistic basis as to why potential CeD patients with adaptive anti-gluten immunity and family members with IL-15 overexpression in IECs do not develop VA. Finally, in line with HLA-DQ8 being prevalent in the general population while only 1% of individuals have CeD<sup>1</sup>, HLA-DQ8 transgenic mice fed with gluten failed to expand and activate IE-CTLs with a fully activated killer phenotype (**Extended Data Fig. 1D-I**) and hence to develop VA (**Extended Data Fig. 1A**).

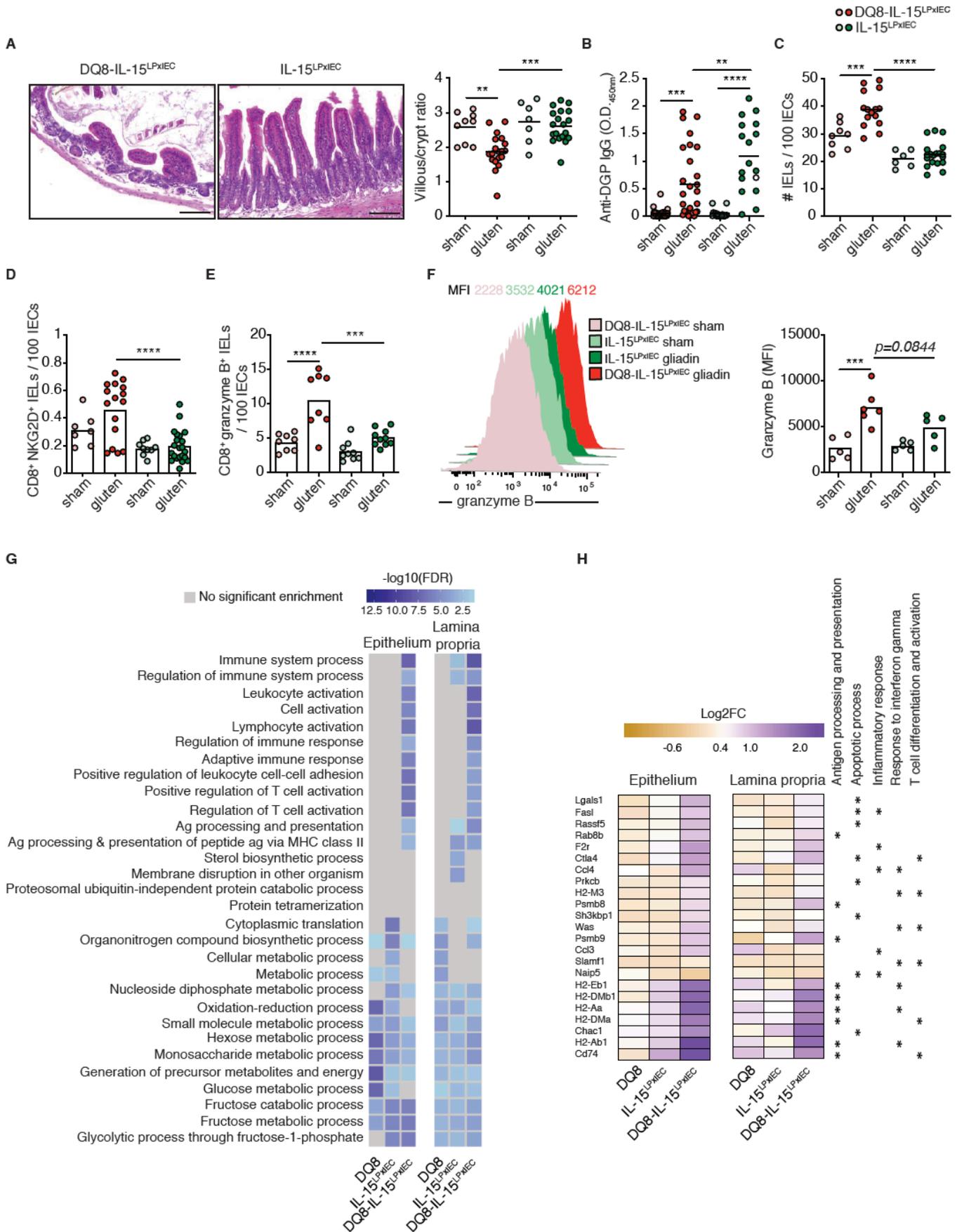


**Figure 22. IL-15 expression in both the LP and epithelium confers IELs with a cytotoxic phenotype and the ability to kill epithelial cells. (A-F)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LP</sup>, DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>, and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten). **(A-F)** The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. A subset of IELs was identified by flow as TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8αβ<sup>+</sup> cells. In parallel, total IELs were identified as TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells and quantified among IECs on H&E stained ileum sections. NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> CD8αβ<sup>+</sup> IELs are indicated by (A) percentage (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=14; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=20, gluten *n*=20; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=17, gluten *n*=22) and NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> IELs by (B) absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=13; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=20, gluten *n*=20; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=16, gluten *n*=19). Intracellular granzyme B<sup>+</sup> IELs are indicated by (C) percentage (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=10; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=14, gluten *n*=13; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=12, gluten *n*=18) and (D) absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=13; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=20, gluten *n*=20; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=16, gluten *n*=19). CD107a<sup>+</sup> IELs are indicated by (E) percentage and (F) absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=7, gluten *n*=6; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=8, gluten *n*=5; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=5, gluten *n*=4). **(G-J)** Correlations between the extent of villous atrophy determined by the analysis of the villous/crypt ratio and (G) the amount of IELs / 100 IECs, (H) the amount of IELs expressing NKG2D / 100 IECs, (I) the amount of IELs expressing granzyme B / 100 IECs, and (J) the amount of IELs expressing CD107a in sham and gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. **(K)** H&E staining of ileum sections of ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were fed with gluten for 30 days and concurrently treated with an anti-CD8 antibody or isotype control (treatment regimen and efficacy summarized in Extended Data Figure 4). Scale bar 100 μm. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height and crypt depth. [(A) to (D), and (H)] Data represent four independent experiments. [(E-G)] data represent three independent experiments. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001,

\*\*\*\*P < 0.0001; One-way ANOVA / Tukey's multiple comparison [(A) to (F) and (K)], and Pearson's correlation test [(G) to (J)].

CeD only occurs in individuals expressing HLA-DQ2 or HLA-DQ8 molecules and is characterized by the presence of HLA-DQ2 or HLA-DQ8 restricted gluten-specific T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-21<sup>11</sup> in the LP. In accordance with the human disease, IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that lacked HLA-DQ8 expression and were fed with gluten for 30 days, failed to develop VA (**Fig. 23A**). Importantly, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice both express the MHC class II Molecules I-Ab and only differ by the presence or absence of the CeD-predisposing HLA-DQ8 molecule (**Extended Data Fig. 5A**). Nevertheless, in line with previous studies<sup>8</sup>, HLA-DQ8 was not required for the development of serum IgG antibodies against DGP (**Fig. 23B**) (levels of antibodies were even slightly higher in IL-15<sup>LPxIEC</sup> as compared to DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice) or a T<sub>H</sub>1 inflammatory immune response in the LP (**Extended Data Fig. 5B**). Interestingly, the number of IELs and IE-CTLs expressing NKG2D (**Fig. 23C, D**) and granzyme B (**Fig. 23E**) was significantly lower in IL-15<sup>LPxIEC</sup> than in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. Furthermore, levels of granzyme B expression were also decreased, albeit not to a statistically significant level (**Fig. 23F**). In contrast, perforin, Qa-1 and Rae-1 expression were comparable (**Extended Data Fig. 5C-E**). Together, these results indicate that while HLA-DQ8 is dispensable for loss of tolerance to gluten, it is essential for the requisite increase in cytolytic IE-CTLs to mediate tissue destruction. To further decipher the role of HLA- DQ8, we conducted a comparative transcriptional analysis of total cells isolated from the epithelium of gluten-fed DQ8, IL-15<sup>LPxIEC</sup>, and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. This analysis revealed that a large number of pathways related to lymphocyte activation and antigen presentation were enriched in gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as compared to IL-15<sup>LPxIEC</sup> or DQ8 mice in both the LP and the epithelium (**Fig. 23G, H, and Dataset 1** for the entire list of gene ontology terms enriched in all strains among genes responding to gluten challenge). This suggests that the interplay between HLA-DQ8 and IL-15 contributes to optimal lymphocyte activation. Interestingly, a closer analysis of the differentially expressed genes (**Dataset 2** for the complete list) revealed that many CeD risk variants<sup>40</sup>, such as genes involved in antigen presentation (*Ciita*), T and B cell activation (*Ctla4*, *Icos*,

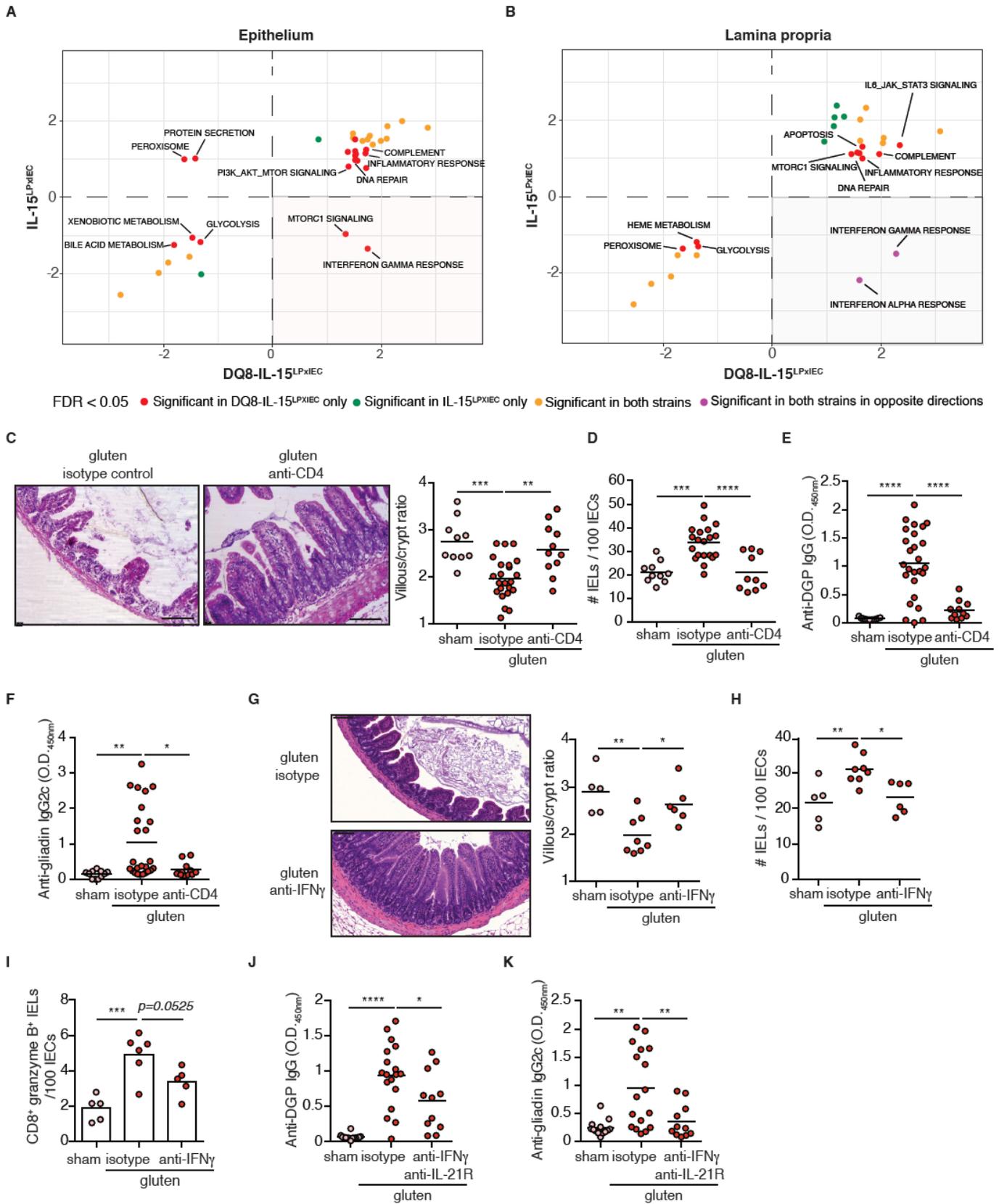
*Rgs1*) and cytotoxic function (*Klra7*), T<sub>H</sub>1 cell polarization (*Tbx21*) and inflammation (*Il18r1*) were most significantly upregulated in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice fed with gluten (Extended Data 5F).



**Figure 23. HLA-DQ8 is required to amplify gluten-specific adaptive immunity to the threshold required for tissue destruction. (A-I)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, IL-15<sup>LPxIEC</sup>, and DQ8 mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten). **(A)** H&E staining of paraffin-embedded ileum sections of gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and gluten-fed IL-15<sup>LPxIEC</sup>. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=9, gluten *n*=19; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=7, gluten *n*=19). Scale bar, 100  $\mu$ m. **(B)** Anti-DGP IgG levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=17, gluten *n*=28; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=17, gluten *n*=28). **(C)** Quantification of intraepithelial lymphocytes (IELs) among intraepithelial cells (IECs) was performed on H&E stained ileum sections (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=8, gluten *n*=15; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=6, gluten *n*=19). **(D,F)** The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells. **(D)** NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=8, gluten *n*=16; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=9, gluten *n*=22). **(E)** Granzyme B<sup>+</sup> IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=8, gluten *n*=8; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=9, gluten *n*=10). **(F)** Intracellular granzyme B mean fluorescence intensity (MFI) was measured (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=5, gluten *n*=6; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, sham *n*=5, gluten *n*=5). **(G)** Gene ontology terms significantly enriched among genes differently expressed in response to gluten challenge in DQ8, IL-15<sup>LPxIEC</sup>, and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. **(H)** Heatmap of genes showing a stronger response to gluten in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as compared to DQ8 and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. The colors reflect the magnitude of the response to gluten (in log<sub>2</sub> scale), and the stars highlight gene ontology terms associated with each of the genes plotted. Data are representative of six [(A-D)], four (E) or two (F) independent experiments. One-way ANOVA / Tukey's multiple comparison [(A) to (F)] \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\*\**P* < 0.0001.

In order to gain additional insights into putative new pathways involved in the development of VA, we performed gene set enrichment analysis (GSEA) against the “hallmark gene sets” that contain curated genes lists involved in well-defined biological processes. Most strikingly, whereas gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice up-regulated genes involved in interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) response in both the LP and the epithelium, these same genes were down-regulated in gluten-fed DQ8 and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (**Fig. 24 A, B and Extended Data Fig. 6**). This intriguing finding suggests that in the absence of HLA-DQ8, regulatory mechanisms preventing the IFN- $\gamma$  response may take place. Conversely, metabolic pathways such as glycolysis, bile acid metabolism, and peroxisome were most significantly downregulated in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> (**Fig. 24 A, B and Extended Data Fig. 6**). Taken together, these findings uncover a potential mechanistic basis for why CeD only develops in HLA-DQ2 or HLA-DQ8 individuals. Furthermore, depletion of CD4<sup>+</sup> T cells in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice during the course of gluten feeding (**Extended Data Fig. 7A-C**) prevented the development of VA (**Fig. 24C**), and the increase in IE-CTLs with a fully activated killer phenotype (**Fig. 24D and Extended Data Fig. 7D-F**). These results suggest that HLA-DQ8 does not play a role in the development of the T<sub>H</sub>1 anti-gluten response, but rather in promoting the CD4<sup>+</sup> T cell-dependent licensing of IE-CTLs to kill by critically enabling and enhancing IFN- $\gamma$  signaling pathways in the epithelium and the LP. Interestingly, CD4<sup>+</sup> T cells seem to play a role in the upregulation of Rae-1 (**Extended Data Fig. 7G**) but not Qa-1 (**Extended Data Fig. 7H**). In addition, as expected, CD4<sup>+</sup> T cells were required for the generation of anti-DGP and anti-gliadin IgG2c antibodies (**Fig. 24E, F and Extended Data Fig. 7I, J**). Because gluten-specific T cells produce IL-21 in addition of IFN- $\gamma$ <sup>41</sup>, we further evaluated the direct contribution of IFN- $\gamma$  and IL-21 to CeD pathogenesis using neutralizing antibodies. Strikingly, IFN- $\gamma$  (**Fig. 24G, H**), but not IL-21 (**Extended Data Fig. 8A, B**), was required for development of VA and expansion of IELs. In addition, IFN- $\gamma$  alone (**Fig. 24I**) or in combination with IL-21 promotes the expansion of granzyme B<sup>+</sup> IE-CTLs (**Extended Data Fig. 8C-E**). Finally, IFN- $\gamma$  and IL-21 may play a redundant role in the

generation of anti-DGP and anti-gliadin IgG2c antibodies, as only a concomitant neutralization of both cytokines significantly decreased the levels of these anti-gluten antibodies (**Fig. 24J, K, and Extended Data Fig. 8F-I**). These results, combined with the CD4<sup>+</sup> T cell depletion data, indicate that CD4<sup>+</sup> T cells play a key role in anti-DGP and anti-gluten IgG2c antibody responses through the production of IFN- $\gamma$  and IL-21, and in VA development through the production of IFN- $\gamma$  and the regulation of IE-CTLs. Furthermore, our results suggest that IL- 21 cooperates with IFN- $\gamma$  to expand IE-CTLs with a cytolytic phenotype.



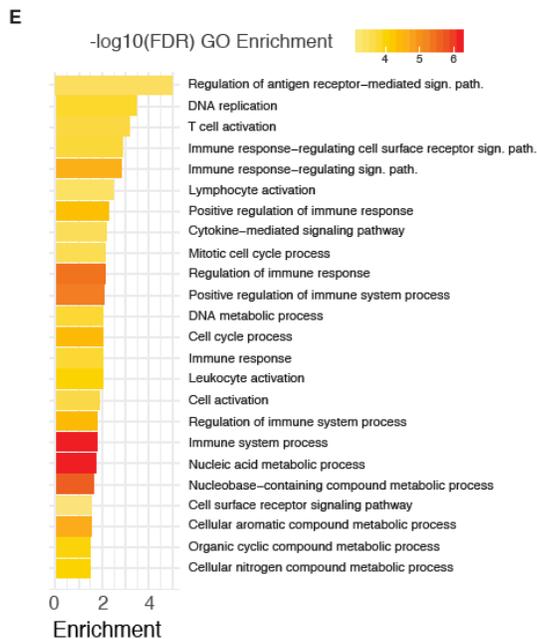
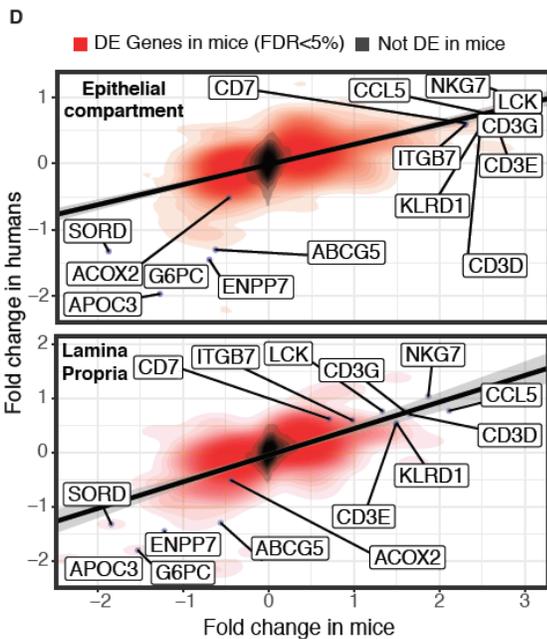
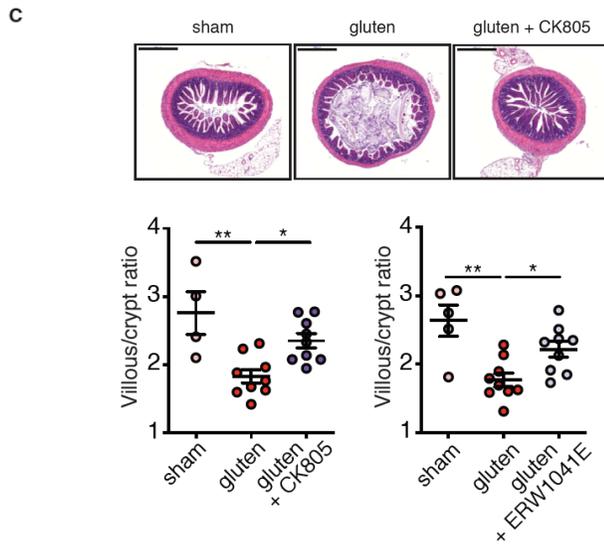
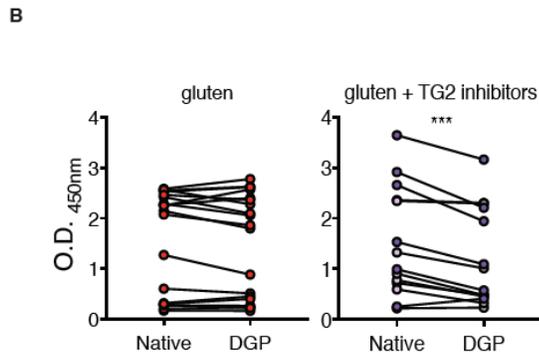
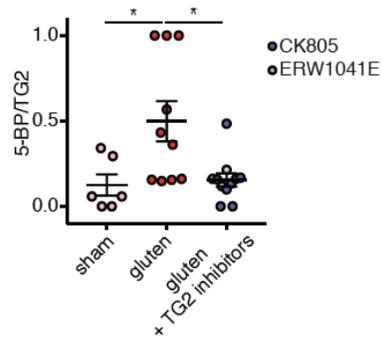
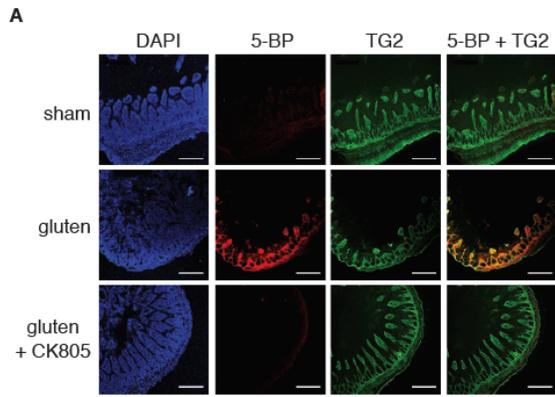
**Figure 24. CD4<sup>+</sup> T cells and IFN- $\gamma$  are critically involved in CeD pathogenesis. (A-B)** GSEA for gluten-responsive genes in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. We contrast the enrichment scores for DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> (x-axis) and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (y-axis) for all pathways enriched at an FDR <5% in at least of the strains, in the epithelium and the lamina propria. Positive and negative scores represent enrichments among genes that are more highly or lowly expressed in gluten-fed animals, respectively. The bottom right quadrant refers to pathways, notably IFN- $\gamma$ , that in response to gluten are up-regulated in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> but down-regulated in IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. IFN- $\gamma$  shows a reversed response to gluten when comparing DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> against DQ8 mice (Extended Data Figure 6). **(C-K)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten) and concurrently treated with an anti-CD4 antibody **(C-F)** (treatment regimen and efficacy summarized in Extended Data Figure 7), anti-IFN- $\gamma$  antibody **(G-I)**, anti-IFN- $\gamma$  and IL-21R antibodies together **(J, K)** or isotype controls. **(C)** H&E staining of paraffin-embedded ileum sections. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth. Scale bar, 100  $\mu$ m (sham,  $n=10$ ; gluten  $n=23$ ; gluten + anti-CD4,  $n=11$ ). **(D)** Quantification of intraepithelial lymphocytes (IELs) among intraepithelial cells (IECs) performed on H&E stained ileum sections (sham,  $n=10$ ; gluten  $n=20$ ; gluten + anti-CD4,  $n=10$ ). **(E)** Serum anti-DGP IgG levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (sham,  $n=11$ ; gluten  $n=26$ ; gluten + anti-CD4,  $n=11$ ). **(F)** Serum anti-gliadin IgG2c levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (sham,  $n=11$ ; gluten  $n=25$ ; gluten + anti-CD4,  $n=11$ ). **(G)** H&E staining of paraffin-embedded ileum sections. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth. Scale bar, 100  $\mu$ m (sham,  $n=5$ , gluten  $n=8$ , gluten + anti-IFN- $\gamma$ ,  $n=6$ ). **(H)** Quantification of IELs among IECs performed on H&E stained ileum sections (sham,  $n=5$ ; gluten  $n=8$ ; gluten + anti-IFN- $\gamma$ ,  $n=6$ ). **(I)** The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells. Granzyme B<sup>+</sup>

IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (sham,  $n=5$ , gluten + isotype,  $n=6$ , gluten + anti-IFN- $\gamma$ ,  $n=5$ ). (J) Serum anti-DGP IgG levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (sham,  $n=14$ ; gluten  $n=18$ ; gluten + anti-IFN- $\gamma$  + anti-IL-21R,  $n=11$ ). (K) Serum anti-gliadin IgG2c levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (sham,  $n=13$ ; gluten  $n=17$ ; gluten + anti-IFN- $\gamma$  + anti-IL-21R,  $n=11$ ). Data are representative of two [(G) to (I)] or four [(C) to (F) and (J) to (K)] independent experiments.  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; One-way analysis of variance (ANOVA) / Tukey's multiple comparison.

Through its enzymatic activity, tTGII increases the affinity of gluten peptides for HLA-DQ2 and HLA-DQ8 by deamidating specific Gln residues in these peptides to Glu<sup>42,43</sup>. The structural basis for the pathogenic relevance of this post-translational modification has been characterized<sup>44,45</sup>. tTGII is therefore thought to play a critical role in the pathogenesis of CeD by amplifying the anti-gluten T cell response in the context of HLA-DQ2 or HLA-DQ8 molecules. To evaluate the relevance of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as a preclinical model for drug development while also testing the hypothesis that tTGII is critical for the onset of VA, we first established that small intestinal tTGII is activated upon gluten feeding using 5-biotinamidopentylamine (5BP) as a probe to visualize catalytically active tTGII and two different pharmacological inhibitors of tTGII (ERW1041E and CK805) to inhibit its activity (**Fig. 25A**). The utility of these small molecules for monitoring tTGII activity in the mouse intestine has been described previously<sup>46,47</sup>. Co-administration of ERW1041E or CK805 with dietary gluten revealed that tTGII inhibition results in a decrease in antibody production against DGP but not against native gliadin peptides (**Fig. 25B**). Strikingly, and in accordance with the finding that HLA-DQ8 is necessary for the development of VA in mice overexpressing IL-15 in IEC and the LP, tTGII activation was also found to be critical for the development of VA (**Fig. 25C**). Taken together our observations support a synergistic role for tTGII and HLA-DQ8 in the development of VA, and suggest that tTGII constitutes a therapeutic target for the treatment of CeD.

To further evaluate the relevance of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as a preclinical model for CeD, we sought to directly compare the gluten-dependent transcriptional changes in the small intestines of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice with those observed in active CeD patients. We collected RNA-sequencing data from duodenal biopsies obtained from 51 CeD patients and 45 healthy controls. Strikingly, we found that the differences in gene expression between gluten-fed DQ8, and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were strongly correlated with the changes in gene expression observed between active CeD patients and healthy controls

(**Fig. 25D**,  $p < 1 \times 10^{-5}$  for both the epithelium and the LP). The most strongly enriched gene ontology terms among genes up-regulated in both gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and active CeD patients as compared to gluten fed-DQ8 mice and healthy controls, respectively, belonged to immune pathways related to T cell activation (FDR=2.0x10<sup>-4</sup>), and the regulation of antigen presentation (FDR=1.1x10<sup>-4</sup>) (**Fig. 25E**), in accordance with the critical role of adaptive immunity in CeD pathogenesis. Moreover, we found a strong concordance between the gene ontology terms enriched among genes induced by gluten challenge in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and genes that were differentially expressed between active CeD patients and healthy controls (**Extended Data Fig. 9A, B**). These observations indicate that similar gene regulatory mechanisms underlie the development of CeD in humans and in the DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mouse model, further highlighting DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as a promising preclinical model to test new therapeutics.



**Figure 25. DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice as a preclinical model for coeliac disease. (A-C)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham), fed with gluten for 30 days (gluten), or fed with gluten and administered active-site-directed transglutaminase 2 (tTGII) inhibitors ERW1041E or CK805 intraperitoneally twice daily (25 mg/kg) for 30 days (gluten + tTGII inhibitors). **(A)** tTGII protein (green) and tTGII enzymatic activity (red), as assessed by 5-biotinamidopentylamine (5-BP) crosslinking, were distinguished by IHC staining of frozen ileum sections. Scale bar, 200  $\mu$ m. The graph depicts a semiquantitative analysis of the intensity of tTGII activity (5-BP) staining relative to the intensity of total tTGII protein, with each point representing the relative tTGII activity of an individual mouse (sham,  $n=6$ ; gluten  $n=10$ ; gluten + tTGII inhibitors  $n=11$ ). **(B)** Serum anti-native gliadin peptides (native) and anti-deamidated gliadin peptide (DGP) IgG levels in gluten-fed mice dosed with tTGII inhibitors (gluten + tTGII inhibitors) or vehicle (gluten) were compared by ELISA (gluten  $n=17$ ; gluten + tTGII inhibitors  $n=13$ ). **(C)** Hematoxylin and eosin (H&E) staining of paraffin-embedded ileum sections. Scale bar, 200  $\mu$ m. The graphs depict the villous to crypt ratio (sham,  $n=4$ ; gluten  $n=9$ ; gluten + CK805  $n=9$ , left panel) and (sham,  $n=5$ ; gluten  $n=9$ ; gluten + ERW1041E  $n=9$ , right panel). Data represent three (A) or four independent experiments [(B, C)]. Error bars, SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Paired student's t test (D) and One-way ANOVA / Tukey's multiple comparison (E). **(D, E)** Transcriptional comparison of the intestinal epithelium and LP of gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and whole biopsies of active CeD patients. The figure shows the correlation of the effect sizes of the transcriptional differences observed between sham-fed and gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> (x-axis) against those observed between controls and active CeD patients (y-axis). The red density gradient shows the correlation among genes that are differentially expressed in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice fed with gluten. **(D)** Correlation between the log<sub>2</sub> fold-changes in gene expression between gluten-fed DQ8 and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (x-axis) in the epithelial compartment that encompass IELs and IECs (top panel) and the LP (bottom panel) and the log<sub>2</sub> fold-changes in gene expression

observed between active CeD patients and healthy controls. (E) Most strongly enriched gene ontology terms (FDR<0.1%) among genes up-regulated when comparing *both* gluten-fed DQ8 vs gluten-fed eDQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and active CeD patients vs healthy controls (defined as genes showing an FDR<0.01 in either the human or mice comparison & a nominal p-value < 0.05 in the other contrast). The x-axis depicts the fold-enrichment level observed and the color of the bars the statistical support for the observed enrichments (depicted in the form of  $-\log_{10}$  FDR).

### 3.4 Discussion

Our study presents the first pathophysiological animal model of CeD in which the ingestion of gluten in an immunocompetent host, in the absence of immunization with an adjuvant, promotes small intestinal VA in a gluten- and HLA-DQ8- dependent manner as seen in active CeD patients.

Studies in human and mice prompted us several years ago to propose a model of pathogenesis<sup>39,48</sup> in which IL-15 played a critical role<sup>19,49</sup>. The present study unambiguously confirms the key contribution of IL-15 to CeD pathogenesis, demonstrating that IL-15 needs to be overexpressed in both the IECs and the LP to activate distinct innate and adaptive immune pathways and promote the development of VA. Furthermore, it establishes that CD8<sup>+</sup> CTLs are the critical effector cell type mediating small intestinal IECs destruction. Interestingly, it also suggests that CTLs contribute to epithelial distress, but have no role in adaptive anti-gluten CD4<sup>+</sup> immunity. CeD occurs only in HLA-DQ2 or HLA-DQ8 individuals. Furthermore, HLA-DQ2 and HLA-DQ8 restricted gluten-reactive CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  and IL-21 are found in the intestinal mucosa of CeD patients but not healthy controls<sup>29,41,50</sup>. Our study provides proof and a mechanistic basis for the role of CD4<sup>+</sup> T cells in the development of VA by showing that they play a critical role in the expansion of IE-CTLs with a fully activated killer phenotype. It also reveals a critical role for IFN- $\gamma$  in IE-CTLs expansion and the development of VA. Finally, our study uncovers that CD4<sup>+</sup> T cells provide help to B cells for anti-gluten DGP and IgG2c antibody production<sup>51</sup>, through the production of both IFN- $\gamma$  and IL-21.

Our data show that VA develops in most (around 75%), but not all, gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice, and only when gluten, HLA-DQ8 and IL-15 are all present and work in concert. This finding is in line with the notion emerging from genome-wide association

studies<sup>52</sup>, that complex immune disorders like CeD do not develop from the functional defect of a single gene, but rather from the cumulative effect of small changes in gene expression across many immune-relevant genes. The observation that HLA-DQ8 is dispensable for loss of oral tolerance to gluten but not for VA emphasizes the notion that coeliac susceptible HLA molecules may be implicated in the development of VA through their role in the amplification of gluten-induced inflammatory immunity<sup>53,54</sup>. Indeed, HLA-DQ8 in cooperation with IL-15 and gluten enhanced pathways associated with T cell immunity and adaptive immune responses. Furthermore, HLA-DQ8 was found to be critical to drive the expression of genes involved in the IFN- $\gamma$  response in mice overexpressing IL-15 in the epithelium and the LP. These findings are also in keeping with the gene dosage effect observed for HLA allotypes in CeD<sup>55,56</sup>, and the capability of tTGII inhibitors to prevent development of VA in gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. Together, these observations support the concept that the magnitude of the T cell immune response plays a role in CeD pathogenesis. In summary, our study suggests that IL-15, HLA-DQ8, tTGII, CD4<sup>+</sup> T cells, CTLs and gluten cooperatively regulate CeD immunopathology to promote VA by up-regulating the IFN- $\gamma$  response and promoting the expansion of IE-CTLs with a fully activated cytolytic phenotype (**Extended Data Fig. 10**). It also underlines how CeD develops as the result of a complex interplay between multiple innate and adaptive immune pathways that culminates in tissue destruction and provides a mechanistic basis for the wide spectrum of clinical presentation of CeD<sup>57</sup>. The DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mouse model by recapitulating key immunological and transcriptional aspects and requirements of CeD, offers hence a unique opportunity for preclinical validation of novel therapeutic strategies.

## 3.5 Methods

### 3.5.1 Mice

Both male and female mice used in these studies are on the C57BL/6 background. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions at the University of Chicago and at the Sainte-Justine University Hospital Research Center. Importantly, no differences in the outcome of the experiments were observed between the two institutions, enabling pooling of the data. HLA-DQ8 transgenic mice (DQ8) and D<sup>d</sup>-IL-15tg mice expressing IL-15 under the minimal MHC class I D<sup>d</sup> promoter (IL-15<sup>LP</sup> in the present study) were previously described(242). Of note, D<sup>d</sup>-IL-15tg mice express IL-15 in all compartments, and in particular in the LP and mesenteric lymph nodes, but not in the epithelium. Villin-IL-15tg mice expressing IL-15 under the intestine-specific 9Kb villin promoter of IECs(361, 362) were crossed to HLA-DQ8 mice (DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> mice in the present study). IL-15<sup>LP</sup> mice were then crossed onto DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> mice to obtain the first generation DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. Next generations were obtained by backcrossing DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice with DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> mice. Finally, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were crossed to IL-15<sup>LP</sup> or IL-15<sup>IEC</sup> mice to obtain IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. All mice expressing HLA-DQ8 also express I-A<sup>b</sup> MHC class II molecules. All strains were maintained on a gluten-free chow (AIN76A, Envigo). For all experiments, mice were used at 10 weeks of age. All experiments were performed in accordance with the Institutional Biosafety Committee and the Institutional Care and Use Committee of the University of Chicago, and with the Canadian Council on Animal Care guidelines and the Institutional Committee for Animal Care in Research of the Sainte-Justine University Hospital Research Center.

### 3.5.2 Antibodies and flow cytometry

The following conjugated antibodies were purchased from eBioscience: TCR $\beta$  APC (H57-597), CD8 $\alpha$  APC-eFluor 780 (53-6.7), CD8 $\beta$  PE-Cy5 (eBioH35-17.2), CD314 (NKG2D) PE (CX5), NKG2AB6 PE (16a11), CD94 FITC (18d3), CD11c PE (N418). The following antibodies were purchased from BD Biosciences: CD4 PE-Cy7 (GK1.5), CD4 BV711 (GK1.5), CD103 APC (M290), NKG2A/C/E FITC (20d5), CD3 $\epsilon$  FITC (17A2), CD3 $\epsilon$  BUV737 (17A2), IgA FITC (C10-3), CD16/CD32 (Fc Block) (2.4G2). HLA-DQ8 PE (HLADQ81), CD11c BV421 (N418), CD3 $\epsilon$  PE/Cy7 (145-2c11), Ep-CAM PerCP/Cy5.5 (G8.8), F4/80(BM8), NK1.1(PK136) and CD45 Pacific Blue (30-F11) were purchased from Biolegend. Rae1 $\epsilon$  AF647 (FAB1135R) was purchased from R&D Systems. Granzyme B PE (GB12), I-A<sup>b</sup> FITC (M5/114.15.2), CD8 $\alpha$  APC-eFluor 780 (53-6.70), B220 PE-Cyanine7 (RA3-6B2) and LIVE/DEAD™ Fixable Violet Dead Cell Stain Kit were purchased from Thermo Fisher Scientific. Flow cytometry was performed with a BD LSRFortessa II cell analyzer (BD Biosciences) or BD FACSCanto II cell analyzer (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Treestar).

### 3.5.3 Epithelial, lamina propria, and mesenteric lymph nodes cell isolation

Epithelial cells including IELs and LP cells were isolated as previously described(363) using EDTA containing calcium-free media and collagenase VIII, respectively. For the analysis of the NK receptors by flow cytometry, cytotoxic molecules on IELs by flow cytometry and qPCR, and for the analysis of IFN- $\gamma$  on LP cells, a cell purification step using a 40% Percoll (GE Healthcare) was used to enrich lymphocyte cell populations. Briefly, PBS-washed epithelial and LP cells were resuspended in 10ml 40% Percoll solution then centrifuged for 30 minutes at 3000 x g. After removal of the supernatant, cells were washed in PBS and counted. Mesenteric lymph nodes were

dissected, made into a single cell suspension by mechanical disruption and passed through a 70µm nylon cell strainer (Corning).

#### 3.5.4 Gluten feeding and depletions

To study the response to dietary gluten, mice were transferred from a GFD to a standard rodent chow at the beginning of each experiment and allowed to consume the gluten-containing chow *ad libitum*. Additionally, supplemental gluten (20mg crude gliadin (Sigma-Aldrich) or 100µg peptic-tryptic digests of gliadin) was administered via intragastric gavage, every other day for thirty or sixty days, using a 22-gauge round-tipped needle (Cadence Science). To study the impact of reversion to a GFD, mice were fed with gluten for thirty days, then placed on a GFD until the end of the experiment.

In some experiments, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were injected i.p. before initiation of gluten feeding and every 4-5 days at the time of feeding and continuing until termination with 200µg or 400µg of anti-CD4 (GK1.5, rat IgG2b), or 200µg anti-CD8α (2.43.1, rat IgG2b) or corresponding isotype controls obtained from the Fitch Monoclonal Antibody Core Facility at the University of Chicago or purchased from BioXCell. In some experiments, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were injected i.p. once before initiation of gluten feeding and every 3 days over the course of feeding with 500µg of IFN-γ depleting antibody (XMG1.2) and/or an IL-21R blocking antibody (4A9) or corresponding isotype controls purchased from BioXCell.

#### 3.5.5 Preparation of CT-gliadin, PT-gliadin and DGP

CT-gliadin was prepared following a previously described protocol(95). To obtain DGP, CT-gliadin was dissolved in Tris-buffered saline (TBS) containing 10mM CaCl<sub>2</sub> and guinea pig liver transglutaminase (Zedira) and incubated for 2 hours at 37°C with

continuous shaking. The concentration of DGP was calculated based on the concentration of the CT-gliadin and the volume added during deamidation. Alternatively, in experiments to measure the effects of tTGII inhibition on anti-native gliadin and anti-DGP responses, CT-gliadin preparations were first dialyzed against 5 mM sodium phosphate, pH = 7.4 using dialysis tubing with a molecular weight cutoff of 1 kDa and then lyophilized to dryness. To obtain DGP, murine tTGII produced recombinantly in *E. coli* was incubated with the CT-gliadin preparations in 100 mM MOPS buffer, pH = 7.4 containing 5 mM CaCl<sub>2</sub> at a tTGII:gliadin ratio of 1:50 (weight/weight) for 1 hour at 37°. tTGII was quenched by boiling for 10 minutes, and the digests were dialyzed against 5 mM sodium phosphate, pH = 7.4 and lyophilized as described above. DGP concentration was determined by BCA assay. To obtain PT-gliadin, gliadin was digested in 0.2 N HCl (pH 1.8) with pepsin (Sigma) for 2h at 37°C. Once the pH was adjusted to 8.0, the digest was incubated with purified trypsin for 4h at 37°C, and thereafter with Cotazym (lipase from porcine pancreas Type II, Sigma) for 2h under constant stirring. The concentration of PT-gliadin was determined using a BCA assay (Pierce).

### 3.5.6 Anti-tTGII, anti-gluten and anti-DGP ELISA

Serum was harvested thirty or sixty days after mice received the first gliadin feeding. For anti-gluten IgG2c, IgG and IgA ELISA, high-binding ELISA 96-well plates (Nunc, Thermo-Scientific) were coated with 50 µl of 100 µg/ml CT-gliadin in 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> overnight at 4 °C. Plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and blocked with 200 µl of 2% BSA in PBS-T for 2 hours at room temperature. Serum was assessed in duplicate and at two dilutions, typically 1/50 and 1/200. Sera were incubated overnight at 4 °C and plates were washed three times with PBS-T. Anti-mouse Ig-horseradish peroxidase (HRP) (Southern Biotech) in blocking buffer was added to plates and incubated for 1 hour at room temperature. Plates were washed five times with PBS-

T. 50 µl HRP substrate TMB (Thermo-Scientific) was added and the reaction stopped by the addition of 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka Analytical). Absorbance was read at 450 nm on a Molecular Devices Versamax tunable microplate reader. For anti-DGP IgG ELISA, deamidated CT-gliadin was coated onto Immulon-2 HB ELISA plates (Thermo Scientific) at a concentration of 100µg/ml in 0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich) and incubated overnight at 4°C. Blocking buffer of 4% BSA/0.05% Tween-20 in PBS was used, and sera were diluted at 1/200 with a diluent of 0.1% BSA/0.05% Tween-20 in PBS. Biotinylated anti-mouse IgG and streptavidin-HRP (Both Jackson Immunoresearch) were used as the detection reagents. TMB (Sigma Aldrich) was used as the substrate and the reaction stopped by the addition of 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Fluka Analytical). Plates were then read at 450nm. Levels of anti-DGP IgG and anti-gliadin IgG, IgG2c, IgA were expressed in OD values.

### 3.5.7 Histology

Hematoxylin & Eosin staining was performed on 5µm thick sections of 10% formalin-fixed paraffin-embedded ileum. Slides were analyzed using a Leica DM 2500 microscope with a HC PLAN APO 20x/0.7 NA and a HCX PL APO 100x/1.40-0.70 objective or a Leica DMI8 microscope with a HC PL FLUOTAR L 20x/0.40 and a HC PL APO 40x/0.75 objective and equipped with the image processing and analysis software LasX (Leica). The villous height/crypt depth ratios were obtained from morphometric measurements of five well-oriented villi. The villous to crypt ratio was calculated by dividing the villous height by the corresponding crypt depth. Villous height was measured from the tip to the shoulder of the villous or up to the top of the crypt of Lieberkuhn. The crypt depth was measured as the distance from the top of the crypt of Lieberkuhn to the deepest level of the crypt. The intraepithelial lymphocyte count was assessed by counting the number of intraepithelial lymphocytes among at least 100 enterocytes. Additional 5µm sections were processed for immunohistochemical detection of Granzyme B. Slides were

deparaffinized, rehydrated, and washed in PBS. Sections were incubated in citrate buffer (1 M pH 6.0) for 20 min at 68 °C. Then the sections were permeabilized with 0.3% Triton X-100 at room temperature for 30 min. Endogenous peroxidase activity was quenched for 15 minutes with 2% hydrogen peroxide in PBS. Sections were blocked with normal donkey serum (Vector Laboratories) for 1 h and incubated with polyclonal Goat IgG anti-mouse Granzyme B (R&D Systems) for 2 hours at room temperature. Sections were then washed in PBS, incubated with biotinylated anti-goat IgG (Vector Laboratories) for 1 hour at room temperature, and stained using the avidin-biotin complex method (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories). Color was developed using 3,3'-diaminobenzidine (Dako Diagnostics) containing hydrogen peroxide. Slides were counterstained with Harris modified hematoxylin, dehydrated, cleared, mounted, and examined under light microscopy as described above.

### 3.5.8 Immunohistochemistry

Mice were euthanized and intestines were resected. Distal ileum pieces were snap-frozen in optimum cutting temperature (OCT) compound (Tissue-Tek) submerged in isopentane cooled with liquid nitrogen. Frozen tissues were cryosectioned (5 µm thickness) and sections were fixed for 10 min in acetone. Slides were sequentially rehydrated for 10 minutes in 1X PBS, treated for 30 min at room temperature with PBS containing 3% bovine serum albumin (BSA), and incubated for 1 hour at room temperature with Alexa Fluor 594 anti-mouse CD3 (17A2, rat IgG2b, Biolegend), purified anti-mouse CD138 (281-2, rat IgG2a, BD Biosciences), anti-mouse IgA-biotin (goat IgG, Southern Biotech), or anti-transglutaminase 2 (rabbit polyclonal, produced by Pacific Immunology as described before<sup>16</sup>) diluted in PBS containing 1% BSA. After three washes in PBS, slides were then incubated for 1 hour at room temperature with secondary antibody goat anti-rat IgG Alexa Fluor 488, goat anti-rat IgG Alexa Fluor 633, Alexa Fluor

594 streptavidin, or goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). For IgA staining, slides were blocked for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05% Tween-20 (TBS-T) and 3% BSA, and the antibodies were diluted in TBS-T containing 1% BSA. After three washes in PBS, slides were mounted with Fluoromount-G containing DAPI (Southern Biotech).

Plasma cells were quantified on stained frozen sections by counting the number of CD138<sup>+</sup> cells in the small intestinal LP. The small intestinal LP was demarcated by the presence of tTGII protein staining<sup>16,59</sup>, and the number of plasma cells was normalized to the total area measured on a per mouse basis. Counting was performed on at least 5 villi per mouse.

### 3.5.9 Quantification of IELs with cytotoxic properties

To perform our cytotoxic IELs determinations. By flow cytometry we have identified IELs with CD45 staining that encompasses all the lymphocyte subsets (excluding the epithelial cells). We next determined the amount of TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> among CD45<sup>+</sup> cells, and the amount of CD8<sup>+</sup> T cells expressing NKG2D among TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells. Hence the flow cytometry analysis allows us to obtain the frequency of CD8<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> cells among CD45<sup>+</sup> IELs. On Hematoxylin & Eosin stained slides, we have determined the total amount of IELs per 100 IECs. Hence, we performed the following calculation to approximate the absolute numbers of CD8<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> IELs/100 IECs: (% CD8<sup>+</sup> NKG2D<sup>+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> \* # IELs/100 IECs)/100

### 3.5.10 Visualization and quantification of tTGII protein and activity

5-biotinamidopentylamine (5-BP), a biotinylated tTGII substrate, was synthesized and characterized as reported<sup>60</sup>. 5-BP was dissolved in PBS, and was administered intraperitoneally (100 mg/kg, 2 doses) 3 and 6 hours prior to sacrifice, and tTGII protein and activity were quantified via immunohistochemistry according to established protocols<sup>16,59</sup>. The 5-BP/tTGII ratio was determined by averaging signals from at least three images per mouse. To facilitate comparison of data from the three independent experiments, the image with the maximum 5-BP/tTGII ratio from each experiment was assigned a value of one, whereas the image with the minimum 5-BP/tTGII ratio was assigned a value of zero. Values between these ratios were scaled linearly using the minimum-maximum normalization tool in GraphPad Prism 8.0.

### 3.5.11 tTGII inhibition

CK805 and ERW1041E were synthesized and characterized by previously published routes<sup>46</sup>. CK805 was formulated in 40% PBS, 40% PEG-4000, and 20% DMSO, and ERW1041E was formulated in 2.5% (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin, 2.0% Tween-80, 10% DMSO, and PBS, as described previously<sup>16</sup>. An initial dose of inhibitor (25 mg/kg, i.p.) was administered 12 hours prior to initiation of gluten feeding, and then every 12 hours during the course of the 30-day gluten feeding.

### 3.5.12 RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative real-time PCR

Total RNA isolation was performed on epithelial and LP cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). RNA concentration and quality were determined by UV spectrophotometry (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek). cDNA synthesis was performed using

qScript cDNA SuperMix (QuantaBio) according to the manufacturer's instructions. Expression analysis was performed in technical duplicate via quantitative real-time PCR on an Applied Biosystems® StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) with a Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Expression levels were quantified and normalized to Gapdh expression using the following murine primer pairs:

*Gapdh*: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3', 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'

*Ifng*: 5'-ATGAACGCTACACACTGCATC-3', 3'-TCTAGGCTTTCAATGACTGTGC-5'

*Qa1*: 5'- AACACACGGAGAGTCAAGGG-3', 3'-ATCAAGGCCATCATAGGCGAA-5'.

Expression analysis for murine GzmB, Prf1 and Rae1 was performed with TaqMan gene expression assays and normalized to Gapdh (Thermo Fisher Scientific). Relative gene expression levels were determined using the delta–delta Ct method to calculate the relative changes in gene expression relative to sham-fed mice.

### 3.5.13 Gene expression microarray

RNA from mouse samples was obtained as described above, quantified spectrophotometrically, and the quality was assessed with the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Only samples with no evidence for RNA degradation (RNA integrity number >8) were kept for further experiments. Genome-wide gene expression profiling of the epithelium and LP of five individual DQ8, DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were determined by using the MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChips from Illumina. Low-level microarray analyses were performed in R, using the Bioconductor software package lumi61. We first applied a variance stabilizing transformation to all arrays<sup>62</sup> and then

quantile normalized the data. After normalization, we removed probes with intensities indistinguishable from background noise (as measured by the negative controls present on each array).

#### 3.5.14 Identifying genes differentially expressed between mouse strains

To identify genes differently expressed between the different strains of mice, we used a linear modeling-based approach. Specifically, we used the Bioconductor limma package<sup>63</sup> to fit, for each gene, a linear model with individual treatment (i.e., gluten feeding), and mice strains as fixed effects. For each gene, we subsequently used the empirical Bayes approach of Smyth<sup>63</sup> to calculate a moderated t statistic and P value. We corrected for multiple testing using the false discovery rate (FDR) approach of Benjamini and Hochberg<sup>64</sup>.

#### 3.5.15 Patients

One duodenal biopsy was obtained from ninety-six individuals undergoing upper gastrointestinal endoscopy during diagnostic work-up at the University of Chicago Medicine and at Mayo Clinic, including forty-five non-coeliac controls and fifty-one untreated CeD patients (active CeD) for subsequent RNA-sequencing. Control subjects included 29 females and 16 males and underwent upper gastrointestinal endoscopy during a diagnostic work-up for anemia, failure to thrive or other intestinal disorders not associated with CeD. All controls had normal small intestinal histology, no family history of CeD, and no significant levels of anti-tTGII IgA antibodies in the serum. Active CeD patients included 31 females and 20 males; all had positive anti-tTGII antibodies and small intestinal enteropathy with increased infiltration of IELs, crypt hyperplasia and villous atrophy, according to currently accepted diagnostic guidelines<sup>5</sup>. Each subject signed an

informed consent as provided by the Institutional Review Board of each institution (IRB-12623B for the University of Chicago and IRB-1491-03 for Mayo Clinic).

### 3.5.16 RNA-sequencing on gut biopsies from control and coeliac disease patients

A single duodenal biopsy fragment was directly submerged in RNA-later (QIAGEN), kept at 4°C for 24 hours and then frozen at -80°C upon RNA later removal until processing. Defrost tissues were homogenized using magnetic beads and a Cell Tissue Homogenizer (Bullet blender by *Next Advance*) and RNA was extracted using RNeasy columns (QIAGEN). RNA integrity was assessed by Bioanalyzer (Agilent). All included samples showed RNA integrity number (RIN) above 8. RNA-sequencing libraries were prepared using the SMARTer® Stranded Total RNA Sample Prep Kit-HI Mammalian by Clontech Laboratories (Takara), according to manufacturer's instructions. Library quality was checked by Bioanalyzer (Agilent) prior to pooling and sequencing. Indexed cDNA libraries were pooled in equimolar amounts and sequenced with single-end 50bp reads with a high output Flow Cell (8 lane flow cell) on an Illumina HiSeq4000 at the University of Chicago Genomic Facility.

Adaptor sequences and low-quality score bases (Phred score < 20) were first trimmed using Trim Galore (version 0.2.7). The resulting reads were then mapped to the human genome reference sequence (Ensembl GRCh37 release 75) using Kallisto v0.43.065 with a GRCh38 transcript annotation GTF file downloaded from Ensembl rel 87. Gene expression was normalized across samples using the weighted trimmed mean of M-values algorithm (TMM), as implemented in the R package edgeR<sup>66</sup>. After normalization, we log-transformed the data using the voom function in the limma package<sup>67</sup>. For all downstream analyses, we excluded non-coding and low expressed genes with a median read count lower than 20 in all samples. Following this pre-processing of the data, we

fitted the log-transformed expression estimates to linear models using the lmFit function from the limma package<sup>67</sup> to look at differences in gene expression between control and coeliac disease patients, while considering variation in sex and age of the donors. Gene ontology enrichment analysis were performed in Gorilla<sup>68</sup>. We corrected for multiple testing using the //FDR approach of Benjamini and Hochberg<sup>64</sup>.

### 3.5.17 Gene set enrichment analyses

Gene set enrichment analyses (GSEA) were ran using the javaGSEA Desktop application by the Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp> version 3.0) against the “Hallmark gene sets” from the Molecular Signatures Database collection. The GSEA pre-rank mode was used ranking genes according to t statistics for differences in gene expression between sham- and gluten-fed mice (for all three strains separately). The t statistics captures both the significance level and the direction of the effects: large positive and negative values will refer to genes showing a significantly higher or low expression in gluten-fed animals as compared to sham- fed, respectively. The complete results of these analyses are shown in Dataset 2.

### 3.5.18 Statistical Analysis

Tests were performed as indicated in figure legends using GraphPad Prism. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. The statistical test used, and p values are indicated in each figure legend. P values of  $< 0.05$  were considered to be statistically significant. \*P  $< 0.05$ , \*\*P  $< 0.01$ , \*\*\*P  $< 0.001$  and \*\*\*\*P  $< 0.0001$ . Statistically significant differences have been selectively marked.

### 3.6 References

- 1 Abadie, V., Sollid, L. M., Barreiro, L. B. & Jabri, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29, 493-525 (2011).
- 2 Green, P. H. & Cellier, C. Celiac disease. *N Engl J Med* 357, 1731-1743 (2007).
- 3 Tjon, J. M., van Bergen, J. & Koning, F. Celiac disease: how complicated can it get? *Immunogenetics* 62, 641-651 (2010).
- 4 Chen, J. et al. Insulin-dependent diabetes induced by pancreatic beta cell expression of IL-15 and IL-15 $\alpha$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 13534-13539 (2013).
- 5 Husby, S. et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54, 136-160 (2012).
- 6 Lang, K. S. et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* 11, 138-145 (2005).
- 7 de Kauwe, A. L. et al. Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 182, 7440-7450 (2009).
- 8 DePaolo, R. W. et al. Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature* 471, 220-224 (2011).
- 9 Marietta, E. et al. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest* 114, 1090-1097 (2004).
- 10 Singh, P. et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 16, 823-836 e822 (2018).
- 11 Jabri, B. & Sollid, L. M. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol* 9, 858-870 (2009).

- 12 Sollid, L. M. & Jabri, B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol* 13, 294-302 (2013).
- 13 Rubio-Tapia, A. et al. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 105, 1412-1420 (2010).
- 14 Rubio-Tapia, A. & Murray, J. A. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut* 59, 547-557 (2010).
- 15 Leffler, D. A. et al. Factors that influence adherence to a gluten-free diet in adults with celiac disease. *Dig Dis Sci* 53, 1573-1581 (2008).
- 16 Plugis, N. M. & Khosla, C. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29, 503-521 (2015).
- 17 Korneychuk, N., Meresse, B. & Cerf-Bensussan, N. Lessons from rodent models in celiac disease. *Mucosal Immunol* 8, 18-28 (2015).
- 18 Costes, L. M., Meresse, B., Cerf-Bensussan, N. & Samsom, J. N. The role of animal models in unravelling therapeutic targets in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29, 437-450 (2015).
- 19 Jabri, B. & Abadie, V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol* 15, 771-783 (2015).
- 20 Meresse, B. et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21, 357-366 (2004).
- 21 Jabri, B. et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E- specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology* 118, 867-879 (2000).
- 22 Setty, M. et al. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology* 149, 681-691 (2015).

- 23 Meisel, M. et al. Interleukin-15 promotes intestinal dysbiosis with butyrate deficiency associated with increased susceptibility to colitis. *ISME J* 11, 15-30 (2017).
- 24 Pinto, D., Robine, S., Jaisser, F., El Marjou, F. E. & Louvard, D. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem* 274, 6476-6482 (1999).
- 25 Mozo, L., Gomez, J., Escanlar, E., Bousono, C. & Gutierrez, C. Diagnostic value of anti- deamidated gliadin peptide IgG antibodies for celiac disease in children and IgA-deficient patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 55, 50-55 (2012).
- 26 Mesin, L., Sollid, L. M. & Di Niro, R. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Front Immunol* 3, 313 (2012).
- 27 Dieterich, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 3, 797-801 (1997).
- 28 Di Niro, R. et al. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med* 18, 441-445 (2012).
- 29 Nilsen, E. M. et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 115, 551-563 (1998).
- 30 Jarvinen, T. T. et al. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 98, 1332-1337 (2003).
- 31 Oberhuber, G. et al. Evidence that intestinal intraepithelial lymphocytes are activated cytotoxic T cells in celiac disease but not in giardiasis. *Am J Pathol* 148, 1351-1357 (1996).
- 32 Ciccocioppo, R. et al. Cytolytic mechanisms of intraepithelial lymphocytes in coeliac disease (CoD). *Clin Exp Immunol* 120, 235-240 (2000).

- 33 Meresse, B. et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med* 203, 1343-1355 (2006).
- 34 Hue, S. et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21, 367-377 (2004).
- 35 Korneychuk, N. et al. Interleukin 15 and CD4(+) T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology* 146, 1017-1027 (2014).
- 36 Collin, P., Helin, H., Maki, M., Hallstrom, O. & Karvonen, A. L. Follow-up of patients positive in reticulin and gliadin antibody tests with normal small-bowel biopsy findings. *Scand J Gastroenterol* 28, 595-598 (1993).
- 37 Kaukinen, K. et al. Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol* 40, 564-572 (2005).
- 38 Paparo, F. et al. Clinical, HLA, and small bowel immunohistochemical features of children with positive serum antiendomysium antibodies and architecturally normal small intestinal mucosa. *Am J Gastroenterol* 100, 2294-2298 (2005).
- 39 Jabri, B. & Sollid, L. M. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 516-525 (2006).
- 40 Dubois, P. C. et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 42, 295-302 (2010).
- 41 Bodd, M. et al. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol* 3, 594-601 (2010).
- 42 van de Wal, Y. et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 161, 1585-1588 (1998).
- 43 Molberg, O. et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4, 713-717 (1998).

- 44 Henderson, K. N. et al. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* 27, 23-34 (2007).
- 45 Kim, C. Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C. & Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4175-4179 (2004).
- 46 Klock, C., Herrera, Z., Albertelli, M. & Khosla, C. Discovery of potent and specific dihydroisoxazole inhibitors of human transglutaminase 2. *J Med Chem* 57, 9042- 9064 (2014).
- 47 Plugis, N. M., Palanski, B. A., Weng, C. H., Albertelli, M. & Khosla, C. Thioredoxin-1 Selectively Activates Transglutaminase 2 in the Extracellular Matrix of the Small Intestine: IMPLICATIONS FOR CELIAC DISEASE. *J Biol Chem* 292, 2000-2008 (2017).
- 48 Jabri, B. & Sollid, L. M. T Cells in Celiac Disease. *J Immunol* 198, 3005-3014 (2017).
- 49 Meresse, B., Malamut, G. & Cerf-Bensussan, N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity* 36, 907-919 (2012).
- 50 Molberg, O. et al. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol* 46, 103-109 (1997).
- 51 Spencer, J. & Sollid, L. M. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol* 9, 1113-1124, doi:10.1038/mi.2016.59 (2016).
- 52 Withoff, S., Li, Y., Jonkers, I. & Wijmenga, C. Understanding Celiac Disease by Genomics. *Trends Genet* 32, 295-308 (2016).
- 53 Hovhannisyan, Z. et al. The role of HLA-DQ8 beta57 polymorphism in the anti-gluten T- cell response in coeliac disease. *Nature* 456, 534-538 (2008).

- 54 Sollid, L. M., Qiao, S. W., Anderson, R. P., Gianfrani, C. & Koning, F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* 64, 455-460 (2012).
- 55 Ploski, R., Ek, J., Thorsby, E. & Sollid, L. M. On the HLA-DQ(alpha 1\*0501, beta 1\*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1\*0201. *Tissue Antigens* 41, 173-177 (1993).
- 56 Karell, K. et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 64, 469-477 (2003).
- 57 Marsh, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102, 330-354 (1992).
- 58 Lefrancois, L. & Lycke, N. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr Protoc Immunol* Chapter 3, Unit 3 19 (2001).
- 59 Bouziat, R. et al. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science* 356, 44-50 (2017).
- 60 DiRaimondo, T. R. et al. Elevated transglutaminase 2 activity is associated with hypoxia- induced experimental pulmonary hypertension in mice. *ACS Chem Biol* 9, 266-275 (2014).
- 61 Du, P., Kibbe, W. A. & Lin, S. M. lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics* 24, 1547-1548 (2008).
- 62 Lin, S. M., Du, P., Huber, W. & Kibbe, W. A. Model-based variance-stabilizing transformation for Illumina microarray data. *Nucleic Acids Res* 36, e11 (2008).
- 63 Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3, Article3 (2004).

- 64 Benjamini, Y. H., Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc* 57, 289-300 (1995).
- 65 Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol* 34, 525-527 (2016).
- 66 Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139-140 (2010).
- 67 Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47, doi:10.1093/nar/gkv007 (2015).
- 68 Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D. & Yakhini, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 10, 48 (2009).

### **3.7 Acknowledgments**

We thank patients with coeliac disease and their family members, as well as the University of Chicago Coeliac Disease Center, for supporting our research. We thank Charlotte Zaouter from BZ- Histo Services Inc. (Montreal, Quebec, Canada) for her technical assistance with the histological processing of intestinal samples. We also thank the Human Tissue Resource Center and the Integrated Light Microscopy Core Facility at the University of Chicago. This work was supported by grants from NIH: R01 DK67180 and R01 DK63158, and Digestive Diseases Research Core Center P30 DK42086 at the University of Chicago as well as by funding from F. Oliver Nicklin associated with the First Analysis Institute of Integrative Studies and the Regenstein Foundation to B.J., from the CIHR (catalyst grant in environments, genes, and chronic disease) to V.A. and L.B.B., the SickKids Foundation (NI15-040) and the Canadian Coeliac Association to V.A., from NIH: R01 DK063158 and R01 DK100619 to C.K., award from the Wallonie-Bruxelles International-World Excellence and from FRQNT to T.L., The “Carlino Fellowship for Coeliac Disease Research” from the University of Chicago Coeliac Disease Center supported V.D.

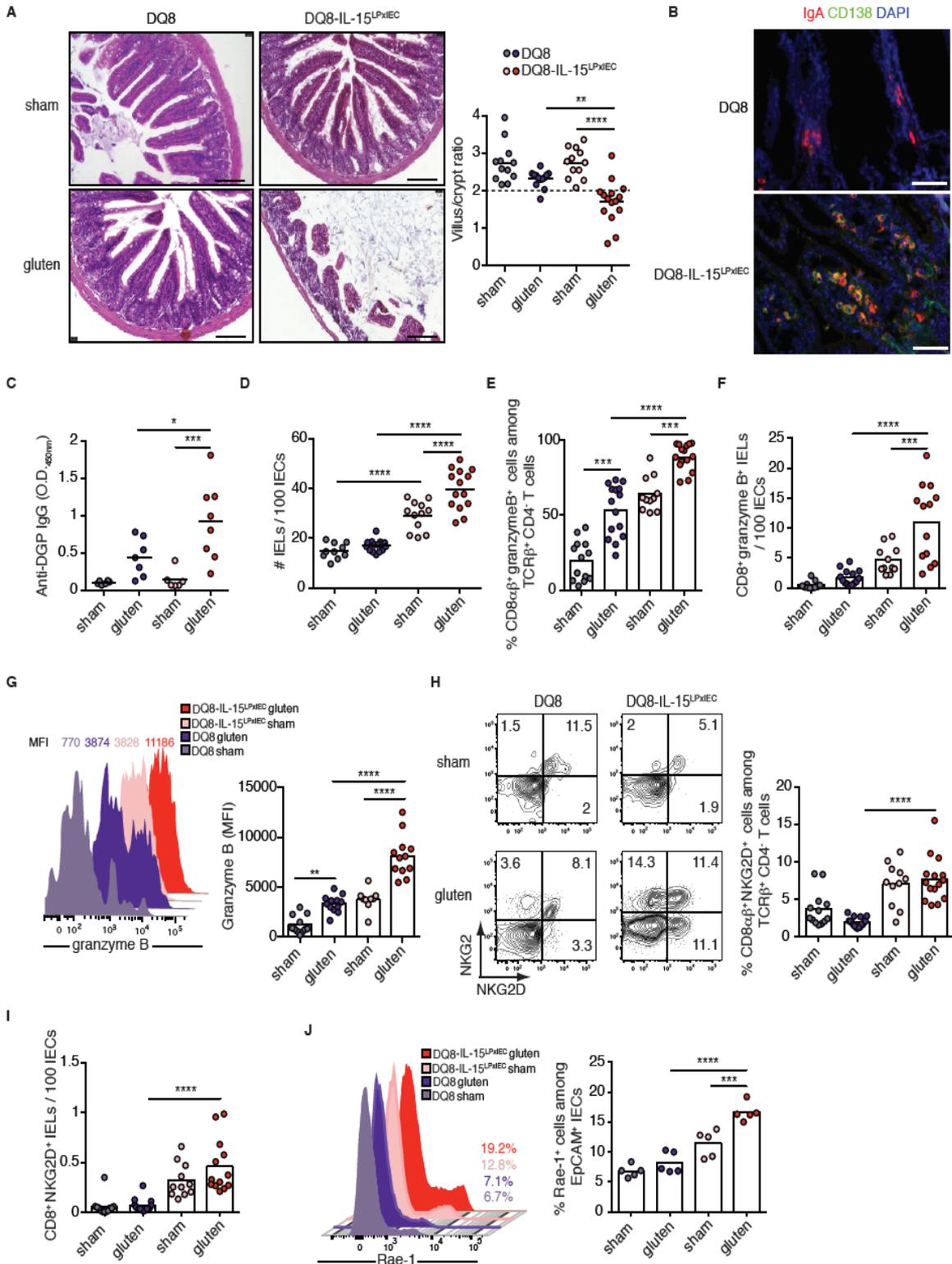
### **3.8 Author contributions**

V.A. and B.J. designed the research and supervised all investigations. S.M.K, T.L., J.D.E., B.A.P., C.C., J.V., R.B., M.A.Z., A.D., V.Y. and V.A. performed experiments and analyzed the data. V.D. and I.L. performed the human RNA-seq. experiment. E.V.M. and I.H. undertook serology experiments. O.T., J.C.G., M.F. and L.B.B. performed the computational analysis. C.K., J.A.M. and L.B.B. provided intellectual input and technical support. V.A. and B.J. wrote the manuscript with the contribution of S.M.K., T.L., B.P., and C.K. All authors provided critical review of the manuscript.

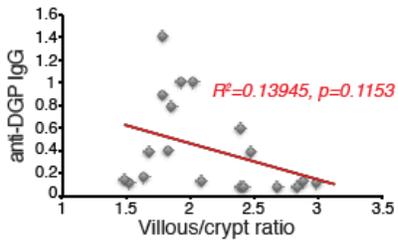
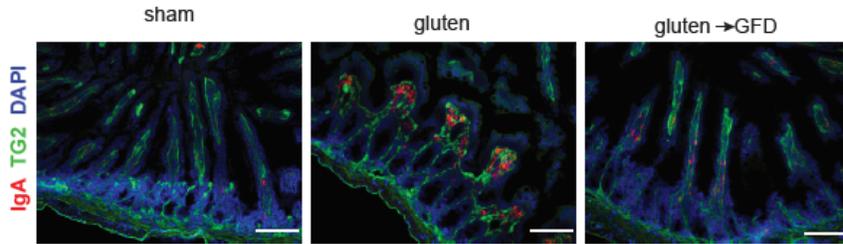
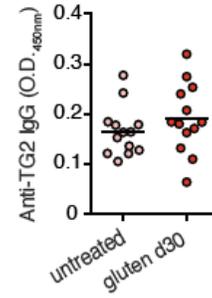
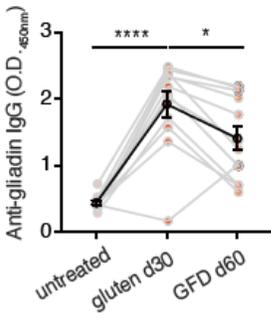
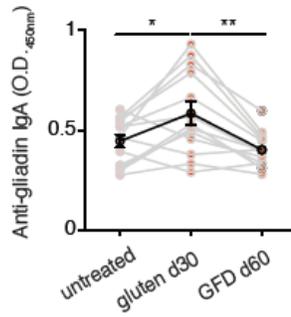
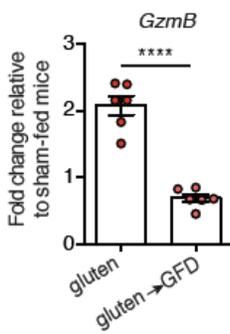
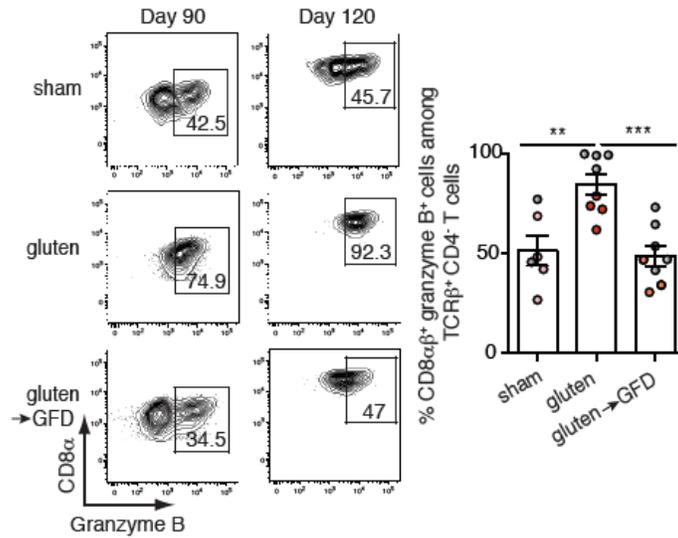
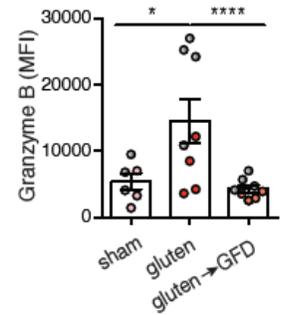
### **3.9 Competing interests**

The authors declare no competing financial interests. B.J. and J.A.M. have been consultants to Celimmune and Bionix. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.A. ([vabadie@medicine.bsd.uchicago.edu](mailto:vabadie@medicine.bsd.uchicago.edu)) and B.J. ([bjabri@bsd.uchicago.edu](mailto:bjabri@bsd.uchicago.edu)).

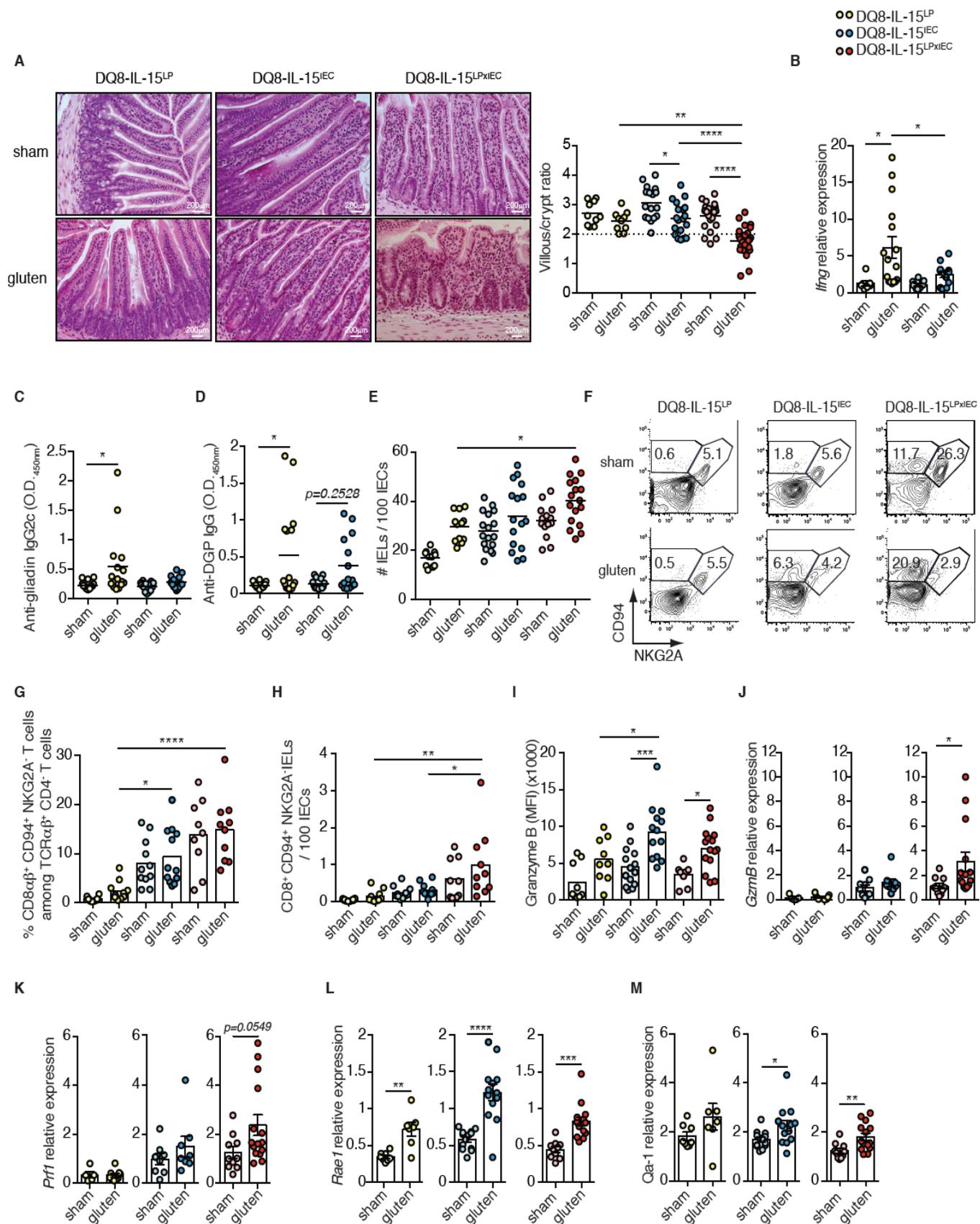
### 3.10 Extended Data Figures



**Extended Data Figure 1. Overexpression of IL-15 in HLA-humanized DQ8 mice confers susceptibility to development of coeliac disease-like features in a gluten-dependent manner.** (A-J) Ten-week old DQ8 and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten). (A) H&E staining of paraffin-embedded ileum sections. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth (DQ8 sham, *n*=12, gluten *n*=13; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=12, gluten *n*=15). Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) IgA (red) and CD138<sup>+</sup> plasma cells (green) were distinguished by immunohistochemistry (IHC) staining of frozen ileum sections. (C) Serum anti-deamidated gliadin peptides (DGP) IgG levels as measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (DQ8 sham, *n*=6, gluten *n*=7; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=6, gluten *n*=7). (D) Quantification of intraepithelial lymphocytes (IELs) among intraepithelial cells (IECs) was performed on H&E stained ileum sections (DQ8 sham, *n*=10, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=12, gluten *n*=14). (E-I) The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> and TCR $\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8 $\alpha$  $\beta$ <sup>+</sup> cells. Granzyme B<sup>+</sup> IELs are indicated by (E) percentage (DQ8 sham, *n*=13, gluten *n*=15; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=15), (F) absolute number / 100 IECs (DQ8 sham, *n*=11, gluten *n*=14; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=13), and (G) MFI (DQ8 sham, *n*=11, gluten *n*=12; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=12). NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> IELs are indicated by (H) percentage (DQ8 sham, *n*=13, gluten *n*=17; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=15) and (I) absolute number / 100 IECs (DQ8 sham, *n*=12, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=13). (J) The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. Intestinal epithelial cells (IECs) were identified as EpCAM<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> cells. Rae1 $\epsilon$ <sup>+</sup> IECs are indicated by percentage (*n*=5 mice per group). Data are representative of two [(C) and (J)] and four independent experiments [(A), (D), (E), (F), (G), (H), (I)]. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001; One-way ANOVA / Tukey's multiple comparison.

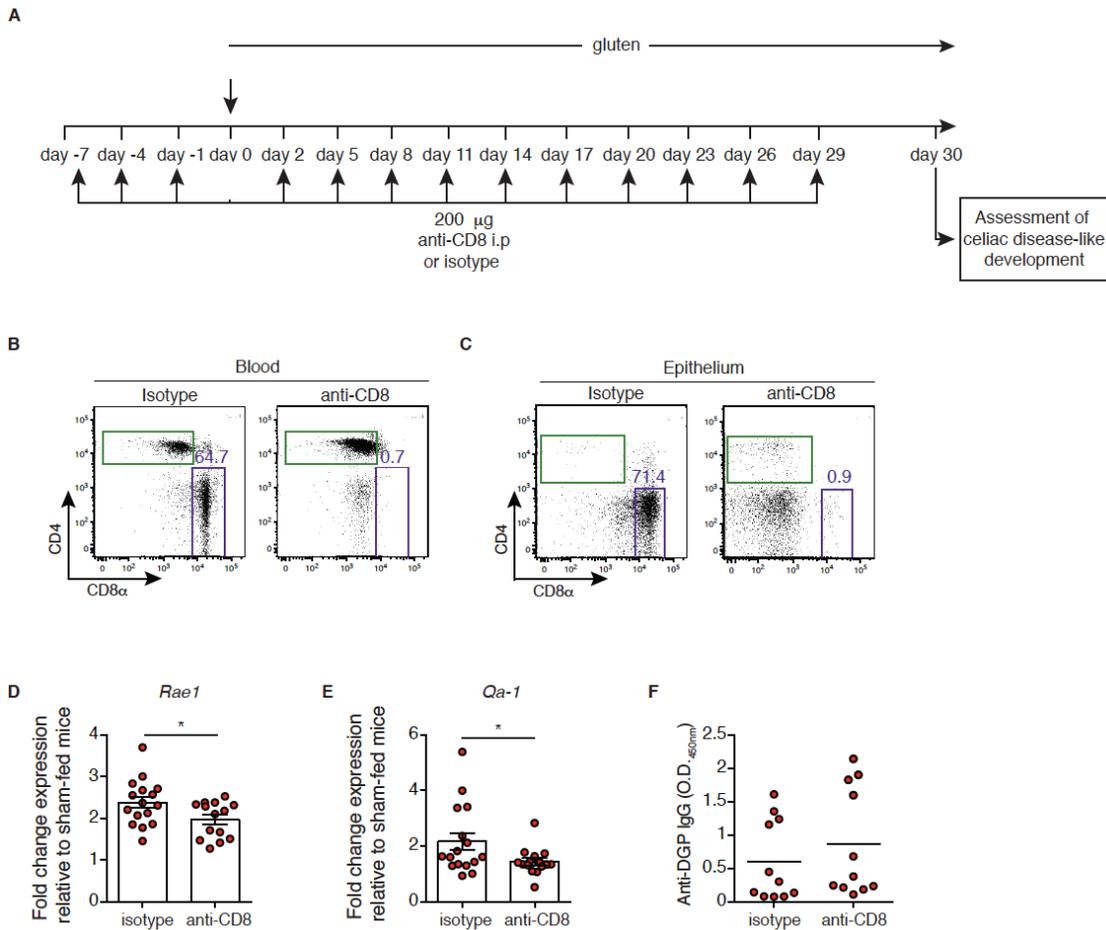
**A****B****C****D****E****F****G****H**

**Extended Data Figure 2. A gluten-free diet decreases the anti-gluten antibody response and the levels of cytotoxic intraepithelial lymphocytes.** (A-E) Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a gluten-free diet (GFD) were maintained on a GFD (denoted “sham”), fed with gluten for 30 days (“gluten”), or fed with gluten for 30 days and then reverted to a GFD (“gluten→GFD”) for 30 days. (A) Correlation between the degree of villous atrophy and the levels of anti-DGP antibodies in sham and gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. (B) Mucosal IgA deposits (red) and transglutaminase 2 (tTGII, green) were identified by immunohistochemistry (IHC) staining of frozen ileum sections. (C) Serum anti-tTGII IgG antibodies levels measured by ELISA thirty days after gluten feeding ( $n=13$  mice per group). (D, E) Serum anti-gliadin (C) IgG and (D) IgA levels were measured by ELISA. Sera were collected sequentially in the same mice before gluten feeding (untreated), thirty days after gluten feeding (gluten d30), and thirty days after reversion to a GFD (GFD d60) ( $n=12$  or  $13$  mice per group for anti-gliadin IgG and IgA, respectively). The black line represents the average for each of the groups. (F) Expression of *Gzmb* in the intestinal epithelium was measured by qPCR. Relative expression levels in gluten and gluten→GFD groups were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice ( $n=6$  mice per group). (G, H) Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a gluten-free diet (GFD) were maintained on a GFD (denoted “sham”), fed with gluten for 30 days (“gluten”), or fed with gluten for 30 days and then reverted to a GFD (“gluten→GFD”) for 60 (day 90, red dots) or 90 days (day 120, gray dots). The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta^+$  CD4 $^-$  CD8 $\alpha\beta^+$  cells. Granzyme B $^+$  IELs are indicated by (F) percentage and (G) MFI (sham,  $n=6$  mice; gluten,  $n=8$  mice; gluten→GFD,  $n=8$  mice). Data represent four [(B) to (D)] or two [(E), (F) and (G)] independent experiments. Error bars, SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ ; Pearson’s correlation test (A), RM One-way ANOVA / Tukey’s multiple comparison [(C), (D), (F) and (G)], unpaired Student’s *t*-test [(E)].



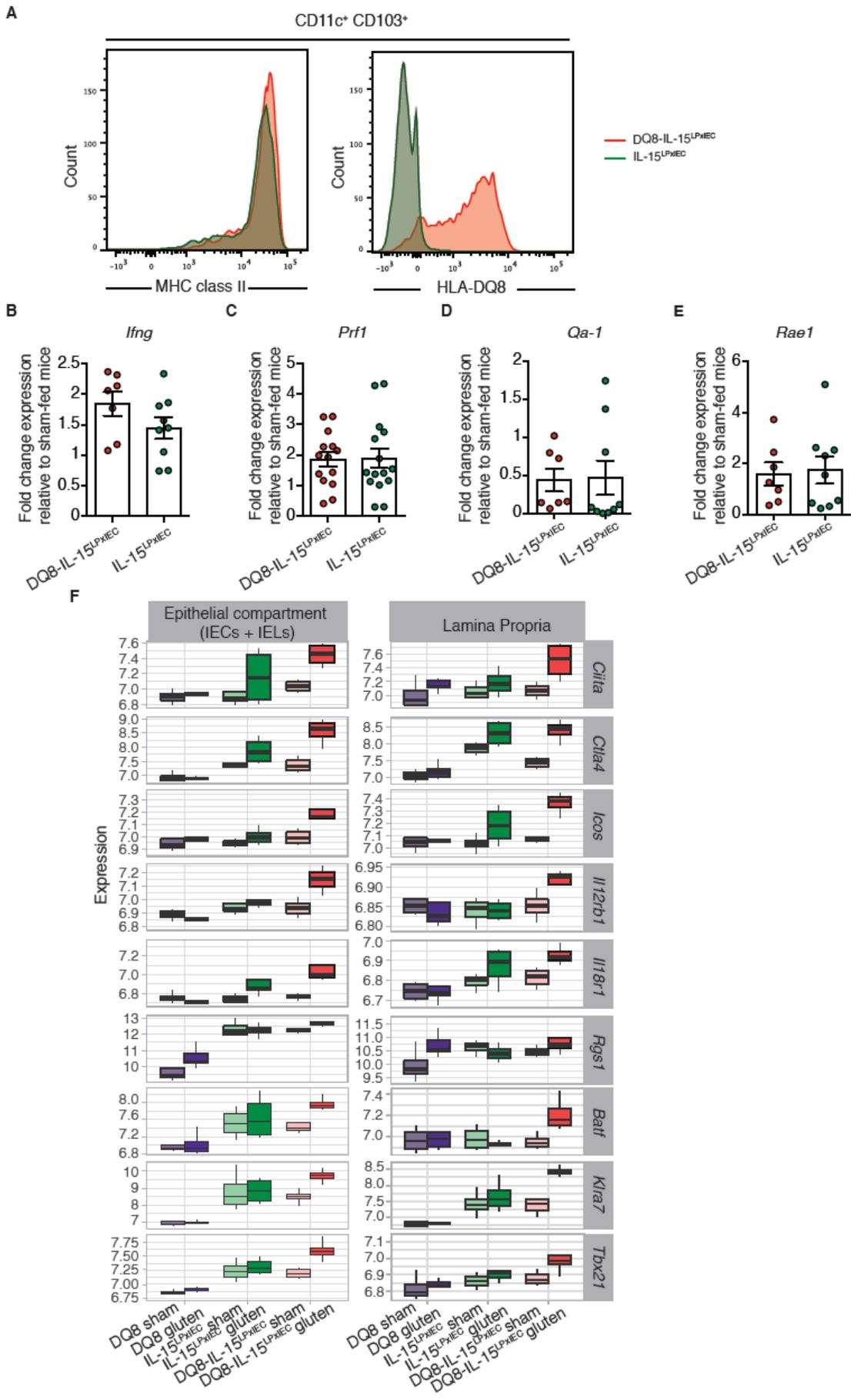
**Extended Data Figure 3. IL-15 expression in both the lamina propria and epithelium confers IELs with a cytotoxic phenotype and the ability to kill epithelial cells. (A-M)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LP</sup>, DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>, and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten). **(A)** H&E staining of paraffin-embedded ileum sections. The graph depicts the ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=10, gluten *n*=10; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=17, gluten *n*=19; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=21, gluten *n*=28). **(B)** Expression of *Ifn $\gamma$*  in the LP was measured by qPCR (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=7, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=13, gluten *n*=12). **(C)** Serum anti-gliadin IgG2c levels were measured by ELISA thirty days after gluten feeding. (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=16, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=15, gluten *n*=15). **(D)** Serum anti-deamidated gliadin peptides (DGP) IgG levels were measured by ELISA thirty days after gluten feeding. (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=10, gluten *n*=10; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=9; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=12). **(E)** Quantification of intraepithelial lymphocytes (IELs) among intraepithelial cells (IECs) was performed on H&E stained ileum sections (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=12; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=17, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=14, gluten *n*=17). **(F-I)** The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta^+$  CD4<sup>-</sup> CD8 $\alpha\beta^+$  and CD8<sup>+</sup> cells. CD94<sup>+</sup>NKG2A<sup>-</sup> IELs are indicated by (F, G) percentage and (H) absolute number / 100 IECs (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=10, gluten *n*=10; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=11, gluten *n*=11; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=10). Intracellular granzyme B mean fluorescence intensity (MFI) was measured (I) (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=9, gluten *n*=9; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=14, gluten *n*=13; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=10, gluten *n*=15). **(J-M)** Expression of (J) *Gzmb*, (K) *Prf1*, (L) *Rae1*, and (M) *Qa-1* in the intestinal epithelium was measured by qPCR. Relative expression levels in sham and gluten-fed mice for each strain are shown (DQ8-IL-15<sup>LP</sup> sham, *n*=16, gluten *n*=16; DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> sham, *n*=15, gluten *n*=15; DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sham, *n*=20, gluten *n*=26). Data are representative of at least three

independent experiments. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001; One-way ANOVA / Tukey's multiple comparison [(A-I)], unpaired Student's *t*-test [(J-M)].

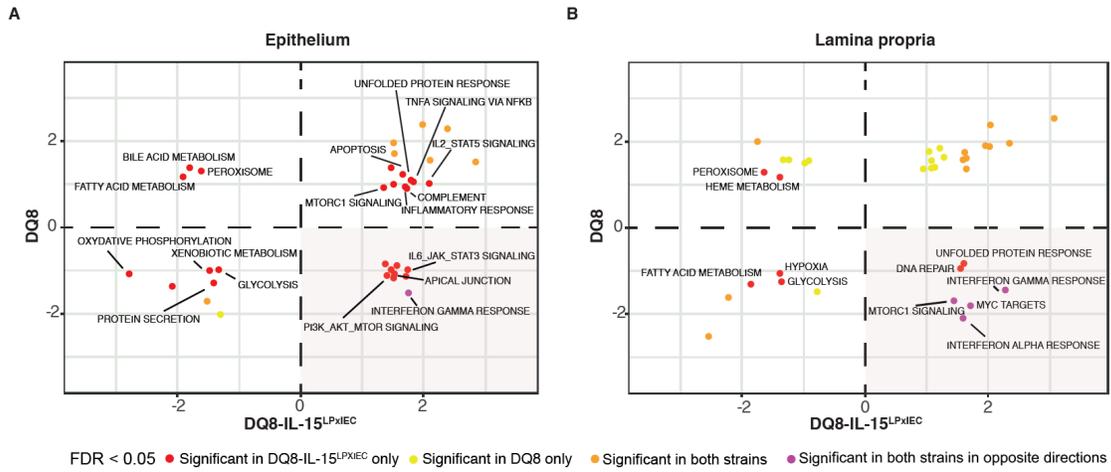


**Extended Data Figure 4. Effect of IELs depletion on antibodies production and epithelial stress markers. (A-F)** Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were treated with 200 or 400 µg of depleting anti-CD8 $\alpha$  antibody (clone 2.43) or its isotype control (rat IgG2b) three times prior to and every three days during the course of gluten feeding. **(A)** Experimental scheme. **(B, C)** Representative dot-plots showing depletion efficiency in the (B) blood and (C) epithelium of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice after 30 days of anti-CD8 $\alpha$  treatment. Plots are gated on TCR $\alpha\beta^+$  cells. **(D, E)** *Rae1* (D) and *Qa-1* (E) gene expression in the intestinal epithelium was determined by qPCR. Relative expression levels were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (gluten + isotype,  $n=16$ ; gluten + anti-CD8,  $n=14$ ). **(F)** Anti-deamidated gluten peptides (DGP) IgG levels from serum collected thirty days after gluten feeding (gluten + isotype,  $n=11$ ; gluten + anti-CD8,

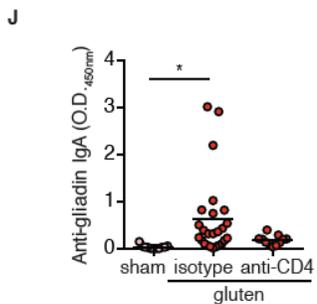
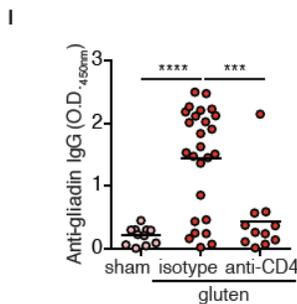
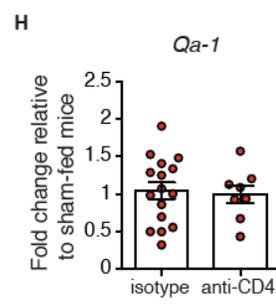
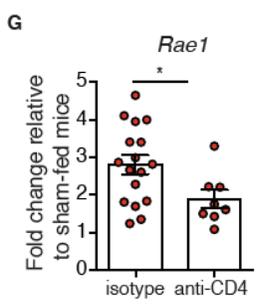
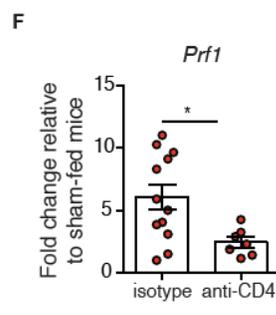
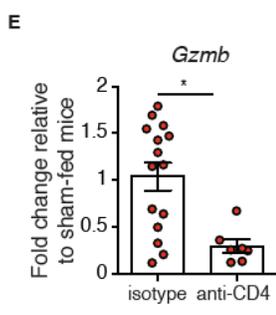
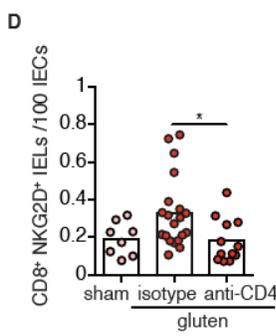
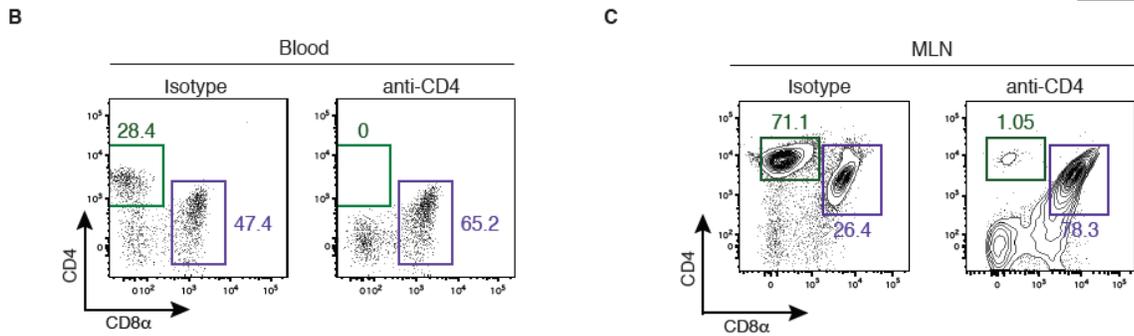
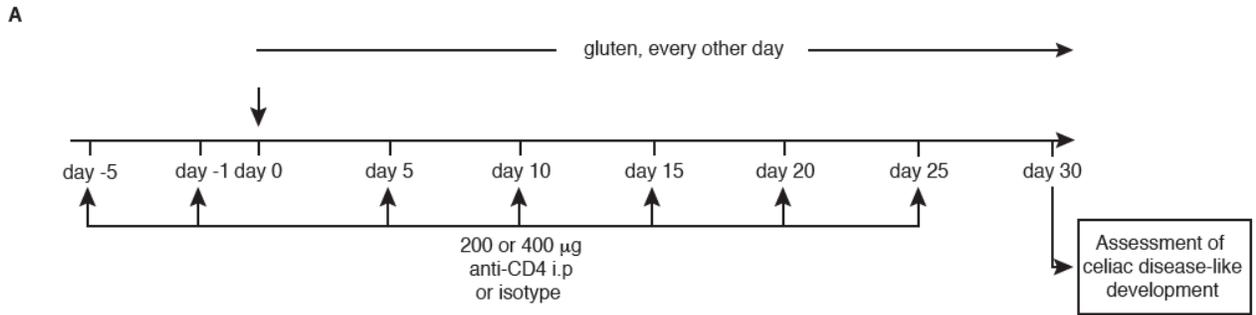
$n=11$ ). Data represent four independent experiments. \* $P < 0.05$ ; unpaired Student's  $t$ -test.



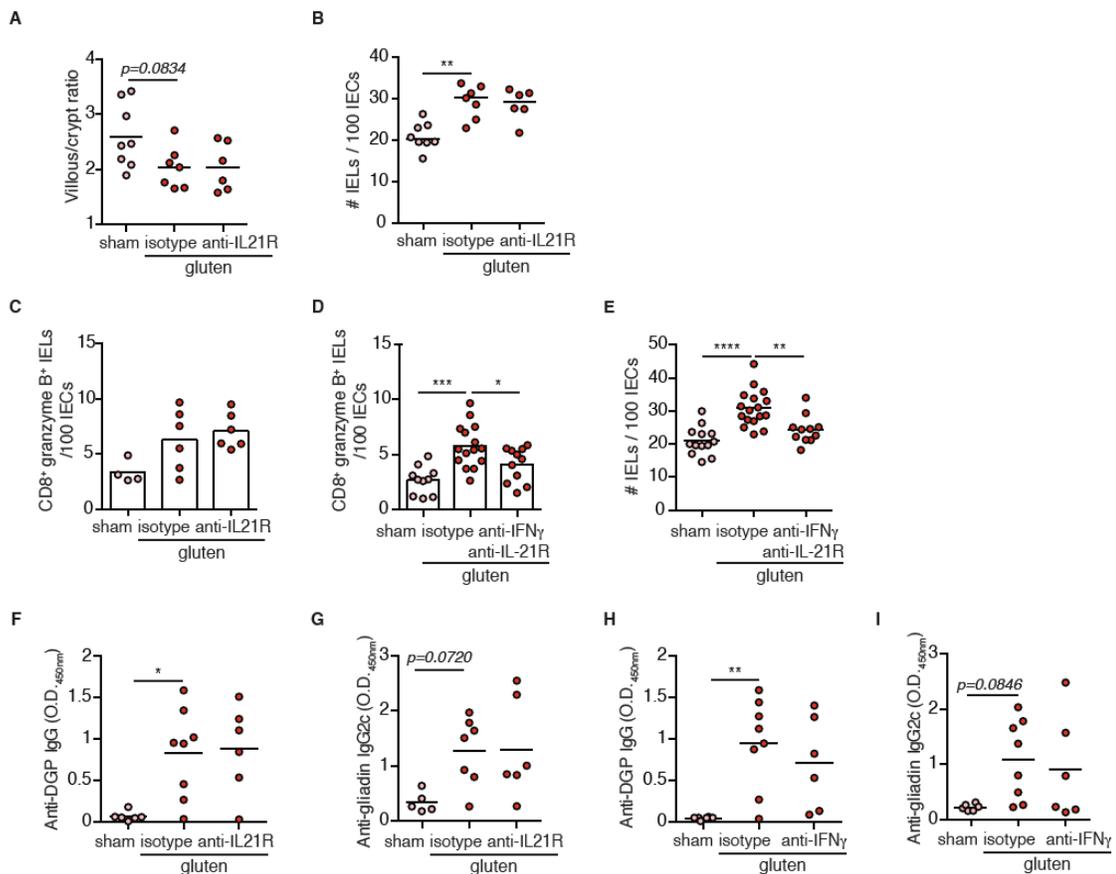
**Extended Data Figure 5. HLA-DQ8 is required to amplify gluten-specific adaptive immunity to the threshold required for tissue destruction.** (A) Cells isolated from the mesenteric lymph nodes of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. CD11c<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dendritic cells were analyzed by flow cytometry for their expression of MHC class II and HLA-DQ8 molecules. (B-F) Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, IL-15<sup>LPxIEC</sup>, and DQ8 mice that were raised on a GFD were maintained on a GFD (sham) or fed with gluten for 30 days (gluten). (B) Expression of *IFN-γ* in the LP was measured by qPCR. Relative expression levels in gluten groups were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and sham-fed IL-15<sup>LPxIEC</sup> (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=8; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=9). (C) Expression of perforin (*Prf1*) in the intestinal epithelium was measured by qPCR. Relative expression levels were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and sham-fed IL-15<sup>LPxIEC</sup> (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=14; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=15). (D, E) Expression of *Qa-1* (D) and *Rae1* (E) in the intestinal epithelium was measured by qPCR. Relative expression levels were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and sham-fed IL-15<sup>LPxIEC</sup> (DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=7; IL-15<sup>LPxIEC</sup>, *n*=9). (F) Examples of genes that are significantly up-regulated in response to gluten uniquely in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. Data are representative of two [(B),(D),(E)] or three [(C)] independent experiments. Error bars, SEM. Ns, non-significant; unpaired Student's *t*-test.



**Extended Data Figure 6. GSEA for gluten-responsive genes in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> and DQ8 mice.** We contrast the enrichment scores for DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> (x-axis) and DQ8 mice (y-axis) for all pathways enriched at an FDR <5% in at least of the strains, in the epithelium and the lamina propria. Positive and negative scores represent enrichments among genes that are more highly or lowly expressed in gluten-fed animals, respectively. The bottom right quadrant refers to pathways that in response to gluten are up-regulated in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> but down-regulated in DQ8 mice.

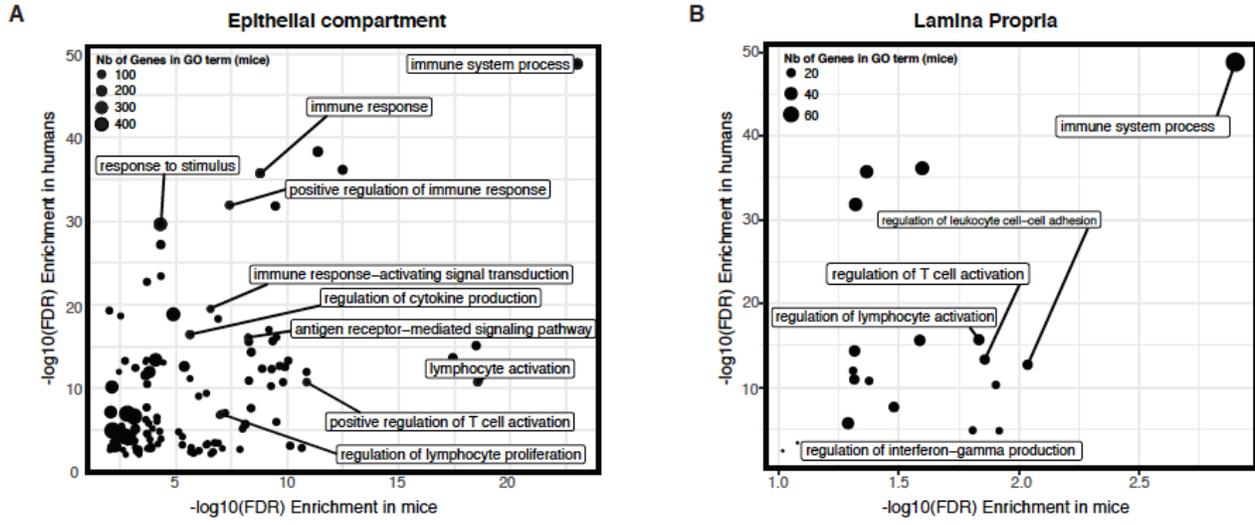


**Extended Data Figure 7. Anti-gliadin antibody titers are decreased in CD4-depleted DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice.** (A-J) Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were treated with 200 or 400 µg of depleting anti-CD4 antibody (clone GK1.5) or its isotype control (rat IgG2b) twice prior to and during the course of gluten feeding. (A) Experimental scheme. (B, C) Representative dot-plots showing depletion efficiency in the (B) blood and (C) mesenteric lymph nodes (MLN) of DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice. Plots are gated on TCRαβ<sup>+</sup> cells. (D) The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCRβ<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells. NKG2D<sup>+</sup> NKG2<sup>-</sup> IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (sham, *n*=8; gluten + isotype, *n*=20, gluten + anti-CD4, *n*=12). (E-H) Expression of (E) *GzmB*, (F) *Prf1*, (G) *Rae1*, and (H) *Qa-1* in the intestinal epithelium as measured by qPCR. Relative expression levels were normalized against the expression levels observed in sham-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (gluten + isotype, *n*=12 to 17, gluten + anti-CD4, *n*=8). (I, J) Anti-gliadin (I) IgG and (J) IgA levels were measured by ELISA from serum collected thirty days after gluten feeding (sham, *n*=11; gluten + isotype, *n*=26, gluten + anti-CD4, *n*=11). Data represent four independent experiments. \**P* < 0.05; unpaired Student's *t*-test. Data are representative of four independent experiments. Error bars, SEM. \**P* < 0.05, \*\*\**P* < 0.001, \*\*\*\**P* < 0.0001; One-way analysis of variance (ANOVA) / Tukey's multiple comparison [(D), (I), (J)], and unpaired Student's *t*-test [(E), (F), (G), (H)].

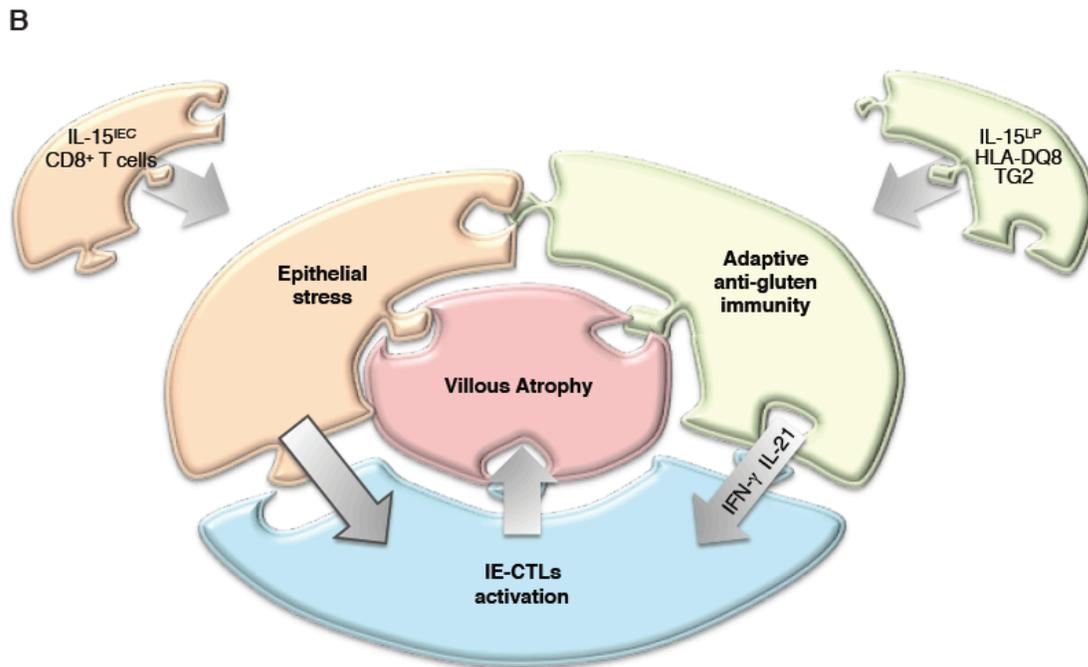
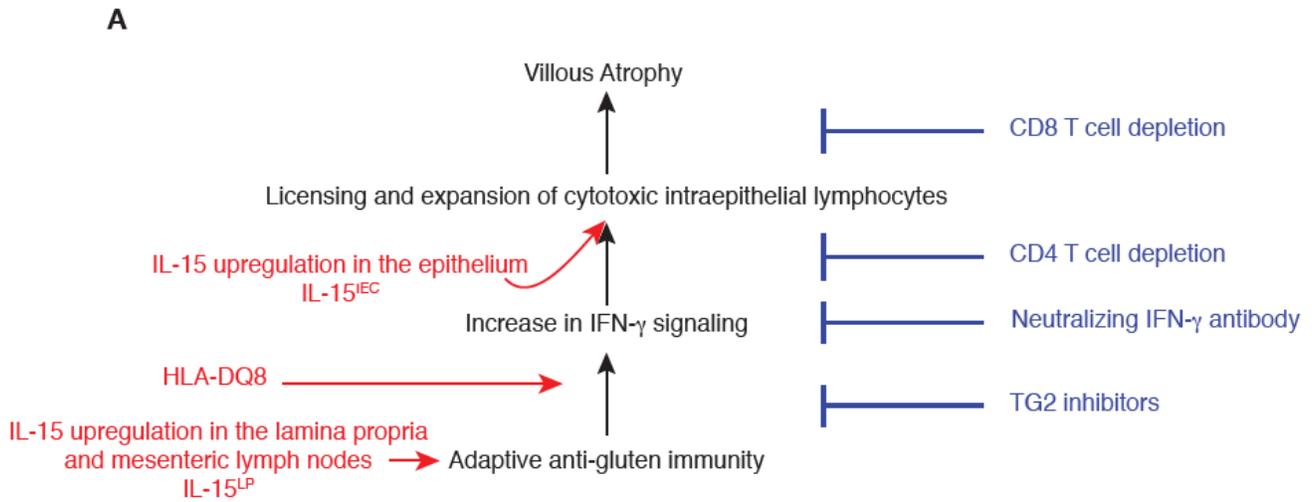


**Extended Data Figure 8. Impact of T helper 1 cytokine depletion on the development of disease in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice.** (A-I) Ten-week old DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice were treated with 500  $\mu$ g of depleting anti-IFN $\gamma$  (clone XMG1.2) and/or anti-IL21R (clone 4A9) or corresponding isotype controls (rat IgG1 and rat IgG2a, respectively) once prior to, and every 3 days during the course of gluten feeding as indicated in the panels. (A) Ratio of the morphometric assessment of villous height to crypt depth (sham,  $n=8$ , gluten + isotype,  $n=7$ , gluten + anti-IL-21R,  $n=6$ ). (B) Quantification of IELs among IECs was performed on H&E stained ileum sections (sham,  $n=8$ , gluten + isotype,  $n=7$ , gluten + anti-IL-21R,  $n=6$ ). (C) The intestinal epithelium was isolated and analyzed by flow cytometry. IELs were identified as TCR $\beta^+$  CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> cells. Granzyme B<sup>+</sup> IELs are indicated by absolute number / 100 IECs (sham,  $n=8$ , gluten + isotype,  $n=7$ , gluten + anti-IL-21R,  $n=6$ ). (D)

Granzyme B<sup>+</sup> IELs are indicated as in (C) (sham, *n*=12, gluten + isotype, *n*=16, gluten + anti-IL-21R + anti-IFN- $\gamma$ , *n*= 11). (E) Quantification of IELs among IECs was performed on H&E stained ileum sections (sham, *n*=13, gluten + isotype, *n*=17, gluten + anti-IL-21R+ anti-IFN- $\gamma$ , *n*= 11). (F-G) Serum anti-DGP IgG (F) and anti-gliadin IgG2c (G) levels were measured by ELISA. Sera were collected thirty days after gluten feeding (sham, *n*=5 and 6, gluten + isotype, *n*=8 and 7, gluten + anti-IL-21R, *n*= 6). (H-I) Serum anti-DGP IgG (H) and anti-gliadin IgG2c (I) levels were measured as in (F-G) (sham, *n*=6 and 6, gluten + isotype, *n*=8, gluten + anti-IFN- $\gamma$ , *n*= 6). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\*\**P* < 0.0001; One-way analysis of variance (ANOVA) / Tukey's multiple comparison.



**Extended Data Figure 9. Similar gene regulatory mechanisms underlie the development of CeD in humans and DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice.** Contrast between the gene ontology terms enriched among genes induced by gluten challenge in DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice (depicted in the form of  $-\log_{10}$  p-values on the x-axis) and the gene ontology terms enriched among genes differently expressed between CeD patients and healthy controls (depicted in the form of  $-\log_{10}$  p-values on the y-axis) in the epithelial compartment (A) and the LP (B). The transcriptional comparison was made between the intestinal epithelium and LP of gluten-fed DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> mice and whole duodenal biopsies of active CeD patients.



**Extended Data Figure 10. Interplay between IL-15, tTGII, and HLA-DQ8 promote the development of villous atrophy. (A)** Representation of the respective roles of HLA-DQ8, IL-15 in the epithelial and LP compartments, IFN- $\gamma$ , tTGII, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in

promoting VA. IL-15 upregulation in the LP is required to induce the adaptive anti-gluten T<sub>H</sub>1 response, and HLA-DQ8 facilitates and enhances the IFN- $\gamma$  response that is required for the development of VA. The adaptive T<sub>H</sub>1 immune response promoted by HLA-DQ8 and IL-15 in the LP, is however insufficient to cause tissue destruction. It needs to synergize with IL-15 in the epithelium to further promote the expansion of cytolytic IELs and their degranulation, leading to CD8 T cell dependent killing of epithelial cells and VA. The value of this mouse model as a gluten and HLA-DQ8-dependent preclinical model for CeD, is further emphasized by the finding that tTGII inhibition prevents VA. **(B)** CeD can be represented as a jigsaw puzzle where each piece representing one component of the anti-gluten immune response must interlock to lead to the development of VA.

## Chapitre 4. Conclusion et discussion

L'homéostasie intestinale est caractérisée par un équilibre immunologique remarquable. Sa régulation oscille habilement entre le développement d'une réponse immunitaire face aux pathogènes envahissants et l'absence de réaction face aux antigènes inoffensifs. En ce qui concerne les antigènes alimentaires, on parle du mécanisme de la TO et un bel exemple de sa rupture est la MC.

Cette dernière est une pathologie auto-immune inflammatoire chronique du petit intestin provoquée par la consommation de gluten chez des individus génétiquement prédisposés. Elle constitue l'une des maladies auto-immunes les mieux déchiffrées de notre aire puisque d'une part le tissu cible, le duodénum, est relativement facile d'accès et, d'autre part, l'antigène environnemental, le gluten, est identifié et son exposition contrôlée. Les composantes génétiques et immunologiques de la maladie ont donc été relativement bien caractérisées au cours de ces dernières décennies, avec une incrimination certaine pour les haplotypes HLA-DQ2 et HLA-DQ8 ainsi que pour la cytokine pro-inflammatoire IL-15. Néanmoins, le dialogue entre ces différents facteurs intervenant dans la survenue et l'évolution de l'atrophie villositaire caractérisant la maladie n'est pas encore parfaitement cerné. Une des conséquences de cette zone d'ombre dans notre savoir est l'incapacité de développer un modèle murin résumant les caractéristiques de la pathologie observée chez l'Homme. L'absence d'un tel outil dans le domaine ralentit à son tour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, autres que la diète sans gluten.

L'objectif majeur de cette thèse doctorale a donc été de répondre à ce besoin en développant et en caractérisant un modèle murin innovant de la MC, permettant l'étude

*in vivo* de la mécanistique de sa pathogenèse suivie de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Afin d'y parvenir, nous avons exploité les connaissances issues de nos précédentes recherches et de celles réalisées chez l'Homme et transféré certaines caractéristiques biologiques clés du patient cœliaque dans notre modèle. Ainsi, et comme les deux tiers des individus cœliaques, notre modèle murin surexprime l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale, à savoir aussi bien dans l'épithélium que dans la Lp. Il est également humanisé pour l'haplotype HLA-DQ8 prédisposant à la MC.

Les résultats présentés dans le chapitre 3 de ce manuscrit sont une preuve de concept suivant laquelle le développement d'une MC complète dans ces souris nécessite la surexpression de l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale associée à la perte de la TO au gluten par les cellules T CD4<sup>+</sup>. Le premier objectif de ce travail a été de démontrer qu'une exposition au gluten de ces souris s'accompagne bel et bien du développement d'une MC fidèle à la pathologie humaine. En effet, après 30 jours de consommation de gluten, les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> développent une réponse adaptative complète contre le gluten, une expansion des LIEs présentant un phénotype cytotoxique activé ainsi qu'une destruction du tissu épithélial. À l'image du patient cœliaque actif, cette réponse est dépendante de la présence de l'IL-15 dans la muqueuse intestinale puisque la déclinaison génétique de notre modèle n'exprimant que le HLA-DQ8 ne développe ni lymphocytose intra-épithéliale ni atrophie villositaire suite à la consommation de gluten.

Aussi, lorsque ce gluten est retiré du régime alimentaire du patient, on observe une amélioration histologique de sa muqueuse et une disparition de la symptomatologie clinique. En conséquence, afin de valider la relevance de notre modèle par rapport à la pathologie, nous avons également soumis la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> exposée au gluten à

une diète sans gluten durant 4 semaines ce qui s'est accompagné du retour à une architecture épithéliale saine. Ceci nous a permis de confirmer que, comme chez le patient, la réponse pathologique développée dans notre modèle est absolument dépendante du gluten.

Une fois la solidité du modèle établie quant à sa capacité à développer la maladie, nous avons développé et exploité deux déclinaisons génétiques supplémentaires de ce dernier afin de vérifier l'hypothèse suivant laquelle la combinaison entre la perte de la TO au gluten (menée par la présence de l'HLA-DQ8 et par l'expression de l'IL-15 dans la Lp) et la surexpression de l'IL-15 dans l'épithélium conduit au développement de l'atrophie villositaire. Nous avons ainsi comparé notre souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> à un modèle HLA-DQ8 surexprimant l'IL-15 uniquement dans l'épithélium (DQ8-IL-15<sup>IEC</sup>) ou uniquement dans la lamina propria (DQ8-IL-15<sup>LP</sup>). La souris DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> ne présente aucune perte de la TO au gluten ni d'atrophie villositaire bien qu'elle présente une augmentation en lymphocytes intraépithéliaux cytotoxiques. Ce modèle reflète parfaitement la situation où certains parents au premier degré du patient surexpriment l'IL-15 dans leur épithélium intestinal sans jamais développer de réponse contre le gluten ni d'altération tissulaire. À contrario, même si elle ne développe pas non plus d'atrophie villositaire, la souris DQ8-IL-15<sup>LP</sup> est caractérisée par une réponse LTh1 anti-gluten avec une augmentation de la lymphocytose intraépithéliale mais pas d'expansion de lymphocytes intraépithéliaux avec des fonctions cytotoxiques. Dès lors, en l'absence de facteurs additionnels, ces cellules n'ont pas cette capacité cytotoxique. Ce modèle reflète ainsi le statut des patients potentiellement cœliaques où il y a perte de la TO sans destruction du tissu cible. Ces observations sont notamment en accord avec celles obtenues à partir d'un modèle murin du diabète de type I où les cellules  $\beta$  sont caractérisées par l'expression d'une glycoprotéine (GP) du virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) sous le contrôle du promoteur de l'insuline (364). Lorsque ces souris sont infectées au LCMV, les cellules T CD8<sup>+</sup> spécifiques

de la GP infiltrent le tissu pancréatique et lysent les cellules  $\beta$  exprimant la GP, ce qui aboutit *in fine* au développement du diabète. À contrario et de manière très intéressante, si ces souris sont au préalable immunisées avec ce peptide, les cellules T CD8<sup>+</sup> vont à nouveau infiltrer le pancréas mais n'auront aucune activité cytotoxique contre les cellules des îlots  $\beta$ . Les auteurs ont ensuite démontré que l'élément manquant était ici l'absence d'expression des molécules du CMH de classe I dépendante de l'activation de TLRs. Ceci met de nouveau l'emphase sur la nécessité d'un statut inflammatoire dans l'organe cible en tant que facteur nécessaire au développement de la composante auto-immune.

Finalement, nous confirmons que l'élément manquant à l'activité cytotoxique des LIEs et donc au développement de l'atrophie villositaire dans ces souris DQ8-IL-15<sup>LP</sup> est un stress cellulaire épithélial. Ce dernier est gouverné par l'expression simultanée de l'IL-15 dans l'épithélium puisque les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> exposées au gluten présentent une perte de la TO simultanément associée à l'augmentation de l'expression des ligands de stress Rae-1 et Qa-1 à la surface des cellules épithéliales intestinales, à une expansion de LIEs cytotoxiques, et à la destruction de l'épithélium intestinal. Ces observations confirment sans équivoque l'importance de l'IL-15 dans la pathogenèse de la maladie et confirment également l'importance de son expression dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale. Le statut inflammatoire qui en résulte est caractérisé par des interactions entre le tissu épithélial cible en état de stress et les lymphocytes CD8<sup>+</sup> infiltrant ce même tissu, conduisant ainsi à la destruction du tissu. Nous avons ensuite confirmé le rôle central des LIEs CD8<sup>+</sup> cytotoxiques dans la survenue de cette destruction épithéliale puisqu'une déplétion des cellules T CD8<sup>+</sup> dans les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> consommant du gluten prévient l'atrophie villositaire. Néanmoins et comme on peut s'y attendre, cette déplétion n'impacte pas le développement de la réponse humorale cœliaque, toujours bien présente même en l'absence de lymphocytes CD8<sup>+</sup>. D'un point de vue global, ces résultats mettent clairement en lumière que le statut inflammatoire de

l'épithélium intestinal garanti un dialogue avec les LIEs envahissant le tissu au cours de la lymphocytose. Ce dialogue s'avère être un facteur nécessaire à la pathogenèse de la MC. On notera que cette observation concerne également d'autre type de pathologie auto-immune telles la sclérose en plaque (365), l'arthrite rhumatoïde (366) ou encore le psoriasis (367). Il s'agit donc là d'un élément clé au développement des pathologies auto-immunes spécifiques d'organes.

Après avoir déterminé le rôle spatial fondamental de l'IL-15 dans le développement de la maladie et obtenu les mêmes observations que celles constatées chez le patient cœliaque, nous avons abordé le même type d'approche pour valider la prédisposition génétique associée à l'haplotype HLA-DQ8 ainsi que pour investiguer les rôles de cette molécule dans la pathologie. Nous avons donc généré une quatrième déclinaison génétique de notre modèle, dépourvue cette fois de l'expression de l'haplotype humain mais surexprimant toujours l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale. De manière très intéressante, la consommation de gluten par cette souris IL-15<sup>LPxIEC</sup> s'accompagne ici aussi d'une production d'anticorps dirigés contre le gluten déamidé et d'une production d'IFN- $\gamma$  dans la muqueuse intestinale de ces souris. Néanmoins, il n'y a pas d'atrophie villositaire. Ceci démontre clairement que la présence de l'HLA-DQ8 n'est pas nécessaire pour la perte de la TO face au gluten mais bien nécessaire pour l'acquisition des fonctions cytotoxiques des LIEs et donc pour le développement de l'atrophie villositaire. La molécule HLA-DQ8 présente donc un caractère unique dans sa capacité à induire la pathologie et ceci résulte probablement de deux éléments. Premièrement, il s'agit de son aptitude unique à recruter davantage de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten et donc à pousser la réponse adaptative au-delà d'un certain seuil nécessaire au développement de l'atrophie. Ensuite, et ce point est très intéressant, les études transcriptionnelles que nous avons réalisées entre le modèle DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> et IL-15<sup>LPxIEC</sup> démontrent clairement que l'activation des voies de signalisations

impliquées dans la réponse à l'IFN- $\gamma$  n'a lieu qu'en présence du DQ8. L'absence de l'haplotype HLA-DQ8 dans le modèle IL-15<sup>LPxIEC</sup> permet probablement à des effets régulateurs de contrer les effets de l'IFN- $\gamma$  sécrété dans ces souris. Cette hypothèse sera notamment renforcée par les expériences de neutralisation de la signalisation de l'IFN- $\gamma$  puisque l'inhibition de ce dernier dans le modèle DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> permet de prévenir l'atrophie villositaire. Finalement, la présence dans le sérum de ces souris IL-15<sup>LPxIEC</sup> d'anticorps de type IgG dirigés contre la gliadine déamidée est consistante avec la présence de ces anticorps chez des individus HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 négatifs (368). Pour conclure, les résultats obtenus dans cette partie corroborent les observations suivant lesquelles les individus HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 négatifs peuvent présenter une perte de la TO au gluten avec production d'IFN- $\gamma$  sans que cela ne débouche sur le développement de la maladie. Les futures études qui investigueront en ce sens et qui permettront de comprendre la mécanistique de la molécule HLA-DQ8 dans la biologie de l'IFN- $\gamma$  seront d'un grand intérêt.

Sur base de l'ensemble de ces résultats, nous avons poussé l'investigation des rôles de l'haplotype HLA-DQ8, de l'IL-15 et du gluten via analyse transcriptionnelle dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale des souches HLA-DQ8, IL-15<sup>LPxIEC</sup> et DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>. Cette analyse identifie un enrichissement des voies de signalisations impliquées dans la présentation de l'antigène et l'activation lymphocytaire au niveau des souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>. Ceci traduit de nouveau l'importance de l'expression simultanée de l'IL-15 et de l'haplotype HLA-DQ8 dans notre modèle afin d'obtenir des interactions dont l'intensité conduit probablement au dépassement d'un certain seuil d'activation des lymphocytes, garantissant ainsi le développement d'une atrophie villositaire. De manière intéressante, cette analyse met de nouveau en lumière une régulation positive de nombreux gènes intervenant dans la réponse à l'IFN- $\gamma$  dans la souche DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>.

Inversement, ces gènes sont régulés négativement dans les souches HLA-DQ8 et IL-15<sup>LPxIEC</sup>.

Cette dernière observation corrobore l'ensemble des données de la littérature soulignant le rôle pivot joué par les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten dans le décours de la maladie, lesquelles sont connues pour leur production massive d'IFN- $\gamma$  et d'IL-21 dans la muqueuse du patient cœliaque. Aussi, et de manière plus globale, la réponse Th1 spécifique pour un auto-antigène considéré dans les pathologies auto-immunes est reconnue comme jouant un rôle important dans la pathogenèse et le maintien de ces pathologies (369, 370). L'identification des mécanismes orchestrant la perte du profil tolérogénique de ces cellules T CD4<sup>+</sup> dans le contexte de la MC ainsi que le rôle de ces cellules dans le processus de destruction de l'épithélium intestinal peut clairement nous aider à comprendre la fonction de leur réponse dans d'autres types de pathologies auto-immunes organe-spécifiques. Dès lors, la suite de notre recherche s'est orienté vers l'investigation du rôle de ces cellules et de leurs cytokines. Nous avons dans un premier temps traité les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> exposées au gluten avec un anticorps ciblant les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Une telle déplétion s'avère très puissante sur le développement de la pathologie puisque les souris ne développent aucune caractéristique de la réponse immunitaire adaptative, aucune lymphocytose des LIEs et aucune altération du tissu épithélial, attestant ici du rôle clé des cellules T CD4<sup>+</sup> pour le développement de la pathologie. Plus précisément, l'absence de lymphocytose et de LIEs au phénotype cytotoxique indique que la réponse Th1 observée dans la MC contribue directement à l'expansion et à l'activation des LIEs. Aussi, l'absence d'anticorps spécifiques de la pathologie souligne ici sa dépendance aux cellules T CD4<sup>+</sup> tel qu'initialement proposé (371). Une fois ce phénotype observé, nous avons cherché à comprendre sa mécanistique et vérifier l'hypothèse suivant laquelle la fonction des CD4<sup>+</sup> dans la pathologie trouve ses relais au travers de l'IL-21 et de l'IFN- $\gamma$ . Afin de vérifier ce concept dans notre modèle,

nous avons bloqué la signalisation de ces deux cytokines dans les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> exposées au gluten via des anticorps neutralisants spécifiques. Les résultats obtenus démontrent à nouveau que la réponse humorale est orchestrée par les cellules T CD4<sup>+</sup>, et plus précisément au travers de la production de ces deux cytokines. Leur impact sur les LIEs semble quant à lui passer via l'IFN- $\gamma$  puisque sa neutralisation empêche le développement d'une atrophie villositaire là où la neutralisation de l'IL-21 s'est montrée impuissante. Aussi, ces deux cytokines présentent une synergie dans l'expansion et l'activation des LIEs CD8<sup>+</sup> cytotoxiques.

Ainsi et d'un point de vue global, la première partie de cette recherche consacrée au développement et la caractérisation de ce modèle nous a permis de disséquer la mécanistique aboutissant à la destruction tissulaire, laquelle résulte d'une coopération entre le gluten, le HLA-DQ8, l'IL-15, les cellules T CD4<sup>+</sup> et les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Les résultats immunologiques et transcriptionnels obtenus dans les différentes déclinaisons génétiques de notre modèle au cours de cette première partie indiquent que ces acteurs sont impliqués, à leur échelle, dans un ou plusieurs mécanismes spécifiques de la pathologie qui d'une part amplifie la réponse adaptative et d'autre part favorise le dialogue entre cette immunité adaptative et le tissu ciblé. Aussi, c'est en survenant au même moment que ces mécanismes conduisent au développement d'une MC entièrement épanouie. Plus précisément, nous avons pu démontrer que le développement de l'atrophie villositaire montre une puissante association à l'IFN- $\gamma$  et à l'expansion des LIEs cytotoxiques activés. Aussi, nos résultats illustrent comment l'IL-15 et les molécules de prédisposition du HLA influencent et connectent la réponse immunitaire innée et adaptative dans la maladie. L'intervention nécessaire de ces deux facettes de l'immunité dans la destruction tissulaire souligne davantage la complexité de la pathologie et souligne l'aspect quantitatif de cette dernière puisque la réponse innée et la réponse adaptative vont travailler de concert à l'obtention d'un nombre suffisant de

LIEs activés et nécessaire à la destruction épithéliale. Par ailleurs, le fait que l'IL-15 et les molécules du HLA soient bien souvent associées aux pathologies auto-immunes ne sont pas le fruit du hasard et ces nouvelles connaissances issues de la MC vont probablement permettre une certaine translation dans la compréhension de la pathogenèse de ces maladies.

La deuxième partie de notre recherche est dédiée à l'évaluation de la fidélité et de la pertinence de notre modèle par rapport à la pathologie développée chez l'Homme. Pour ce faire, le Dr. Valentina Discepolo du laboratoire Jabri a travaillé sur le séquençage de l'ARN issu de biopsies intestinales de patients cœliaques et d'individus sains. Avec l'aide bio-informatique du laboratoire du Dr. Luis Barreiro, ces analyses transcriptionnelles ont été comparées à celles du séquençage réalisé dans les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> consommant ou non du gluten. De manière très intéressante, les variabilités transcriptionnelles observées entre les souris sous gluten et sans gluten sont fortement corrélées à celles observées entre les individus cœliaques et les individus sains. Plus précisément, la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sous gluten et le patient cœliaque actif montrent à nouveau un enrichissement des voies de signalisation impliquées dans la présentation de l'antigène et l'activation des lymphocytes T. En conséquence, ces résultats démontrent clairement une similarité entre notre modèle et le patient cœliaque concernant les mécanismes transcriptionnels sous-jacents au développement de la maladie. Ces résultats clés nous ont ainsi confortés dans l'idée que ce nouveau modèle murin est fidèle à la pathologie développée chez l'Homme et qu'il constitue probablement un outil clinique précieux dans le domaine, permettant de tester de nouvelles thérapies pour la MC.

La troisième partie de cette thèse a donc consisté à évaluer la puissance préclinique de notre modèle murin. En effet, étant donné l'inquiétante épidémiologie de la maladie, la validation de ce modèle dans l'identification de nouvelles cibles

thérapeutiques pourrait présenter d'importantes répercussions cliniques. En particulier, le fait que le développement de l'atrophie villositaire dépende de la présence de l'IL-15, du gluten et de l'haplotype HLA-DQ8 laisse entrevoir la possibilité de tester des thérapies ciblant aussi bien des acteurs de l'immunité innée et adaptative que des acteurs intervenant directement dans l'altération du tissu épithélial cible. Par exemple, les études menées chez l'Homme identifient la tTGII comme un acteur contribuant activement au développement de la réponse inflammatoire et à la destruction de la muqueuse, notamment via sa capacité à déamider le gluten et donc de probablement participer à l'amplification de la réponse T CD4<sup>+</sup> spécifique du gluten. On s'est donc intéressé au ciblage de cette enzyme dans notre modèle et nous avons démontré dans un premier temps que l'enzyme tTGII est active dans la muqueuse intestinale de la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> uniquement lorsque cette dernière est exposée au gluten. En l'absence de gluten, cette activation ne peut-être objectivée et ceci sous-entend que la surexpression de l'IL-15 dans les deux compartiments de la muqueuse intestinale n'est pas un élément suffisant. Il serait donc intéressant d'investiguer les mécanismes par lesquels le gluten est capable d'activer la tTGII. Ensuite, nous avons traité notre modèle exposé au gluten avec deux inhibiteurs pharmacologiques de l'enzyme obtenu grâce à notre collaboration avec le laboratoire du Dr. Chaitan Khosla à l'université de Stanford. De manière remarquable, une telle inhibition enzymatique avec l'un ou l'autre inhibiteur permet de prévenir la survenue de l'atrophie villositaire, démontrant donc que son activation est nécessaire à la pathogenèse de la maladie. Ce résultat inscrit non seulement l'enzyme comme une cible thérapeutique potentielle très intéressante mais souligne à nouveau le fait que la modification post-traductionnelle d'un antigène est un mécanisme assurant l'apparition de néo-épitopes, lesquelles sont responsables de la perte de la TO du système immunitaire face à ces antigènes initialement non immunogènes (307). Plus précisément, dans le contexte cœliaque, ce concept démontre que la déamidation du gluten par la tTGII amplifie la réponse adaptative médiée par les cellules T CD4<sup>+</sup> ce qui permet *in fine* le

dépassement d'un seuil inflammatoire conduisant à l'apparition des lésions tissulaires. De tels résultats nous permettent de valider la puissance de notre modèle en tant que nouvel outil préclinique dans la recherche de thérapies alternatives à la diète sans gluten.

Finalement, les modèles murins DQ8, IL-15<sup>LPxIEC</sup>, DQ8-IL-15<sup>LP</sup>, DQ8-IL-15<sup>IEC</sup> et DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sont des outils précieux qui, ensemble, nous ont permis de mieux cerner les rôles respectifs mais également interdépendants du gluten, de l'immunité innée et adaptative, de la tTGII et finalement de l'haplotype HLA-DQ8 dans le développement et le décours de la maladie. Les études transcriptionnelles qui en découlent ont de nouveau conforté l'implication de gènes intervenant dans l'immunité tant innée qu'adaptative, en parallèle à la forte association du CMH de classe II dans la pathologie. Ces résultats illustrent les similitudes existantes entre la MC et la famille des pathologies auto-immunes polygéniques organe-spécifiques, présentant elles aussi le même type d'association. La MC et les connaissances qui y sont associées constituent donc un modèle d'étude unique très intéressant pour la compréhension de ces pathologies auto-immunes. De manière générale, ces pathologies semblent reposer sur un dialogue bidirectionnel établi entre la réponse innée du tissu cible enflammé et la réponse adaptative face à un antigène exogène ou endogène. La tempête cytokinique qui en résulte, et dont l'étiologie est probablement multiple, permet alors à son tour l'amplification du stress tissulaire, le recrutement, l'activation et la prolifération des cellules T cytotoxiques, conduisant alors à la destruction du tissu cible. Nos différents modèles associant différents génotypes et illustrant la forme potentielle et la forme latente de la maladie laissent également comprendre que le dépassement d'un certain seuil inflammatoire est nécessaire pour le développement d'un phénotype pathologique complet et que ce seuil est dépassé grâce à différents facteurs permettant ensemble l'amplification de la réponse adaptative. Par exemple, en ce qui concerne la MC, nous avons pu démontrer que la forme potentielle est caractérisée par une surexpression de l'IL-15 dans la Lp mais pas dans l'épithélium et

qu'elle nécessitait justement cette surexpression épithéliale pour activer la fonction cytotoxique des LIEs et l'expression de molécules de stress épithélial. Un autre élément participant au dépassement de ce seuil est l'activation nécessaire de la tTGII pour le développement de l'atrophie villositaire. Cette activation permet la déamidation du gluten et par conséquent le recrutement supplémentaire de cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques de ce gluten déamidé. Néanmoins, comment la tTGII devient activée dans le décours de la MC reste une énigme. Globalement, comment les enzymes associées au décours de certaines pathologies auto-immunes organe-spécifiques deviennent activées est une question clé demeurant actuellement sans réponse. La résolution de cette question guidera vers d'importantes implications thérapeutiques.

Pour conclure, ce travail répond à la longue absence d'un modèle complet pour l'étude de la maladie. Ensuite, il illustre le caractère polygénique et multifactoriel des maladies auto-immunes ainsi que leur interdépendance pour non seulement activer mais aussi amplifier la réponse immunitaire erronée, assurant ainsi la destruction du tissu cible. Néanmoins, ce modèle présente bien évidemment ses propres limites et ses points faibles. Notre équipe tend actuellement vers son amélioration, traduisant donc peut-être la longue route qu'il nous reste à parcourir avant de développer un modèle cœliaque absolument parfait. Cela dit, il ne faut pas voir ces limites comme des obstacles à l'évolution du savoir. Elles stimulent plutôt le développement de modèles supplémentaires et c'est précisément au travers de l'évolution et le raffinement de ces derniers que la mécanistique de la MC finira par révéler ses derniers secrets, dans lesquels se trouve probablement la solution thérapeutique ultime. Le cinquième et dernier chapitre de ce manuscrit s'intéresse aux limites de notre modèle et aux futures directions qui permettront de le raffiner. Finalement, nous aborderons certains domaines de la maladie dans lesquels le modèle pourra être exploité.

## **Chapitre 5. Limitations, futures directions et exploitation du modèle**

### **5.1 Limitations et futures directions**

#### **5.1.1 Atrophie sévère et pénétrance limitée**

Le modèle décrit dans cette recherche trouve notamment sa force dans sa capacité à spontanément développer une atrophie villositaire sévère lorsqu'il est exposé au gluten. Néanmoins, cette force peut devenir une faiblesse si la souris est employée dans un contexte d'étude de facteurs environnementaux favorisant la sévérité de la pathologie puisqu'il deviendra difficile, voire impossible, d'apprécier le degré d'implication du facteur testé. Aussi, on notera que la pénétrance de la maladie dans notre modèle est de 75% et non de 100%. Ceci laisse présager l'intervention d'éléments aléatoires non identifiés semblant être nécessaires au développement de l'atrophie villositaire.

#### **5.1.2 Caractérisation de la réponse CD4<sup>+</sup> spécifique du gluten**

Parallèlement au rôle fondamental de l'IL-15 dans le décours de la maladie, la réponse immunitaire adaptative médiée par les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten joue également un rôle essentiel dans sa pathogenèse. Nous avons pu démontrer l'effet protecteur d'une déplétion de cette population cellulaire. Ce même effet est également obtenu suite à l'absence de l'HLA-DQ8 et à l'inhibition de la tTGII ce qui atteste non seulement de la nécessité de cette réponse T dépendante mais aussi du besoin de l'amplifier pour conduire au développement de l'atrophie villositaire. Cependant, on

pourrait reprocher à l'expérience de déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> d'être non spécifique puisque c'est l'ensemble de ces cellules qui est éliminé et non pas la population des CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Néanmoins à ce jour, on ne dispose d'aucun outil permettant d'assurer cette propriété d'action. Aussi, l'étude de l'impact de cette réponse Th1 n'est pas une approche aisée dans la mesure où cette population s'avère oscillée entre 0,1 et 1,2% de l'ensemble des CD4<sup>+</sup> présents dans la muqueuse intestinale (372). L'étude de cette population via l'exploitation de notre modèle pourrait passer par l'isolation et l'enrichissement de la population totale des CD4<sup>+</sup> à partir de la Lp et des GM. Ensuite la technologie des tétramères des molécules de DQ8 chargées avec un peptide immunodominant du gluten pourrait-être exploitée afin d'identifier ou non la présence de cette population spécifique par cytométrie en flux (373). Si la possibilité d'isoler cette population s'avère être un succès, alors l'étude de son profil transcriptionnel pourrait être évaluée dans la souche IL-15<sup>LPxIEC</sup> et dans la souche DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> traitées avec un inhibiteur de la tTGII. Ces approches permettraient d'étudier le niveau d'activation de la réponse Th1 et pourquoi pas de la comparer directement au niveau d'activation des LIEs. Ceci permettrait donc de confirmer la nécessité du DQ8 et de l'activité de la tTGII dans l'amplification de la réponse CD4<sup>+</sup> spécifique du gluten et donc dans le développement de l'atrophie villositaire.

Parallèlement à cette approche, le laboratoire du Dr. Jabri travaille actuellement à l'obtention d'un modèle DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> TCR transgénique. À l'image du modèle TCR OT-II pour l'ovalbumine, les cellules T de ces souris présenteraient un TCR spécifique pour le gluten. Un tel modèle va permettre de contourner les difficultés liées à la rareté de cette population. Surtout, un tel outil va permettre une étude précise de la cinétique de cette réponse anti-gluten au cours du temps et permettre d'évaluer l'activation et l'expansion de cette réponse en parallèle de l'exposition au gluten. Ici aussi, l'exploitation des

inhibiteurs de la tTGII va permettre d'apprécier l'effet de la déamidation du gluten par cette enzyme sur l'amplitude de la réponse des CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten.

Finalement, de précédentes études réalisées par notre équipe ont permis d'identifier les séquences des TCRs ayant une spécificité pour la forme naïve de la gliadine, pour sa forme déamidée ainsi que pour chacune des deux formes lorsqu'elles sont présentées dans un contexte HLA-DQ8 (106). Un des objectifs du laboratoire est donc de générer ces modèles au TCR transgéniques et de les croiser au modèle DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup>. Une telle approche permettra la dissection de la dynamique de la réponse des lymphocytes CD4<sup>+</sup> à la gliadine ainsi que les conséquences de la déamidation de cette dernière.

### **5.1.3 Comparaison des molécules du HLA prédisposant à la maladie**

Le modèle développé dans ce travail est caractérisé par l'expression de l'haplotype HLA-DQ8 mais comme le révèle les études épidémiologiques, ce variant concerne entre 5-10% de la population cœliaque là où l'haplotype HLA-DQ2 couvrent les 90-95% restant, démontrant ainsi une susceptibilité bien plus élevée quant au développement de la pathologie. Les études dédiées à la biologie de ces variants proposent qu'ils puissent présenter des épitopes de gluten de nature différente. En effet, l'haplotype HLA-DQ8 serait capable de fixer des peptides de gluten natifs là où le variant HLA-DQ2 en serait incapable (101, 106, 374). Inversement, le spectre des peptides déamidés fixés par l'haplotype HLA-DQ2 serait plus large que celui de l'haplotype HLA-DQ8 (100, 123). Ces pistes pourraient expliquer les différences épidémiologiques entre ces deux variants. En conséquence, et bien qu'il ne s'agisse pas ici d'une limite à proprement parlé de notre modèle, ce dernier est insuffisant à lui seul que pour entamer des investigations dans ce domaine. Il serait donc très intéressant d'obtenir un variant DQ2-IL-15<sup>LPxIEC</sup> en plus de

l'actuel DQ8- IL-15<sup>LPxIEC</sup> afin de comparer le profil du développement de la maladie dans les deux modèles ou encore afin de tester la pénétrance de la pathologie selon les épitopes de gluten utilisés dans les deux modèles. Notre équipe travaille actuellement à l'obtention du modèle DQ2-IL-15<sup>LPxIEC</sup> par croisement de la souche IL-15<sup>LPxIEC</sup> avec une souche humanisée HLA-DQ2 récemment obtenue.

## **5.2 Exploitation du modèle**

### **5.2.1 Investigation des mécanismes contrôlant l'activation de la tTGII**

Comme nous l'avons vu, la littérature dispose de résultats démontrant que l'IFN- $\gamma$  est un des facteurs conduisant à l'activation de la tTGII (250, 311). Parallèlement à cela, notre modèle a démontré que la consommation de gluten s'accompagne d'une augmentation de la réponse en IFN- $\gamma$  dans la muqueuse intestinale et que ce même gluten est responsable de l'activation de la tTGII. En conséquence, une piste intéressante à investiguer est que la consommation de gluten permet l'activation de la tTGII via l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Une manière relativement aisée de vérifier cette hypothèse est de tester l'état d'activation de cette enzyme sur les coupes histologiques cryopréservées et issues des expériences de déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>. En effet, et tel que décrit dans la rubrique matériel et méthode, chacune de nos expériences est précédée d'une injection d'un substrat de l'enzyme, le 5-BP, dont la détection par marquage immunohistochimique atteste de l'état d'activation de l'enzyme. Si le signal s'avère négatif, ceci indiquera que la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> consommant du gluten présente une activation de l'enzyme suite à la réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten. Nous pourrions alors confirmer que cette population cellulaire active l'enzyme grâce à la production d'IFN- $\gamma$  en pratiquant de la même manière

sur les coupes histologiques cryopréservées issue des expériences de neutralisation de l'IFN- $\gamma$  dans les souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEL</sup> consommant du gluten. Il serait également intéressant d'évaluer si l'activation de cette enzyme nécessite l'amplification de la réponse T CD4<sup>+</sup> gluten spécifique via la présence de l'haplotype HLA-DQ8 puisque, même si elles présentent un état d'activation inférieur, les souris IL-15<sup>LPxIEC</sup> présentent tout de même des anticorps dirigés contre le gluten déamidé. Si l'hypothèse suivant laquelle la réponse Th1 conduit à l'activation de la tTGII s'avère correcte, alors on devrait observer un niveau d'activation de l'enzyme légèrement inférieure dans ces souris IL-15<sup>LPxIEC</sup> comparé au souris DQ8- IL-15<sup>LPxIEC</sup>.

Nous avons vu au point 1.3.2.2.C que le passage de la forme ouverte inactive à la forme ouverte active de la tTGII passe par une étape de réduction des ponts disulfures présents au niveau de son site catalytique (305). La thiorédoxine, une protéine notamment produite par les monocytes, semble assurer cette réduction et ainsi garantir la fonction de déamidation de l'enzyme (312, 375). Appliqué au contexte cœliaque, il serait intéressant d'évaluer le niveau d'expression de cette protéine dans la muqueuse intestinale des souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEL</sup> exposées ou non au gluten. Si l'expression transcriptionnelle de cette dernière est plus élevée dans les souris exposées au gluten, il s'agirait d'une bonne piste concernant la mécanistique d'activation de l'enzyme en présence de gluten. Aussi, on pourrait envisager de traiter notre modèle avec un inhibiteur de cette protéine en parallèle de la consommation de gluten et évaluer l'état d'activation de l'enzyme tel que décrit précédemment.

### **5.2.2 Investigation de la réponse CD8<sup>+</sup> cytotoxique**

Nous avons pu démontrer dans notre recherche que les cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques jouent un rôle fondamental dans la destruction du tissu épithélial puisque

la déplétion de ce type cellulaire s'accompagne d'une protection du tissu épithélial lorsque la souris est exposée au gluten. De nombreuses études ont suggéré que cette activité cytotoxique des CD8<sup>+</sup> à l'encontre de l'épithélium est médiée via une reprogrammation du phénotype des récepteurs NK, ce que nous avons également pu mettre en évidence dans cette population cellulaire. Néanmoins, d'autres études suggèrent également une implication possible du TCR en parallèle des récepteurs NK. Comme nous l'avons abordé au point 1.3.2.3.B, cette potentielle spécificité du TCR des cellules T CD8<sup>+</sup> pour le gluten reste une énigme dans le domaine. Une expérience simple basée sur l'utilisation de notre modèle consisterait à étudier la population des cellules T CD8<sup>+</sup> issues de l'épithélium et de la Lp de ces souris exposées au gluten tel que décrit précédemment. La technologie des tétramères de CMH de classe I chargés avec un peptide immunodominant du gluten peut ensuite être exploitée afin d'identifier ou non la présence de cette population spécifique par cytométrie en flux. Aussi, cette technologie permettrait de tester la spécificité des cellules T CD8<sup>+</sup> pour différentes séquences immunogéniques du gluten.

Un deuxième élément qu'il faut bien intégrer concernant la biologie des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques appliquée à la MC est que leur capacité à médier la destruction du tissu épithélial repose sur des signaux issus de l'immunité adaptative et de signaux issus de l'immunité innée. L'hypothèse initiale fût que l'immunité adaptative, via les cellules T CD4<sup>+</sup> gluten spécifiques restreintes au DQ8, fournit l'aide nécessaire aux cellules T CD8<sup>+</sup> dans les GM et la Lp afin de les licencier pour la destruction du tissu épithélial. Néanmoins, ce signal adaptatif ne suffit pas, tel qu'observé dans notre modèle DQ8-IL-15<sup>LP</sup>. Il faut également une signalisation innée, fournie ici par l'IL-15 transprésentée par l'épithélium à ces cellules T CD8<sup>+</sup> et leur indiquant la présence d'une cible pour leur activité cytotoxique. Il serait donc intéressant d'étoffer cette observation faite dans notre modèle en étudiant le profil transcriptionnel des cellules T CD8<sup>+</sup> intraépithéliales des souris DQ8-

IL-15<sup>LPxIEC</sup> sous gluten, des souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> sous gluten mais déplétées de leur cellules T CD4<sup>+</sup> et finalement des souris DQ8-IL-15<sup>LP</sup>. Une telle approche nous permettrait d'objectiver les voies de signalisations sur lesquelles l'IL-15 et les CD4<sup>+</sup> agissent séparément puis, ensembles.

### **5.2.3 Investigation du rôle de la réponse humorale**

Le développement de notre modèle a permis de confirmer le statut de la MC comme une pathologie principalement orchestrée par les lymphocytes T. En parallèle de cette réponse immunitaire gouvernée par les cellules T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, la maladie se caractérise également par une réponse humorale intestinale puissante, traduite par une importante plasmocytose dans la Lp du patient et par une production massive d'anticorps dirigés contre le gluten et d'auto-anticorps dirigés contre la tTGII. Aussi, et comme nous l'avons vu, les titres sériques de ces anticorps anti-tTGII corrélaient directement avec le degré de sévérité des lésions observées au niveau du tissu épithélial (163-165). En parallèle de cette présence dans le torrent circulatoire, l'apparition de dépôts de ces anticorps à la surface épithéliale et en bordure de la membrane basale épithéliale précède l'apparition des lésions intestinales (182, 184, 281). Ces deux observations semblent incriminer ces anticorps dans la pathogenèse de la maladie mais leurs rôles précis restent nébuleux, le peu de données actuelles résultent principalement d'études *in vitro*. Aussi, l'implication générale des lymphocytes B dans la pathogenèse de la maladie est un domaine encore très peu exploité, notamment suite à l'absence de modèle *in vivo*.

Néanmoins, et de manière plus globale, le rôle de ces cellules dans le développement des pathologies auto-immunes présente depuis plusieurs années un certain regain d'intérêt. Celui-ci s'explique dans la mesure où les thérapies de déplétion ont présenté un avantage clinique certain dans plusieurs de ces pathologies telles le

diabète de type I ou la polyarthrite rhumatoïde (285, 376). Dès lors, nous avons une opportunité unique d'investiguer *in vivo* la contribution des cellules B dans le développement de la maladie en exploitant notre modèle murin. Le rationnel derrière une telle investigation repose sur 3 éléments clés des cellules B. Premièrement ce sont d'excellentes CPA, elles pourraient donc directement amplifier la réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten en présentant directement le gluten déamidé à ces cellules. Deuxièmement, elles peuvent sécréter toute une batterie de cytokines qui, dans un contexte pro-inflammatoire, pourraient également amplifier la réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> voir même celle des cellules T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Finalement, elles évoluent en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et le rôle potentiellement pathogénique des anticorps ciblant la tTGII n'a pas encore été investigué *in vivo*.

Tout comme les expériences réalisées pour la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> et des cellules T CD8<sup>+</sup>, l'objectif est ici de dépléter notre modèle murin de ses cellules B via l'injection d'un anticorps déplétant tout en conduisant l'exposition au gluten. Les conséquences de l'absence des cellules B seront alors évaluées sur les caractéristiques du développement de la pathologie puis sur le profil de la réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> spécifiques du gluten, comparativement aux souris non déplétées. En ce qui concerne le rôle potentiellement pathogénique des anticorps anti-tTGII, des transferts passifs de sérum de patients cœliaques comportant des taux sériques élevés en ces anticorps pourraient être effectués dans notre modèle afin d'évaluer s'ils induisent ou exacerbent le développement des caractéristiques de la maladie. Finalement, le croisement de notre actuel modèle avec une souche présentant des cellules B capables de maturer sans sécréter d'anticorps pourrait également être envisagée afin de ségréger le rôle joué par les cellules B en tant que tel de celui joué par les anticorps qu'elles produisent.

Une telle approche nous permettrait d'apporter pour la première fois une certaine lumière sur le rôle joué par la réponse humorale dans le décours de la maladie tout en apportant une pièce supplémentaire à la résolution du puzzle de sa pathogenèse. Aussi, l'identification d'un potentiel rôle délétère des lymphocytes B au travers de leur différentes fonctions permettrait de valider leur inscription dans la liste des potentielles cibles thérapeutiques apportant une alternative à la diète sans gluten. Enfin, et de manière similaire au travail présenté dans ce manuscrit, la compréhension de leur rôle dans la pathologie cœliaque permettra très certainement une translation de ces notions appliquées à d'autres pathologies auto-immunes.

#### **5.2.4 Investigation du rôle du microbiome intestinal**

Les pathologies auto-immunes inflammatoires, bien que fondamentalement différentes dans leurs phénotypes, semblent avoir en commun cette nécessité d'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux, lesquelles conduisent au développement d'une réponse immunitaire complexe au niveau du tissu cible, ce dernier étant finalement détruit. La MC n'échappe pas à la règle et ce travail nous a permis d'illustrer le concept suivant lequel la réponse immunitaire complexe qui y est associée résulte d'interactions entre un fond génétique particulier et la consommation de gluten. D'autres éléments environnementaux sont néanmoins suspectés dans la survenue de la pathologie tels que l'âge d'instauration du gluten dans l'alimentation, les infections intestinales ou encore la composition du microbiome de l'individu. L'implication et la coopération de ces facteurs dans la pathologie ne sont pas encore élucidées mais leur compréhension pourrait orienter les futures thérapies proposées aux patients et constitue donc un domaine à ne pas ignorer.

Notamment, le microbiome est un sujet particulièrement intéressant dans ce champ de recherche dans la mesure où de nombreuses études ont déjà pu relever son implication dans les pathologies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, le diabète de type I ou même l'obésité (25, 136, 270). Tel que discuté au point 1.2.5.2.B, les études concernant le microbiome dans le cadre cœliaque sont encore jeunes mais les données épidémiologiques comparant les facteurs influençant la composition du microbiome et le risque de développer la pathologie ou encore celles pointant une dysbiose chez les individus cœliaques soulignent un certain rôle potentiel de ce facteur environnemental (94, 137-139). Au niveau mécanistique, il y a deux idées. Premièrement, la présence ou l'absence de genres bactériens particuliers chez les individus cœliaques pourrait déréguler la balance entre les genres anti-inflammatoires et pro-inflammatoires, favorisant dès lors le développement de la pathologie chez les individus prédisposés. Deuxièmement, les genres bactériens ont des activités catalytiques différentes, certaines favorisant un catabolisme du gluten vers des épitopes plus ou moins immunogènes. Toute dysbiose du microbiome peut donc faire pencher la balance vers une plus grande concentration d'épitopes immunogènes selon le genre favorisé.

L'exploitation de notre modèle murin permettrait donc d'investiguer davantage ces pistes et d'évaluer si des modulations du microbiome influencent la sensibilité au gluten. Un traitement par antibiotique ou encore une déclinaison axénique de la souris DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> permettrait d'évaluer le développement de la pathologie suite à la consommation de gluten en l'absence de tout acteur microbien.

Si ces souris axéniques ne développent pas la pathologie, ceci atteste d'un rôle certain du microbiome dans le développement de la pathologie. Une forme gnotoxénique pourrait alors être développée, l'avantage de cette dernière étant de contrôler l'ajout

d'un ou plusieurs micro-organismes connus. Cette approche nous permettrait dès lors d'identifier directement les genres bactériens impliqués dans le développement de la pathologie. Au contraire, si l'absence du microbiome favorise le développement d'une forme encore plus sévère de la pathologie, ceci orienterait plutôt la discussion vers le rôle immunorégulateur de la flore bactérienne intestinale. Gardons cependant à l'esprit qu'une telle approche ne reflète pas les conditions cliniques réelles du patient cœliaque. Néanmoins, elle permettrait de comprendre davantage comment un déséquilibre du microbiome présente des répercussions non négligeables, en particulier si l'individu est génétiquement prédisposé au développement de la pathologie.

#### **5.2.5 Investigation de l'exposition précoce au gluten sur la perte de la tolérance orale**

Comme nous l'avons vu à la section 1.2.5.2.B, la MC se développe généralement chez le nourrisson et l'introduction du gluten avant 4 mois ou après 6 mois d'âge semble encourager le développement de la maladie chez les jeunes individus prédisposés. Parallèlement à cela, les études sur la TO ont mis en évidence l'existence d'une période prénatale et postnatale précoce ou l'exposition à certains antigènes protéiques alimentaires conduit à une activation du système immunitaire plutôt qu'au développement de la TO. Ces différents aspects pourraient donc pour la première fois bénéficier d'une étude *in vivo* via l'exploitation du modèle proposé dans cet écrit. Différents protocoles pourraient ainsi être testés afin d'évaluer l'impact du gluten en fonction de la période à laquelle il est introduit dans l'alimentation. Premièrement, une exposition prénatale au gluten via la présence de cet antigène alimentaire dans la diète des femelles gestantes pourrait être considéré quant à sa capacité à induire ou non une entéropathie dans les portées. Ensuite, l'introduction du gluten chez la mère durant la période de sevrage pourrait également être une piste à investiguer en ce qui concerne la

présence de peptides de gluten dans le lait maternel. Finalement, une exposition de la portée juste après le sevrage est également à considérer. Les résultats permettraient d'évaluer si les mécanismes de la TO avant et après sevrage sont suffisants pour contrer le développement de la pathologie chez des individus génétiquement prédisposés et surexprimant l'IL-15 dans la muqueuse intestinale. Ce type d'expérimentation nécessiterait évidemment d'être particulièrement attentif à la dose de gluten employée, ainsi qu'à la durée d'exposition durant ces périodes précoces de la vie.

### **5.2.6 Investigation de nouvelles solutions thérapeutiques**

Pour conclure ce manuscrit, nous retiendrons que le développement et l'amélioration de notre modèle murin DQ8-IL-15<sup>LPxIEC</sup> a pour objectif de faire évoluer notre compréhension de la MC. La résolution des mécanismes conduisant à sa pathogenèse aboutira bien évidemment à l'identification de nouveaux acteurs pouvant s'inscrire comme potentielles cibles thérapeutiques. C'est ici que la force préclinique de notre modèle prend tout son sens puisqu'en plus d'être instructif, il va nous permettre de directement tester le rationnel de cibler ces acteurs dans le cadre d'une recherche thérapeutique. Nous avons déjà pu démontrer des résultats très encourageants quant à l'inhibition de l'IL-15 ou de la tTGII. De nouvelles cibles seront très probablement identifiées et évaluées, encourageant ainsi le développement de thérapies alternatives à la diète sans gluten qui, comme nous l'avons vu, est lourde de conséquences voir inefficace en ce qui concerne les patients réfractaires. Ainsi, la recherche dans le domaine de la MC est encore longue, mais une chose est certaine, elle n'en demeure pas moins excitante et la perspicacité des leaders de son domaine lui assure de beaux jours.

## Chapitre 6. Références bibliographiques

1. Moog F. The lining of the small intestine. *Sci Am.* 1981;245(5):154-8, 60, 62 et passiom.
2. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667-85.
3. Brandtzaeg P. Development and basic mechanisms of human gut immunity. *Nutr Rev.* 1998;56(1 Pt 2):S5-18.
4. Dey I, Bradbury NA. Physiology of the Gut: Experimental Models for Investigating Intestinal Fluid and Electrolyte Transport. *Curr Top Membr.* 2018;81:337-81.
5. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev.* 2005;206:232-59.
6. Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol.* 2009;70(6):505-15.
7. Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(4):331-41.
8. Jung C, Hugot JP, Barreau F. Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam.* 2010;2010:823710.
9. Ohno H. Intestinal M cells. *J Biochem.* 2016;159(2):151-60.
10. Pabst O, Herbrand H, Worbs T, Friedrichsen M, Yan S, Hoffmann MW, et al. Cryptopatches and isolated lymphoid follicles: dynamic lymphoid tissues dispensable for the generation of intraepithelial lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2005;35(1):98-107.
11. Macpherson AJ, Smith K. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med.* 2006;203(3):497-500.
12. Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann MW, Hintzen G, Bernhardt G, et al. Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med.* 2006;203(3):519-27.
13. Spahn TW, Herbst H, Rennert PD, Lügering N, Maaser C, Kraft M, et al. Induction of colitis in mice deficient of Peyer's patches and mesenteric lymph nodes is associated with increased disease severity and formation of colonic lymphoid patches. *Am J Pathol.* 2002;161(6):2273-82.
14. van Wijk F, Cheroutre H. Mucosal T cells in gut homeostasis and inflammation. *Expert Rev Clin Immunol.* 2010;6(4):559-66.
15. Cerutti A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. *Mucosal Immunol.* 2008;1(1):8-10.
16. Cerf-Bensussan N, Guy-Grand D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol Clin North Am.* 1991;20(3):549-76.
17. Olivares-Villagómez D, Van Kaer L. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends Immunol.* 2018;39(4):264-75.

18. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90(3):859-904.
19. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):6578-83.
20. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol.* 2010;107:243-74.
21. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* 2015;36(1):3-12.
22. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veeken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature.* 2013;504(7480):451-5.
23. Smith PM, Howitt MR, Panikov N, Michaud M, Gallini CA, Bohlooly-Y M, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science.* 2013;341(6145):569-73.
24. Pabst O, Mowat AM. Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* 2012;5(3):232-9.
25. Maloy KJ, Powrie F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature.* 2011;474(7351):298-306.
26. Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006;5(3):179-90.
27. Kapp K, Maul J, Hostmann A, Mundt P, Preiss JC, Wenzel A, et al. Modulation of systemic antigen-specific immune responses by oral antigen in humans. *Eur J Immunol.* 2010;40(11):3128-37.
28. Husby S, Mestecky J, Moldoveanu Z, Holland S, Elson CO. Oral tolerance in humans. T cell but not B cell tolerance after antigen feeding. *J Immunol.* 1994;152(9):4663-70.
29. Rezende RM, Weiner HL. History and mechanisms of oral tolerance. *Semin Immunol.* 2017;30:3-11.
30. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007;204(8):1757-64.
31. Pabst O, Bernhardt G, Förster R. The impact of cell-bound antigen transport on mucosal tolerance induction. *J Leukoc Biol.* 2007;82(4):795-800.
32. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med.* 2007;204(8):1775-85.
33. Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol.* 2001;2(11):1004-9.

34. Hadis U, Wahl B, Schulz O, Hardtke-Wolenski M, Schippers A, Wagner N, et al. Intestinal tolerance requires gut homing and expansion of FoxP3+ regulatory T cells in the lamina propria. *Immunity*. 2011;34(2):237-46.
35. Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes JL, et al. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med*. 2008;205(9):2139-49.
36. Cassani B, Villablanca EJ, Quintana FJ, Love PE, Lacy-Hulbert A, Blaner WS, et al. Gut-tropic T cells that express integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 are required for induction of oral immune tolerance in mice. *Gastroenterology*. 2011;141(6):2109-18.
37. Chen Y, Inobe J, Marks R, Gonnella P, Kuchroo VK, Weiner HL. Peripheral deletion of antigen-reactive T cells in oral tolerance. *Nature*. 1995;376(6536):177-80.
38. Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(6):407-19.
39. Freeman HJ. Celiac disease: a disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut Liver*. 2015;9(1):28-37.
40. Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Mol Aspects Med*. 2005;26(6):421-58.
41. Malamut G, Meresse B, Cellier C, Cerf-Bensussan N. [Celiac disease in 2009: a future without gluten-free diet?]. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009;33(8-9):635-47.
42. Dowd B, Walker-Smith J, Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *Br Med J*. 1974;2(5909):45-7.
43. VAN DE KAMER JH, WEIJERS HA, DICKE WK. Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr*. 1953;42(3):223-31.
44. PAULLEY JW. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J*. 1954;2(4900):1318-21.
45. ANDERSON CM. Histological changes in the duodenal mucosa in coeliac disease. Reversibility during treatment with a wheat gluten free diet. *Arch Dis Child*. 1960;35:419-27.
46. Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med*. 2007;357(17):1731-43.
47. Howell MD, Austin RK, Kelleher D, Nepom GT, Kagnoff MF. An HLA-D region restriction fragment length polymorphism associated with celiac disease. *J Exp Med*. 1986;164(1):333-8.
48. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169(1):345-50.
49. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992;102(1):330-54.

50. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997;3(7):797-801.
51. Dieterich W, Laag E, Schöpper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1317-21.
52. Volta U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):96-102.
53. Sturgess RP, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Cereal chemistry, molecular biology, and toxicity in coeliac disease. *Gut*. 1991;32(9):1055-60.
54. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr Suppl*. 1996;412:3-9.
55. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C. Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;283(4):G996-G1003.
56. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM, et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002;297(5590):2275-9.
57. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, Ellis HJ, Nelufer JM, Ciclitira PJ. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol*. 1995;30(8):758-63.
58. Ellis HJ, Ciclitira PJ. In vivo gluten challenge in celiac disease. *Can J Gastroenterol*. 2001;15(4):243-7.
59. Martucci S, Fraser JS, Biagi F, Corazza GR, Ciclitira PJ, Ellis HJ. Characterizing one of the DQ2 candidate epitopes in coeliac disease: A-gliadin 51-70 toxicity assessed using an organ culture system. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15(12):1293-8.
60. Shan L, Qiao SW, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Gray GM, Sollid LM, et al. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *J Proteome Res*. 2005;4(5):1732-41.
61. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54(1):136-60.
62. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet*. 2009;373(9673):1480-93.
63. Downey L, Houten R, Murch S, Longson D, Group GD. Recognition, assessment, and management of coeliac disease: summary of updated NICE guidance. *BMJ*. 2015;351:h4513.
64. Lebowohl B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *Lancet*. 2018;391(10115):70-81.
65. Murray JA, Watson T, Clearman B, Mitros F. Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):669-73.

66. Bascuñán KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr.* 2017;56(2):449-59.
67. Rubio-Tapia A, Murray JA. Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut.* 2010;59(4):547-57.
68. Daum S, Cellier C, Mulder CJ. Refractory coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19(3):413-24.
69. Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010;7(4):204-13.
70. Newton KP, Singer SA. Celiac disease in children and adolescents: special considerations. *Semin Immunopathol.* 2012;34(4):479-96.
71. Green PH, Fleischauer AT, Bhagat G, Goyal R, Jabri B, Neugut AI. Risk of malignancy in patients with celiac disease. *Am J Med.* 2003;115(3):191-5.
72. Fasano A, Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012;367(25):2419-26.
73. Mooney PD, Hadjivassiliou M, Sanders DS. Coeliac disease. *BMJ.* 2014;348:g1561.
74. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease--active, silent, latent, potential. *Gut.* 1993;34(2):150-1.
75. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001;120(3):636-51.
76. Chand N, Mihas AA. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(1):3-14.
77. van Gils T, Nijeboer P, van Wanrooij RL, Bouma G, Mulder CJ. Mechanisms and management of refractory coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;12(10):572-9.
78. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26(9):1217-25.
79. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:493-525.
80. Murray JA, Van Dyke C, Plevak MF, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, Melton LJ. Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2003;1(1):19-27.
81. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163(3):286-92.
82. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42(8):587-95.

83. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*. 2012;18(42):6036-59.
84. Freeman HJ, Chopra A, Clandinin MT, Thomson AB. Recent advances in celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2011;17(18):2259-72.
85. Pham-Short A, Donaghue KC, Ambler G, Phelan H, Twigg S, Craig ME. Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *Pediatrics*. 2015;136(1):e170-6.
86. Ch'ng CL, Jones MK, Kingham JG. Celiac disease and autoimmune thyroid disease. *Clin Med Res*. 2007;5(3):184-92.
87. Chow MA, Lebwohl B, Reilly NR, Green PH. Immunoglobulin A deficiency in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(10):850-4.
88. Mårild K, Størdal K, Hagman A, Ludvigsson JF. Turner Syndrome and Celiac Disease: A Case-Control Study. *Pediatrics*. 2016;137(2):e20152232.
89. Du Y, Shan LF, Cao ZZ, Feng JC, Cheng Y. Prevalence of celiac disease in patients with Down syndrome: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2018;9(4):5387-96.
90. Lionetti E, Gatti S, Pulvirenti A, Catassi C. Celiac disease from a global perspective. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):365-79.
91. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*. 2009;137(1):88-93.
92. Nisticò L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R, Limongelli MG, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*. 2006;55(6):803-8.
93. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002;50(5):624-8.
94. Girbovan A, Sur G, Samasca G, Lupan I. Dysbiosis a risk factor for celiac disease. *Med Microbiol Immunol*. 2017;206(2):83-91.
95. 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.
96. Brown JJ, Jabri B, Dermody TS. A viral trigger for celiac disease. *PLoS Pathog*. 2018;14(9):e1007181.
97. Mangalam AK, Taneja V, David CS. HLA class II molecules influence susceptibility versus protection in inflammatory diseases by determining the cytokine profile. *J Immunol*. 2013;190(2):513-8.
98. Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993;105(3):910-22.
99. Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A, Fu J, et al. Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology*. 2009;137(3):834-40, 40.e1-3.

100. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4175-9.
101. Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T, et al. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity*. 2007;27(1):23-34.
102. Bergseng E, Sidney J, Sette A, Sollid LM. Analysis of the binding of gluten T-cell epitopes to various human leukocyte antigen class II molecules. *Hum Immunol*. 2008;69(2):94-100.
103. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*. 1998;4(6):713-7.
104. Vader LW, de Ru A, van der Wal Y, Kooy YM, Benckhuijsen W, Mearin ML, et al. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*. 2002;195(5):643-9.
105. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity*. 2012;36(6):907-19.
106. Hovhannisyan Z, Weiss A, Martin A, Wiesner M, Tollefsen S, Yoshida K, et al. The role of HLA-DQ8 beta57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. *Nature*. 2008;456(7221):534-8.
107. Qiao SW, Bergseng E, Molberg O, Jung G, Fleckenstein B, Sollid LM. Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol*. 2005;175(1):254-61.
108. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(9):647-55.
109. Murray JA, Moore SB, Van Dyke CT, Lahr BD, Dierkhising RA, Zinsmeister AR, et al. HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007;5(12):1406-12.
110. Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12390-5.
111. Bajor J, Szakács Z, Farkas N, Hegyi P, Illés A, Solymár M, et al. Classical celiac disease is more frequent with a double dose of HLA-DQB1\*02: A systematic review with meta-analysis. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212329.
112. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*. 2003;64(4):469-77.
113. van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(3):323-39.

114. van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nat Genet.* 2007;39(7):827-9.
115. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet.* 2011;43(12):1193-201.
116. Sharma A, Liu X, Hadley D, Hagopian W, Liu E, Chen WM, et al. Identification of Non-HLA Genes Associated with Celiac Disease and Country-Specific Differences in a Large, International Pediatric Cohort. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152476.
117. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, et al. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.* 2008;40(4):395-402.
118. Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet.* 2010;42(4):295-302.
119. Greco L, Corazza G, Babron MC, Clot F, Fulchignoni-Lataud MC, Percopo S, et al. Genome search in celiac disease. *Am J Hum Genet.* 1998;62(3):669-75.
120. Withoff S, Li Y, Jonkers I, Wijmenga C. Understanding Celiac Disease by Genomics. *Trends Genet.* 2016;32(5):295-308.
121. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22(4):639-60.
122. Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 1998;115(3):551-63.
123. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(12):858-70.
124. Sarra M, Cupi ML, Monteleone I, Franzè E, Ronchetti G, Di Sabatino A, et al. IL-15 positively regulates IL-21 production in celiac disease mucosa. *Mucosal Immunol.* 2013;6(2):244-55.
125. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med.* 2005;201(1):139-48.
126. Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H, Ek J, Gudjónsdóttir AH, Wahlström J, et al. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens.* 2004;64(5):593-9.
127. Hunt KA, McGovern DP, Kumar PJ, Ghosh S, Travis SP, Walters JR, et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet.* 2005;13(4):440-4.
128. Popat S, Hearle N, Hogberg L, Braegger CP, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Variation in the CTLA4/CD28 gene region confers an increased risk of coeliac disease. *Ann Hum Genet.* 2002;66(Pt 2):125-37.

129. Monsuur AJ, de Bakker PI, Alizadeh BZ, Zhernakova A, Bevova MR, Strengman E, et al. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nat Genet.* 2005;37(12):1341-4.
130. Hunt KA, Monsuur AJ, McArdle WL, Kumar PJ, Travis SP, Walters JR, et al. Lack of association of MYO9B genetic variants with coeliac disease in a British cohort. *Gut.* 2006;55(7):969-72.
131. Cho JH, Feldman M. Heterogeneity of autoimmune diseases: pathophysiologic insights from genetics and implications for new therapies. *Nat Med.* 2015;21(7):730-8.
132. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet.* 2003;362(9377):30-7.
133. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AV. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med.* 2000;6(3):337-42.
134. Mazzarella G, Maglio M, Paparo F, Nardone G, Stefanile R, Greco L, et al. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut.* 2003;52(1):57-62.
135. Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med.* 2000;191(4):603-12.
136. Murphy SF, Kwon JH, Boone DL. Novel players in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr Gastroenterol Rep.* 2012;14(2):146-52.
137. Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol.* 2009;62(3):264-9.
138. Di Cagno R, De Angelis M, De Pasquale I, Ndagijimana M, Vernocchi P, Ricciuti P, et al. Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiol.* 2011;11:219.
139. Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, de Morales JM, et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(4):649-56.
140. De Palma G, Nadal I, Collado MC, Sanz Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *Br J Nutr.* 2009;102(8):1154-60.
141. Kalliomäki M, Satokari R, Lähteenoja H, Vähämiko S, Grönlund J, Routi T, et al. Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;54(6):727-32.

142. Forsberg G, Fahlgren A, Hörstedt P, Hammarström S, Hernell O, Hammarström ML. Presence of bacteria and innate immunity of intestinal epithelium in childhood celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2004;99(5):894-904.
143. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(10):2333-40.
144. Zanoni G, Navone R, Lunardi C, Tridente G, Bason C, Sivori S, et al. In celiac disease, a subset of autoantibodies against transglutaminase binds toll-like receptor 4 and induces activation of monocytes. *PLoS Med*. 2006;3(9):e358.
145. Dolcino M, Zanoni G, Bason C, Tinazzi E, Boccola E, Valletta E, et al. A subset of anti-rotavirus antibodies directed against the viral protein VP7 predicts the onset of celiac disease and induces typical features of the disease in the intestinal epithelial cell line T84. *Immunol Res*. 2013;56(2-3):465-76.
146. Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr*. 2000;89(2):165-71.
147. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE, et al. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA*. 2005;293(19):2343-51.
148. Silano M, Agostoni C, Sanz Y, Guandalini S. Infant feeding and risk of developing celiac disease: a systematic review. *BMJ Open*. 2016;6(1):e009163.
149. Aronsson CA, Lee HS, Liu E, Uusitalo U, Hummel S, Yang J, et al. Age at gluten introduction and risk of celiac disease. *Pediatrics*. 2015;135(2):239-45.
150. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, et al. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med*. 2014;371(14):1295-303.
151. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, Castillejo G, Chmielewska A, Crespo Escobar P, et al. Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med*. 2014;371(14):1304-15.
152. Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach--some lessons to be learnt. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(3):425-40.
153. Farrell RJ. Infant gluten and celiac disease: too early, too late, too much, too many questions. *JAMA*. 2005;293(19):2410-2.
154. Szajewska H, Shamir R, Chmielewska A, Pieścik-Lech M, Auricchio R, Ivarsson A, et al. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease--update 2015. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(11):1038-54.
155. Vilppula A, Collin P, Mäki M, Valve R, Luostarinen M, Krekelä I, et al. Undetected coeliac disease in the elderly: a biopsy-proven population-based study. *Dig Liver Dis*. 2008;40(10):809-13.

156. Leffler DA, Green PH, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12(10):561-71.
157. Han Y, Chen W, Li P, Ye J. Association Between Coeliac Disease and Risk of Any Malignancy and Gastrointestinal Malignancy: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(38):e1612.
158. Catassi C, Fasano A. Celiac disease diagnosis: simple rules are better than complicated algorithms. *Am J Med*. 2010;123(8):691-3.
159. Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. *Biomed Pharmacother*. 2000;54(7):368-72.
160. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2006;131(6):1981-2002.
161. Brar P, Kwon GY, Egbuna II, Holleran S, Ramakrishnan R, Bhagat G, et al. Lack of correlation of degree of villous atrophy with severity of clinical presentation of coeliac disease. *Dig Liver Dis*. 2007;39(1):26-9; discussion 30-2.
162. Malamut G, Matysiak-Budnik T, Grosdider E, Jais JP, Morales E, Damotte D, et al. Adult celiac disease with severe or partial villous atrophy: a comparative study. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008;32(3):236-42.
163. Rahmati A, Shakeri R, Sohrabi M, Alipour A, Boghratian A, Setareh M, et al. Correlation of tissue transglutaminase antibody with duodenal histologic marsh grading. *Middle East J Dig Dis*. 2014;6(3):131-6.
164. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. Prevalence of antitissue transglutaminase antibodies in different degrees of intestinal damage in celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2003;36(3):219-21.
165. Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, Radice A, Licini L, Sonzogni A, et al. Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;55(1):44-9.
166. Baudon JJ, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougnot JF. Diagnosing celiac disease: a comparison of human tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158(6):584-8.
167. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho KL, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1322-8.
168. Schwertz E, Kahlenberg F, Sack U, Richter T, Stern M, Conrad K, et al. Serologic assay based on gliadin-related nonapeptides as a highly sensitive and specific diagnostic aid in celiac disease. *Clin Chem*. 2004;50(12):2370-5.
169. James MW, Scott BB. Endomysial antibody in the diagnosis and management of coeliac disease. *Postgrad Med J*. 2000;76(898):466-8.

170. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005;128(4 Suppl 1):S38-46.
171. Hill PG, McMillan SA. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. *Ann Clin Biochem*. 2006;43(Pt 2):105-17.
172. O'Farrelly C, Kelly J, Hekkens W, Bradley B, Thompson A, Feighery C, et al. Alpha gliadin antibody levels: a serological test for coeliac disease. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;286(6383):2007-10.
173. Mäki M. The humoral immune system in coeliac disease. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 1995;9(2):231-49.
174. Arigliani M, Rech Morassutti F, Fabris M, Melli P, Tonutti E, Cogo P. Coeliac disease in infants: antibodies to deamidated gliadin peptide come first! *Ital J Pediatr*. 2017;43(1):70.
175. McGowan KE, Lyon ME, Butzner JD. Celiac disease and IgA deficiency: complications of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clin Chem*. 2008;54(7):1203-9.
176. Dahlbom I, Olsson M, Forooz NK, Sjöholm AG, Truedsson L, Hansson T. Immunoglobulin G (IgG) anti-tissue transglutaminase antibodies used as markers for IgA-deficient celiac disease patients. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(2):254-8.
177. Marzari R, Sblattero D, Florian F, Tongiorgi E, Not T, Tommasini A, et al. Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol*. 2001;166(6):4170-6.
178. Shiner M, Ballard J. Antigen-antibody reactions in jejunal mucosa in childhood coeliac disease after gluten challenge. *Lancet*. 1972;1(7762):1202-5.
179. Salmi TT, Collin P, Korponay-Szabó IR, Laurila K, Partanen J, Huhtala H, et al. Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut*. 2006;55(12):1746-53.
180. Korponay-Szabó IR, Sulkanen S, Halttunen T, Maurano F, Rossi M, Mazzarella G, et al. Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000;31(5):520-7.
181. Korponay-Szabó IR, Halttunen T, Szalai Z, Laurila K, Király R, Kovács JB, et al. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*. 2004;53(5):641-8.
182. Kaukinen K, Peräaho M, Collin P, Partanen J, Woolley N, Kaartinen T, et al. Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(5):564-72.
183. Salmi TT, Collin P, Järvinen O, Haimila K, Partanen J, Laurila K, et al. Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006;24(3):541-52.

184. Koskinen O, Collin P, Lindfors K, Laurila K, Mäki M, Kaukinen K. Usefulness of small-bowel mucosal transglutaminase-2 specific autoantibody deposits in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44(7):483-8.
185. Piccini B, Vascotto M, Serracca L, Luddi A, Margollicci MA, Balestri P, et al. HLA-DQ typing in the diagnostic algorithm of celiac disease. *Rev Esp Enferm Dig*. 2012;104(5):248-54.
186. Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, et al. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med*. 2007;147(5):294-302.
187. Clouzeau-Girard H, Rebouissoux L, Taupin JL, Le Bail B, Kalach N, Michaud L, et al. HLA-DQ genotyping combined with serological markers for the diagnosis of celiac disease: is intestinal biopsy still mandatory? *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;52(6):729-33.
188. Haines ML, Anderson RP, Gibson PR. Systematic review: The evidence base for long-term management of coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;28(9):1042-66.
189. Wahab PJ, Meijer JW, Mulder CJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(3):459-63.
190. Kaukinen K, Peräaho M, Lindfors K, Partanen J, Woolley N, Pikkarainen P, et al. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(10):1237-45.
191. Rubio-Tapia A, Rahim MW, See JA, Lahr BD, Wu TT, Murray JA. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(6):1412-20.
192. Caio G, Volta U, Ursini F, Manfredini R, De Giorgio R. Small bowel adenocarcinoma as a complication of celiac disease: clinical and diagnostic features. *BMC Gastroenterol*. 2019;19(1):45.
193. Snyder J, Butzner JD, DeFelice AR, Fasano A, Guandalini S, Liu E, et al. Evidence-Informed Expert Recommendations for the Management of Celiac Disease in Children. *Pediatrics*. 2016;138(3).
194. Errichiello S, Esposito O, Di Mase R, Camarca ME, Natale C, Limongelli MG, et al. Celiac disease: predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(1):54-60.
195. Fabiani E, Taccari LM, Rättsch IM, Di Giuseppe S, Coppa GV, Catassi C. Compliance with gluten-free diet in adolescents with screening-detected celiac disease: a 5-year follow-up study. *J Pediatr*. 2000;136(6):841-3.
196. Hall NJ, Rubin G, Charnock A. Systematic review: adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;30(4):315-30.
197. Malamut G, Cellier C. Complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):451-8.

198. Kaukinen K, Lindfors K. Novel treatments for celiac disease: glutenases and beyond. *Dig Dis*. 2015;33(2):277-81.
199. Lähdeaho ML, Lindfors K, Airaksinen L, Kaukinen K, Mäki M. Recent advances in the development of new treatments for celiac disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12(12):1589-600.
200. Lindfors K, Lähdeaho ML, Kalliokoski S, Kurppa K, Collin P, Mäki M, et al. Future treatment strategies for celiac disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(7):665-75.
201. Sollid LM, Khosla C. Novel therapies for coeliac disease. *J Intern Med*. 2011;269(6):604-13.
202. Yoosuf S, Makharia GK. Evolving Therapy for Celiac Disease. *Front Pediatr*. 2019;7:193.
203. Gass J, Bethune MT, Siegel M, Spencer A, Khosla C. Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with celiac sprue. *Gastroenterology*. 2007;133(2):472-80.
204. Duar RM, Clark KJ, Patil PB, Hernández C, Brüning S, Burkey TE, et al. Identification and characterization of intestinal lactobacilli strains capable of degrading immunotoxic peptides present in gluten. *J Appl Microbiol*. 2015;118(2):515-27.
205. Moreno Amador ML, Arévalo-Rodríguez M, Durán EM, Martínez Reyes JC, Sousa Martín C. A new microbial gluten-degrading prolyl endopeptidase: Potential application in celiac disease to reduce gluten immunogenic peptides. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218346.
206. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, de Ru A, Baak-Pablo R, et al. Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(4):G621-9.
207. Tack GJ, van de Water JM, Bruins MJ, Kooy-Winkelaar EM, van Bergen J, Bonnet P, et al. Consumption of gluten with gluten-degrading enzyme by celiac patients: a pilot-study. *World J Gastroenterol*. 2013;19(35):5837-47.
208. Daveson AJM, Ee HC, Andrews JM, King T, Goldstein KE, Dzuris JL, et al. Epitope-Specific Immunotherapy Targeting CD4-Positive T Cells in Celiac Disease: Safety, Pharmacokinetics, and Effects on Intestinal Histology and Plasma Cytokines with Escalating Dose Regimens of Nexvax2 in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 1 Study. *EBioMedicine*. 2017;26:78-90.
209. Goel G, King T, Daveson AJ, Andrews JM, Krishnarajah J, Krause R, et al. Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017;2(7):479-93.
210. Siegel M, Khosla C. Transglutaminase 2 inhibitors and their therapeutic role in disease states. *Pharmacol Ther*. 2007;115(2):232-45.

211. Song M, Hwang H, Im CY, Kim SY. Recent Progress in the Development of Transglutaminase 2 (TGase2) Inhibitors. *J Med Chem*. 2017;60(2):554-67.
212. Sulic AM, Kurppa K, Rauhavirta T, Kaukinen K, Lindfors K. Transglutaminase as a therapeutic target for celiac disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(3):335-48.
213. Rauhavirta T, Oittinen M, Kivistö R, Männistö PT, Garcia-Horsman JA, Wang Z, et al. Are transglutaminase 2 inhibitors able to reduce gliadin-induced toxicity related to celiac disease? A proof-of-concept study. *J Clin Immunol*. 2013;33(1):134-42.
214. Cellier C, Bouma G, van Gils T, Khater S, Malamut G, Crespo L, et al. Safety and efficacy of AMG 714 in patients with type 2 refractory coeliac disease: a phase 2a, randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019.
215. Sestak K, Dufour JP, Liu DX, Rout N, Alvarez X, Blanchard J, et al. Beneficial Effects of Human Anti-Interleukin-15 Antibody in Gluten-Sensitive Rhesus Macaques with Celiac Disease. *Front Immunol*. 2018;9:1603.
216. Vicari AP, Schoepfer AM, Meresse B, Goffin L, Léger O, Josserand S, et al. Discovery and characterization of a novel humanized anti-IL-15 antibody and its relevance for the treatment of refractory celiac disease and eosinophilic esophagitis. *MAbs*. 2017;9(6):927-44.
217. Lähdeaho ML, Scheinin M, Vuotikka P, Taavela J, Popp A, Laukkarinen J, et al. Safety and efficacy of AMG 714 in adults with coeliac disease exposed to gluten challenge: a phase 2a, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2019.
218. Zimmer KP, Poremba C, Weber P, Ciclitira PJ, Harms E. Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. *Gut*. 1995;36(5):703-9.
219. Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Berti I, Tommasini A, et al. Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*. 2000;355(9214):1518-9.
220. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology*. 2008;135(1):194-204.e3.
221. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*. 2012;61(9):1355-64.
222. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR. Epithelial barriers in homeostasis and disease. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:119-44.
223. Tripathi A, Lammers KM, Goldblum S, Shea-Donohue T, Netzel-Arnett S, Buzza MS, et al. Identification of human zonulin, a physiological modulator of tight junctions, as prehaptoglobin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(39):16799-804.

224. Pizzuti D, Bortolami M, Mazzon E, Buda A, Guariso G, D'Odorico A, et al. Transcriptional downregulation of tight junction protein ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet. *Dig Liver Dis.* 2004;36(5):337-41.
225. Rauhavirta T, Lindfors K, Koskinen O, Laurila K, Kurppa K, Saavalainen P, et al. Impaired epithelial integrity in the duodenal mucosa in early stages of celiac disease. *Transl Res.* 2014;164(3):223-31.
226. Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC. Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett.* 2005;579(21):4851-5.
227. Thomas KE, Sapone A, Fasano A, Vogel SN. Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease. *J Immunol.* 2006;176(4):2512-21.
228. Black KE, Murray JA, David CS. HLA-DQ determines the response to exogenous wheat proteins: a model of gluten sensitivity in transgenic knockout mice. *J Immunol.* 2002;169(10):5595-600.
229. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008;57(6):747-54.
230. Bethune MT, Siegel M, Howles-Banerji S, Khosla C. Interferon-gamma released by gluten-stimulated celiac disease-specific intestinal T cells enhances the transepithelial flux of gluten peptides. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;329(2):657-68.
231. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med.* 2008;205(1):143-54.
232. Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, et al. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med.* 2001;194(4):417-25.
233. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:313-38.
234. Garrote JA, Gómez-González E, Bernardo D, Arranz E, Chirido F. Celiac disease pathogenesis: the proinflammatory cytokine network. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;47 Suppl 1:S27-32.
235. Wapenaar MC, van Belzen MJ, Fransen JH, Sarasqueta AF, Houwen RH, Meijer JW, et al. The interferon gamma gene in celiac disease: augmented expression correlates with tissue damage but no evidence for genetic susceptibility. *J Autoimmun.* 2004;23(2):183-90.
236. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(4):294-302.

237. Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, et al. Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med*. 1993;178(1):187-96.
238. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol*. 1994;41(4):285-91.
239. Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid LM, Lundin KE. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol*. 1997;46(3):103-9.
240. Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V, et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2003;125(3):730-45.
241. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinto G, Giardullo N, et al. IL-15 interferes with suppressive activity of intestinal regulatory T cells expanded in Celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(7):1308-17.
242. DePaolo RW, Abadie V, Tang F, Fehlner-Peach H, Hall JA, Wang W, et al. Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens. *Nature*. 2011;471(7337):220-4.
243. Frisullo G, Nociti V, Iorio R, Patanella AK, Plantone D, Bianco A, et al. T-bet and pSTAT-1 expression in PBMC from coeliac disease patients: new markers of disease activity. *Clin Exp Immunol*. 2009;158(1):106-14.
244. Bodd M, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, et al. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. *Mucosal Immunol*. 2010;3(6):594-601.
245. Gianfrani C, Levings MK, Sartirana C, Mazzarella G, Barba G, Zanzi D, et al. Gliadin-specific type 1 regulatory T cells from the intestinal mucosa of treated celiac patients inhibit pathogenic T cells. *J Immunol*. 2006;177(6):4178-86.
246. van Leeuwen MA, Lindenbergh-Kortleve DJ, Raatgeep HC, de Ruiter LF, de Krijger RR, Groeneweg M, et al. Increased production of interleukin-21, but not interleukin-17A, in the small intestine characterizes pediatric celiac disease. *Mucosal Immunol*. 2013;6(6):1202-13.
247. Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006;203(5):1343-55.
248. Perera L, Shao L, Patel A, Evans K, Meresse B, Blumberg R, et al. Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13(3):298-307.
249. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, et al. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest*. 2005;85(3):397-407.

250. Bayardo M, Punzi F, Bondar C, Chopita N, Chirido F. Transglutaminase 2 expression is enhanced synergistically by interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  in human small intestine. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(1):95-104.
251. Ting JP, Trowsdale J. Genetic control of MHC class II expression. *Cell*. 2002;109 Suppl:S21-33.
252. Przemioslo RT, Lundin KE, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon gamma antibody. *Gut*. 1995;36(6):874-9.
253. du Pré MF, van Berkel LA, Ráki M, van Leeuwen MA, de Ruiten LF, Broere F, et al. CD62L(neg)CD38<sup>+</sup> expression on circulating CD4<sup>+</sup> T cells identifies mucosally differentiated cells in protein fed mice and in human celiac disease patients and controls. *Am J Gastroenterol*. 2011;106(6):1147-59.
254. de Kauwe AL, Chen Z, Anderson RP, Keech CL, Price JD, Wijburg O, et al. Resistance to celiac disease in humanized HLA-DR3-DQ2-transgenic mice expressing specific anti-gliadin CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2009;182(12):7440-50.
255. Casella G, Viganò D, Romano Settanni C, Morelli O, Villanacci V, Baldini V, et al. Association between celiac disease and chronic hepatitis C. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2016;9(3):153-7.
256. Durante-Mangoni E, Iardino P, Resse M, Cesaro G, Sica A, Farzati B, et al. Silent celiac disease in chronic hepatitis C: impact of interferon treatment on the disease onset and clinical outcome. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38(10):901-5.
257. Cammarota G, Cuoco L, Cianci R, Pandolfi F, Gasbarrini G. Onset of coeliac disease during treatment with interferon for chronic hepatitis C. *Lancet*. 2000;356(9240):1494-5.
258. Monteleone G, Pender SL, Wathen NC, MacDonald TT. Interferon-alpha drives T cell-mediated immunopathology in the intestine. *Eur J Immunol*. 2001;31(8):2247-55.
259. Mayassi T, Jabri B. Human intraepithelial lymphocytes. *Mucosal Immunol*. 2018;11(5):1281-9.
260. Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*. 1971;12(12):988-94.
261. Collin P, Wahab PJ, Murray JA. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(3):341-50.
262. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):551-66.
263. Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J, Cerf-Bensussan N. Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta<sup>+</sup> but not of TcR gamma delta<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut*. 1993;34(2):208-14.
264. Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*. 1990;28(6):579-81.

265. Hayday A, Geng L. Gamma delta cells regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(6):884-9.
266. Calleja S, Vivas S, Santiuste M, Arias L, Hernando M, Nistal E, et al. Dynamics of non-conventional intraepithelial lymphocytes-NK, NKT, and  $\gamma\delta$  T-in celiac disease: relationship with age, diet, and histopathology. *Dig Dis Sci.* 2011;56(7):2042-9.
267. Guy-Grand D, Vassalli P, Eberl G, Pereira P, Burlen-Defranoux O, Lemaitre F, et al. Origin, trafficking, and intraepithelial fate of gut-tropic T cells. *J Exp Med.* 2013;210(9):1839-54.
268. Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, et al. Gliadin activates HLA class I-restricted CD8+ T cells in celiac disease intestinal mucosa and induces the enterocyte apoptosis. *Gastroenterology.* 2008;134(4):1017-27.
269. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien YH, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\delta$  T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(32):13073-8.
270. Torres J, Mehandru S, Colombel JF, Peyrin-Biroulet L. Crohn's disease. *Lancet.* 2017;389(10080):1741-55.
271. Jabri B, de Serre NP, Cellier C, Evans K, Gache C, Carvalho C, et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E-specific natural killer receptor CD94 in celiac disease. *Gastroenterology.* 2000;118(5):867-79.
272. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity.* 2004;21(3):357-66.
273. Roberts AI, Lee L, Schwarz E, Groh V, Spies T, Ebert EC, et al. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol.* 2001;167(10):5527-30.
274. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2001;2(3):255-60.
275. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut.* 2006;55(4):469-77.
276. Yokoyama S, Watanabe N, Sato N, Perera PY, Filkoski L, Tanaka T, et al. Antibody-mediated blockade of IL-15 reverses the autoimmune intestinal damage in transgenic mice that overexpress IL-15 in enterocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(37):15849-54.
277. Hietikko M, Koskinen O, Kurppa K, Laurila K, Saavalainen P, Salmi T, et al. Small-intestinal TG2-specific plasma cells at different stages of coeliac disease. *BMC Immunol.* 2018;19(1):36.

278. Høydahl LS, Richter L, Frick R, Snir O, Gunnarsen KS, Landsverk OJB, et al. Plasma Cells Are the Most Abundant Gluten Peptide MHC-expressing Cells in Inflamed Intestinal Tissues From Patients With Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2019;156(5):1428-39.e10.
279. Di Niro R, Mesin L, Zheng NY, Stammaes J, Morrissey M, Lee JH, et al. High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med*. 2012;18(3):441-5.
280. Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay-Szabó I, Sommer R, Schreier E, et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2005;17(1):85-91.
281. Tosco A, Maglio M, Paparo F, Rapacciuolo L, Sannino A, Miele E, et al. Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2008;47(3):293-8.
282. Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut*. 1997;41(6):851-2.
283. Schuppan D, Hahn EG. IgA anti-tissue transglutaminase: setting the stage for coeliac disease screening. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001;13(6):635-7.
284. Leffler DA, Schuppan D. Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2010;105(12):2520-4.
285. Hofmann K, Clauder AK, Manz RA. Targeting B Cells and Plasma Cells in Autoimmune Diseases. *Front Immunol*. 2018;9:835.
286. Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology*. 2012;143(3):698-707.e4.
287. Mesin L, Sollid LM, Di Niro R. The intestinal B-cell response in celiac disease. *Front Immunol*. 2012;3:313.
288. du Pré MF, Sollid LM. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):413-23.
289. Halttunen T, Mäki M. Serum immunoglobulin A from patients with celiac disease inhibits human T84 intestinal crypt epithelial cell differentiation. *Gastroenterology*. 1999;116(3):566-72.
290. Barone MV, Caputo I, Ribecco MT, Maglio M, Marzari R, Sblattero D, et al. Humoral immune response to tissue transglutaminase is related to epithelial cell proliferation in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007;132(4):1245-53.
291. Lindfors K, Rauhavirta T, Stenman S, Mäki M, Kaukinen K. In vitro models for gluten toxicity: relevance for celiac disease pathogenesis and development of novel treatment options. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(2):119-25.

292. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K. Dermatitis herpetiformis: pathognomonic transglutaminase IgA deposits in the skin and excellent prognosis on a gluten-free diet. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(8):917-22.
293. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K, Kaukinen K, Collin P. Dermatitis Herpetiformis: A Common Extraintestinal Manifestation of Coeliac Disease. *Nutrients.* 2018;10(5).
294. Marietta E, Black K, Camilleri M, Krause P, Rogers RS, David C, et al. A new model for dermatitis herpetiformis that uses HLA-DQ8 transgenic NOD mice. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1090-7.
295. Zone JJ, Schmidt LA, Taylor TB, Hull CM, Sotiriou MC, Jaskowski TD, et al. Dermatitis herpetiformis sera or goat anti-transglutaminase-3 transferred to human skin-grafted mice mimics dermatitis herpetiformis immunopathology. *J Immunol.* 2011;186(7):4474-80.
296. Belkin AM. Extracellular TG2: emerging functions and regulation. *FEBS J.* 2011;278(24):4704-16.
297. Fesus L, Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(10):534-9.
298. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev.* 2009;89(3):991-1023.
299. Lorand L, Graham RM. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(2):140-56.
300. Klöck C, Diraimondo TR, Khosla C. Role of transglutaminase 2 in celiac disease pathogenesis. *Semin Immunopathol.* 2012;34(4):513-22.
301. Nakaoka H, Perez DM, Baek KJ, Das T, Husain A, Misono K, et al. Gh: a GTP-binding protein with transglutaminase activity and receptor signaling function. *Science.* 1994;264(5165):1593-6.
302. Mishra S, Murphy LJ. Tissue transglutaminase has intrinsic kinase activity: identification of transglutaminase 2 as an insulin-like growth factor-binding protein-3 kinase. *J Biol Chem.* 2004;279(23):23863-8.
303. Hasegawa G, Suwa M, Ichikawa Y, Ohtsuka T, Kumagai S, Kikuchi M, et al. A novel function of tissue-type transglutaminase: protein disulphide isomerase. *Biochem J.* 2003;373(Pt 3):793-803.
304. Park D, Choi SS, Ha KS. Transglutaminase 2: a multi-functional protein in multiple subcellular compartments. *Amino Acids.* 2010;39(3):619-31.
305. Pinkas DM, Strop P, Brunger AT, Khosla C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.* 2007;5(12):e327.
306. Smethurst PA, Griffin M. Measurement of tissue transglutaminase activity in a permeabilized cell system: its regulation by Ca<sup>2+</sup> and nucleotides. *Biochem J.* 1996;313 (Pt 3):803-8.

307. Sollid LM, Jabri B. Celiac disease and transglutaminase 2: a model for posttranslational modification of antigens and HLA association in the pathogenesis of autoimmune disorders. *Curr Opin Immunol*. 2011;23(6):732-8.
308. Dafik L, Albertelli M, Stammaes J, Sollid LM, Khosla C. Activation and inhibition of transglutaminase 2 in mice. *PLoS One*. 2012;7(2):e30642.
309. Günther C, Buchen B, He GW, Hornef M, Torow N, Neumann H, et al. Caspase-8 controls the gut response to microbial challenges by Tnf- $\alpha$ -dependent and independent pathways. *Gut*. 2015;64(4):601-10.
310. Siegel M, Strnad P, Watts RE, Choi K, Jabri B, Omary MB, et al. Extracellular transglutaminase 2 is catalytically inactive, but is transiently activated upon tissue injury. *PLoS One*. 2008;3(3):e1861.
311. Diraimondo TR, Klöck C, Khosla C. Interferon- $\gamma$  activates transglutaminase 2 via a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway: implications for celiac sprue therapy. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;341(1):104-14.
312. Jin X, Stammaes J, Klöck C, DiRaimondo TR, Sollid LM, Khosla C. Activation of extracellular transglutaminase 2 by thioredoxin. *J Biol Chem*. 2011;286(43):37866-73.
313. Kumar S, Mehta K. Tissue transglutaminase constitutively activates HIF-1 $\alpha$  promoter and nuclear factor- $\kappa$ B via a non-canonical pathway. *PLoS One*. 2012;7(11):e49321.
314. Luciani A, Vilella VR, Vasaturo A, Giardino I, Raia V, Pettoello-Mantovani M, et al. SUMOylation of tissue transglutaminase as link between oxidative stress and inflammation. *J Immunol*. 2009;183(4):2775-84.
315. Biagi F, Campanella J, Laforenza U, Gastaldi G, Tritto S, Grazioli M, et al. Transglutaminase 2 in the enterocytes is coeliac specific and gluten dependent. *Dig Liver Dis*. 2006;38(9):652-8.
316. Gorgun J, Portyanko A, Marakhouski Y, Cherstvoy E. Tissue transglutaminase expression in celiac mucosa: an immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2009;455(4):363-73.
317. Esposito C, Paparo F, Caputo I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, et al. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(8):1813-20.
318. Caputo I, D'Amato A, Troncone R, Auricchio S, Esposito C. Transglutaminase 2 in celiac disease: minireview article. *Amino Acids*. 2004;26(4):381-6.
319. Villanacci V, Not T, Sblattero D, Gaiotto T, Chirido F, Galletti A, et al. Mucosal tissue transglutaminase expression in celiac disease. *J Cell Mol Med*. 2009;13(2):334-40.
320. Abadie V, Jabri B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev*. 2014;260(1):221-34.
321. Maiuri L, Ciacci C, Auricchio S, Brown V, Quarantino S, Londei M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*. 2000;119(4):996-1006.

322. Burton JD, Bamford RN, Peters C, Grant AJ, Kurys G, Goldman CK, et al. A lymphokine, provisionally designated interleukin T and produced by a human adult T-cell leukemia line, stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(11):4935-9.
323. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001;97(1):14-32.
324. Bulfone-Paus S, Bulanova E, Budagian V, Paus R. The interleukin-15/interleukin-15 receptor system as a model for juxtacrine and reverse signaling. *Bioessays*. 2006;28(4):362-77.
325. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):595-601.
326. Tagaya Y, Bamford RN, DeFilippis AP, Waldmann TA. IL-15: a pleiotropic cytokine with diverse receptor/signaling pathways whose expression is controlled at multiple levels. *Immunity*. 1996;4(4):329-36.
327. Waldmann TA, Tagaya Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:19-49.
328. Bamford RN, Battiata AP, Burton JD, Sharma H, Waldmann TA. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line HuT-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type I region /IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuates IL-15 mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):2897-902.
329. Kurys G, Tagaya Y, Bamford R, Hanover JA, Waldmann TA. The long signal peptide isoform and its alternative processing direct the intracellular trafficking of interleukin-15. *J Biol Chem*. 2000;275(39):30653-9.
330. Tagaya Y, Kurys G, Thies TA, Losi JM, Azimi N, Hanover JA, et al. Generation of secretable and nonsecretable interleukin 15 isoforms through alternate usage of signal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(26):14444-9.
331. Schluns KS, Stoklasek T, Lefrançois L. The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(8):1567-71.
332. Giri JG, Ahdieh M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, et al. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J*. 1994;13(12):2822-30.
333. Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J*. 1995;14(15):3654-63.
334. Lin JX, Migone TS, Tsang M, Friedmann M, Weatherbee JA, Zhou L, et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. *Immunity*. 1995;2(4):331-9.

335. Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*. 1994;266(5187):1045-7.
336. Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, et al. Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*. 1994;264(5161):965-8.
337. Waldmann T. The contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for the immunotherapy of rheumatological diseases. *Arthritis Res*. 2002;4 Suppl 3:S161-7.
338. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*. 2000;191(5):771-80.
339. Fehniger TA, Suzuki K, Ponnappan A, VanDeusen JB, Cooper MA, Florea SM, et al. Fatal leukemia in interleukin 15 transgenic mice follows early expansions in natural killer and memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2001;193(2):219-31.
340. Jabri B, Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(12):771-83.
341. Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1439-45.
342. Hùe S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*. 2004;21(3):367-77.
343. Malamut G, El Machhour R, Montcuquet N, Martin-Lannerée S, Dusanter-Fourt I, Verkarre V, et al. IL-15 triggers an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(6):2131-43.
344. Benahmed M, Meresse B, Arnulf B, Barbe U, Mention JJ, Verkarre V, et al. Inhibition of TGF-beta signaling by IL-15: a new role for IL-15 in the loss of immune homeostasis in celiac disease. *Gastroenterology*. 2007;132(3):994-1008.
345. Ben Ahmed M, Belhadj Hmida N, Moes N, Buyse S, Abdeladhim M, Louzir H, et al. IL-15 renders conventional lymphocytes resistant to suppressive functions of regulatory T cells through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol*. 2009;182(11):6763-70.
346. Hmida NB, Ben Ahmed M, Moussa A, Rejeb MB, Said Y, Kourda N, et al. Impaired control of effector T cells by regulatory T cells: a clue to loss of oral tolerance and autoimmunity in celiac disease? *Am J Gastroenterol*. 2012;107(4):604-11.
347. Du Pré MF, Kozijn AE, van Berkel LA, ter Borg MN, Lindenbergh-Kortleve D, Jensen LT, et al. Tolerance to ingested deamidated gliadin in mice is maintained by splenic, type 1 regulatory T cells. *Gastroenterology*. 2011;141(2):610-20, 20.e1-2.

348. Freitag TL, Rietdijk S, Junker Y, Popov Y, Bhan AK, Kelly CP, et al. Gliadin-primed CD4<sup>+</sup>CD45RBlowCD25<sup>-</sup> T cells drive gluten-dependent small intestinal damage after adoptive transfer into lymphopenic mice. *Gut*. 2009;58(12):1597-605.
349. Galipeau HJ, Rulli NE, Jury J, Huang X, Araya R, Murray JA, et al. Sensitization to gliadin induces moderate enteropathy and insulinitis in nonobese diabetic-DQ8 mice. *J Immunol*. 2011;187(8):4338-46.
350. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. *Bifidobacterium longum* CECT 7347 modulates immune responses in a gliadin-induced enteropathy animal model. *PLoS One*. 2012;7(2):e30744.
351. Verdu EF, Huang X, Natividad J, Lu J, Blennerhassett PA, David CS, et al. Gliadin-dependent neuromuscular and epithelial secretory responses in gluten-sensitive HLA-DQ8 transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;294(1):G217-25.
352. Korneychuk N, Ramiro-Puig E, Ettersperger J, Schulthess J, Montcuquet N, Kiyono H, et al. Interleukin 15 and CD4<sup>+</sup> T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology*. 2014;146(4):1017-27.
353. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, et al. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(3):681-91.e10.
354. Bodis G, Toth V, Schwarting A. Role of Human Leukocyte Antigens (HLA) in Autoimmune Diseases. *Rheumatol Ther*. 2018;5(1):5-20.
355. Taneja V, David CS. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J Clin Invest*. 1998;101(5):921-6.
356. S nderstrup G, Cope AP, Patel S, Congia M, Hain N, Hall FC, et al. HLA class II transgenic mice: models of the human CD4<sup>+</sup> T-cell immune response. *Immunol Rev*. 1999;172:335-43.
357. Altmann DM, Douek DC, Frater AJ, Hetherington CM, Inoko H, Elliott JI. The T cell response of HLA-DR transgenic mice to human myelin basic protein and other antigens in the presence and absence of human CD4. *J Exp Med*. 1995;181(3):867-75.
358. Woods A, Chen HY, Trumbauer ME, Sirotina A, Cummings R, Zaller DM. Human major histocompatibility complex class II-restricted T cell responses in transgenic mice. *J Exp Med*. 1994;180(1):173-81.
359. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *J Autoimmun*. 2016;66:76-88.
360. Ohta N, Hiroi T, Kweon MN, Kinoshita N, Jang MH, Mashimo T, et al. IL-15-dependent activation-induced cell death-resistant Th1 type CD8 alpha beta+NK1.1<sup>+</sup> T cells for the development of small intestinal inflammation. *J Immunol*. 2002;169(1):460-8.

361. Meisel M, Mayassi T, Fehlner-Peach H, Koval JC, O'Brien SL, Hinterleitner R, et al. Interleukin-15 promotes intestinal dysbiosis with butyrate deficiency associated with increased susceptibility to colitis. *ISME J.* 2017;11(1):15-30.
362. Pinto D, Robine S, Jaisser F, El Marjou FE, Louvard D. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem.* 1999;274(10):6476-82.
363. Lefrancois L, Lycke N. Isolation of mouse small intestinal intraepithelial lymphocytes, Peyer's patch, and lamina propria cells. *Curr Protoc Immunol.* 2001;Chapter 3:Unit 3 19.
364. Lang KS, Recher M, Junt T, Navarini AA, Harris NL, Freigang S, et al. Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med.* 2005;11(2):138-45.
365. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(9):545-58.
366. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med.* 2011;365(23):2205-19.
367. Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebwohl MG, Gladman DD, Wu JJ, et al. Psoriasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16082.
368. Kaukinen K, Partanen J, Mäki M, Collin P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(3):695-9.
369. Liblau RS, Singer SM, McDevitt HO. Th1 and Th2 CD4+ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today.* 1995;16(1):34-8.
370. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine.* 2015;74(1):5-17.
371. Spencer J, Sollid LM. The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunol.* 2016;9(5):1113-24.
372. Bodd M, Ráki M, Bergseng E, Jahnsen J, Lundin KE, Sollid LM. Direct cloning and tetramer staining to measure the frequency of intestinal gluten-reactive T cells in celiac disease. *Eur J Immunol.* 2013;43(10):2605-12.
373. Tollefsen S, Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Ráki M, Kwok WW, et al. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest.* 2006;116(8):2226-36.
374. Sollid LM. The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics.* 2017;69(8-9):605-16.
375. Baker AF, Dragovich T, Tate WR, Ramanathan RK, Roe D, Hsu CH, et al. The antitumor thioredoxin-1 inhibitor PX-12 (1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide) decreases thioredoxin-1 and VEGF levels in cancer patient plasma. *J Lab Clin Med.* 2006;147(2):83-90.

376. Leandro MJ, de la Torre I. Translational Mini-Review Series on B Cell-Directed Therapies: The pathogenic role of B cells in autoantibody-associated autoimmune diseases--lessons from B cell-depletion therapy. *Clin Exp Immunol*. 2009;157(2):191-7.
377. Cinova J, De Palma G, Stepankova R, Kofronova O, Kverka M, Sanz Y, et al. Role of intestinal bacteria in gliadin-induced changes in intestinal mucosa: study in germ-free rats. *PLoS One*. 2011;6(1):e16169.
378. Hagendorn E, Whitney-Miller C, Huber A, Potts S. Development of a Tissue Image Analysis Algorithm for Celiac Drug Development. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. 2015;20:141-152.
379. Asrarkulova, A.S. & Bulushova, N.V. Wheat Gluten and Its Hydrolysates. Possible Fields of Practical Use. *Appl Biochem Microbiol*. 2018;54:825-833.