

Université de Montréal

**Les associations potentielles de gènes KIR avec la
susceptibilité/résistance au développement de la maladie de
Crohn**

Suzanne Samarani

Département Microbiologie, Infectiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée
En vue de l'obtention du grade de Doctorat (PhD)
En Microbiologie et Immunologie

Août, 2018

© Suzanne Samarani, 2018

Résumé

La famille des gènes KIR « Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor » comprend six gènes activateurs, d'autres étant des gènes inhibiteurs. En raison des différences haplotypiques, les humains diffèrent entre eux par le nombre des gènes KIR activateurs hérités. Ils peuvent hériter de zéro à un nombre complet de six de ces gènes. Dans cette étude, nous voulons **investiguer** si cette variation du nombre de ces gènes KIR activateurs est impliquée avec une association à la maladie de Crohn (MC), qui est une maladie inflammatoire chronique du tractus gastro-intestinal dans laquelle des facteurs génétiques jouent un rôle important. L'approche du "candidate gene" a été utilisée pour génotyper six gènes KIR activateurs des cas et des contrôles dans trois cohortes indépendantes (Montréal, Ottawa et Winnipeg) par PCR en utilisant des amorces spécifiques, l'usage de la régression logistique inconditionnelle nous permet de déterminer la présence de cette association. Notre étude démontre une forte association entre la plupart des gènes et la MC dans les trois cohortes. Après une analyse globale pour toutes les cohortes quatre des gènes démontrent une forte association avec la maladie. Nous avons également étudié l'expression des récepteurs KIR et non-KIR et des différentes intégrines sur les cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de la maladie vis-à-vis des sujets témoins en bonne santé. De plus, nous avons également déterminé l'historique de la dégranulation et le potentiel cytotoxique des cellules NK en utilisant du sang périphérique fraîchement isolé provenant des patients MC et des sujets témoins sains. Nos résultats montrent que les cellules NK des patients atteints de la MC expriment des niveaux plus élevés des KIR activateurs ainsi que d'autres récepteurs activateurs non-KIR. Les cellules NK provenant des patients également expriment des niveaux accrus de différentes « gut-homing » intégrines. De plus, les cellules NK de ces patients ont démontré une **dégranulation** et un potentiel cytotoxique plus élevé. En générale, cette étude montre que les gènes KIR activateurs confèrent un risque de développer la MC chez les enfants et les adultes et que les cellules NK du sang périphérique chez les patients sont plus actives et plus cytotoxiques comparées aux individus sains. Nos résultats nous offrent de nouvelles perspectives sur l'immuno-pathogenèse de la maladie et pourraient être utiles dans le traitement en développant de nouvelles immunothérapies.

Mots-clés : Cellules NK, Cytotoxicité, Gènes KIR, Maladie de Crohn

Abstract

The KIR (Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor) gene family comprises six activating genes, others being inhibitory ones. Due to the existence of different KIR haplotypes, humans differ from one another in the number of inherited activating KIR genes. They may inherit zero to a full complement of six of these genes. The KIR gene variations have been shown to affect human's susceptibility to a wide variety of human diseases. In this study, we sought to determine whether variations in the numbers of activating KIR gene in humans bear any associations with Crohn disease (CD), a chronic inflammatory disease of the gastrointestinal tract in which genetic factors have been shown to play an important role. We used the candidate gene approach, whereby we genotyped cases and controls for all six activating KIR genes by PCR using gene-specific primers in three independent cohorts (Montreal, Ottawa and Winnipeg) of Canadian Caucasian CD patients and determined associations using unconditional logistic regression. We observed strong associations between most of the genes and CD in all the three cohorts of the patients. An overall analysis for all the cohorts showed strong associations with four of the genes. We also investigated the expression of KIR and non-KIR receptors and different integrins on peripheral blood NK cells in Crohn disease (CD) patients vis-a-vis healthy control subjects. Furthermore, we also determined recent degranulation history and cytotoxic potential of NK cells using freshly isolated peripheral blood from both CD patients and healthy control subjects. Our results show that NK cells from CD patients expressed higher levels of activating KIR as well as other non-KIR activating receptors. They also showed increased frequencies of the cells expressing these receptors. NK cells from the patients also expressed increased levels of different gut-homing integrin molecules. Furthermore, NK cells from CD patients showed a recent history of increased cytotoxic events and exhibited higher cytotoxicity. Collectively, this study shows that activating KIR genes confer risk for CD in both children and adults and peripheral blood NK cells in CD patients are more activated and more cytotoxic compared with their counterparts from healthy individuals. Our results provide novel insights on the immunopathogenesis of the disease and bear implications for devising novel immunotherapies.

Keywords: Crohn disease, NK cells, KIR genes, Cytotoxicity

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xiii
INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE.....	14
INTRODUCTION.....	14
REVUE DE LITTÉRATURE.....	15
La maladie de Crohn.....	15
Les Cellules Natural Killer.....	39
"KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS"; CD158.....	56
Les cellules NK et les maladies autoimmunes.....	68
Etudes des KIR dans des modèles murins.....	69
Les cellules NK et les gènes KIR dans la maladie de Crohn.....	70
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	72
Hypothèse.....	72
Raisonnement.....	72
Objectifs.....	73
RÉSULTATS.....	74
Article 1.....	74
Objectif.....	74
Résumé.....	75
Article 2.....	76
Objectif.....	76

Résumé.....	76
DISCUSSION.....	77
CONCLUSION.....	91
BIBLIOGRAPHIE.....	94

Liste des tableaux

Tableau 1. Les différences principales entre les caractéristiques cliniques et pathologique entre la MC et la CU	16
Tableau 2. Catégorisation de la maladie de Crohn selon la classification de Vienne, Montréal et Paris.	18
Tableau 3. Les récepteurs NKG2/CD94 et ILT exprimés par les cellules NK.....	47
Tableau 4. Les Ligands et les fonctions des récepteurs NCR.....	49
Tableau 5. Les SRR exprimés sur les cellules NK.	50
Tableau 6. Différents récepteurs et corécepteurs de cellules NK.....	55
Tableau 7. KIR et leurs partenaires de signalisation et Ligands chez l’homme.....	59

Liste des figures

Figure 7.	Différents médicaments utilisés dans le traitement de la maladie de Crohn pédiatrique.	38
Figure 8.	Les deux sous populations des cellules NK basés sur CD16 et CD56.	41
Figure 9.	Les populations des cellules NK en fonction des marqueurs CD56, CD27 et CD11b.	42
Figure 10.	Un modèle de l'activation des cellules NK.	44
Figure 11.	NCR Humaine.	48
Figure 12.	L'image illustre comment une cellule NK tue une cellule cible via un anticorps.	53
Figure 13.	Structure d'un gène KIR typique et le récepteur encodé.	57
Figure 14.	Nomenclature des KIR.	58
Figure 15.	Les CMH class I, Ligands des KIR'S.	61
Figure 16.	Les Haplotypes des KIRs.	63
Figure 17.	Le polymorphisme des gènes KIR.	64
Figure 18.	Expression variée des KIR, NKG2A et LILRB1 dans les cellules CD16+CD56dim NK.	65
Figure 19.	Paires des KIR-HLA et l'activation et inhibition des cellules NK.	67

Liste des abréviations

ADCC: Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity

AICL: Activation-induced c-type lectin

ALL: Acute lymphoblastic leukemia

AML: Acute myeloid leukemia

APC: Antigen presenting cell

ASCA: Anti- *Saccharomyces cerevisiae* antibodies

ATG16L1: Autophagy-related protein 16-like-1

BAG-6: Bcl-2-associated athanogene-6

BCG: Bacillus Calmette Guerin (the vaccine strain of *Mycobacterium tuberculosis*)

BLIMP-1: B lymphocyte-induced maturation protein

CARD: Caspase activation and recruitment domain-containing protein

CD: Crohn disease

CD: Cluster differentiation designation

CDAI: Crohn disease activity index

CEA: Chorio-embryonic antigen

CEACAM: CEA-Cell adhesion molecule

CEI: Cellules épithéliales intestinales

CRACC: CD2 like molecule expressed on cytotoxic cells

CRC: Colorectal cancer

CRP: C-reactive protein

CT: Computed Tomography

CTE: Computed tomography enterography

DAP: Dynax accessory protein

DC: Dendritic cells

DLG-5: Disk Large Homolog

DNAM-1: Dynax accessory molecule-1

EAT-2: Ewing's sarcoma-associated transcript-2

EBV : Epstein Barr virus

EMP : Extracellular matrix proteins

ER: Endoplasmic reticulum
Fc γ R: Receptor for Fc region of IgG
Fc ϵ R: Receptor for Fc region of IgE
FcRL: Fc receptor like
FDA: Federal Drug Agency (USA)
FUT-2: Fucosyltransferase-2
GI Tract: Gastro-intestinal tract
HA: Haemagglutinin
HCV: Hepatitis C virus
HLA: Human leukocyte antigen D-related
HCMV: Human Cytomegalovirus
HLA-DR: Human leukocyte antigen D-related
HVEM: Herpesvirus entry mediator
IBD: Inflammatory Bowel Disease
IBD-I: Indeterminate IBD; also known as IBD-U (see below)
IBD-U: IBD-unclassified/undetermined with respect to CD or UC
IEC: Intestinal epithelial cells
IFN: Interferon
IgSF: Immunoglobulin superfamily
ILC: Innate Lymphoid Cells
ILT: Immunoglobulin-like transcript
IRGM: Immunity-related GTPase family M protein
ISTM: Immunoreceptor tyrosine-based switch motif
ITAM: Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM: Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
KIR: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor
KLR: Killer lectin-like receptor
KLRG1: Killer lectin-like receptor G1
LFA: Leukocyte function-associated antigen
LAIR: Leukocyte-associated Immunoglobulin-like receptor
LILRB1: Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor type B member 1

LLT-1: Lectine-like transcript
LP: Lamina propria
LY49: Lytic antigen of 49 kDa
Mac-1: Macrophage antigen-1
MadCAM: Mucosal addressin Cell Adhesion Molecule
MALDI-TOF: Matrix –assissted Laser Desroption /Ionization-Time of Flight
MC : Maladie de Crohn
MDP: Muramyl dipeptide
MHC: Major histocompatibility complex
MICA/B: MHC class I heavy chain-related A/B
MIP-1: Macrophage inflammatory protein
MIR: Macrophage inhibitory receptor
MLN: Mesenteric lymph nodes
MMI: Maladie inflammatoire intestinale
MMP: Matrix metalloproteases
MRE: Magnetic resonance enterography
MRI: Magnatic resonance imaging
MS: Multiple sclerosis
NCAM: Neural cell adhesion molecule
NCR: Natural Cytotoxicity Receptors
NGC: NK gene complex
NKp44L: Ligand for NKp44 receptor
NKR: NK cell receptor
NKT: Natural killer
NO: Nitric oxide
NOD-2: Nucleotide-binding oligomerization domain containing-2
NTB-A : Non T, non B cell antigen
OCTN: Organic Cation/Carnitine Transporter-1 and -2
PANCA: Peri-nuclear anti-cytoplasmic antibodies
PCDAI: Pediatric Crohn disease activity index
PRDM-1: Positive Regulatory Domain-1

PTPN22: Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22
PVR: Poliovirus receptor
RAG: Recombinase activating gene
RANTES: Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RNF: Ring Factor Protein (RNF)-186
ROR- γ t: Retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ specific for T cells
SAP: SLAM-associated protein
S1P: Sphingosine-1 phosphate
SCFA: Short chain fatty acids
SHP-1: SH2 domain containing phosphatase-1
SIGLEC: Sialic acid binding Ig-like lectin
SLAM: Signaling lymphocyte-associated molecule
SLE: Systemic lupus erythematosus
SMAD: Small for body-Mothers against Dencapentaplegic homologue-3
SRR: SLAM-related receptors
STAT: Signal transducer and activator of transcription
TCR: T cell receptor
TH: (CD4+) T helper cells
TIMP: Tissue inhibitor of matrix metalloprotease
TLR4: Toll-like receptor-4
TNFRSF: Tumor necrosis factor receptor superfamily
TNFSF: Tumor necrosis factor superfamily
UC: Ulcerative Colitis
ULBP: HCMV's UL-16 binding protein
VLA-4: Very Late Antigen-4
XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis
XLP : X-linked lymphoproliferative disorder

Cette thèse est dédiée à chaque bébé, enfant, et jeune atteint de la maladie de Crohn.

Remerciements

Je veux prendre ces quelques lignes afin de remercier tous ceux et celles qui m'ont encouragé à persévérer, et m'ont aidé à développer mes aptitudes en tant que scientifiques tout au long de ces années. Mes études m'ont permis de côtoyer des gens formidables, avec une ambiance des plus motivantes au CHU Sainte-Justine.

A tout seigneur tout honneur, je dois tout d'abord remercier Dr Ali Ahmad, qui est une encyclopédie de savoir. Il était toujours présent pour me supporter, sans lui cette thèse n'aurait jamais vu la lumière. Même avec toutes mes difficultés de santé, il n'a jamais perdu espoir, et la phrase " you can do it, you have to get your degree" m'accompagne chaque jour. Il a veillé nuits et jours pour que tout soit parfait. Un grand merci de tout mon cœur n'est pas assez pour tout ce qu'il a fait pour moi. Je veux également remercier mon co-directeur Dr Devendra Amre. Une pensée très spéciale à chaque personne au CHU Sainte Justine qui a cru en moi, et jusqu'à la dernière minute n'ont pas arrêté de m'encourager pour accomplir mon doctorat, aussi bien leur support lors des moments de ma maladie. Il ne faut jamais oublier le tout grand support et compréhension de mon département de microbiologie, infectiologie et immunologie, qui ont tout fait pour que je puisse accomplir mon rêve. Durant les moments les plus difficiles, les moments de ma maladie, tout le monde comprenait la situation et faisait leur possible pour tout arranger. Un très grand merci de tout le fond de mon cœur. Il ne faut jamais oublier le département de gastroentérologie, surtout Dr Colette Deslandres qui a beaucoup cru dans mon projet et jusqu'à date. Aussi bien le département d'orthopédie, pour chaque infirmier et infirmière un grand merci et du fond du cœur. Enfin, un tout grand merci à tous les membres de l'équipe de mon laboratoire et tous les stagiaires pour leur support et entraide.

INTRODUCTION ET REVUE DE LITTÉRATURE

INTRODUCTION

Cette étude vise à comprendre le rôle des gènes " Killer Immunoglobulin Like Receptors" (KIR) dans l'immunopathogénèse de la maladie de Crohn (MC). MC est une maladie inflammatoire chronique qui affecte le tractus intestinale. Cependant la principale cause de cette maladie reste inconnue. Plusieurs études révèlent que la cause pourrait être la combinaison de plusieurs facteurs : génétique, ethnique, environnementale et immunitaire et *cetera*. Ces gènes KIRs sont localisés chez l'homme sur le chromosome 19q23, dans une région appelée "Leukocyte Receptor Complex"(LRC). Cette région est composée des gènes KIR, qui sont divisés en deux groupes activateurs et inhibiteurs et des pseudo-gènes. Ces gènes sont exprimés sur les sous-populations des cellules NK, et garde le même nom. En outre le déséquilibre entre les KIRs inhibiteurs et activateurs hérité, et l'affinité de leur liaison avec leur ligand spécifique du CMH, confère un rôle inhibitrice ou effectrice aux cellules NK. Cependant, le répertoire des gènes KIR et leurs Ligand du CMH présente une variation d'un individu à l'autre. De même le génotype d'un individu peut déterminer la résistance ou la susceptibilité pour se débarrasser d'une infection virale, d'un cancer ou de développer une maladie auto-immune ou inflammatoire chronique. En pratique, il n'y a rien qui est connu et clair à propos de ce sujet et cette association avec la MC. Le projet de recherche de cette thèse vise à étudier les associations potentielles des gènes KIR activateurs avec la susceptibilité / résistance innée à la maladie de Crohn (MC) chez les enfants et les adultes au Canada. Ceci nous aidera à développer une nouvelle thérapie basée sur KIR et/ou leurs ligands.

REVUE DE LITTÉRATURE

La maladie de Crohn

Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

La maladie inflammatoire de l'intestin (MII ; en Anglais "IBD" ou "Inflammatory Bowel Disease") regroupe des maladies inflammatoires chroniques idiopathiques et très hétérogènes du tractus gastro-intestinale chez l'homme. La maladie de Crohn (MC) est en générale la plus sévère et la colite ulcéreuse (CU) est l'autre forme de MII et peut être aussi sévère qu'elle mène à une colectomie. Les deux maladies présentent une inflammation chronique de l'intestin avec des rechutes, un aspect récidive et alternent entre les périodes actives de la maladie et les rémissions (Burisch & Munkholm, 2013). Les deux maladies affectent différentes régions du système digestif (voir le tableau 1 pour les différentes caractéristiques cliniques et pathologiques entre MC et CU). La CU affecte souvent le côlon, le rectum et se restreint à leur partie terminale. Occasionnellement, le colon en entier est impliqué dans cette maladie. Généralement, cette dernière se restreint aux couches superficielles (muqueuses) de l'intestin. Les lésions sont souvent diffuses, infiltrées avec des neutrophiles et se présentent sous la forme d'abcès localisés. D'autre part, la MC affecte habituellement l'ileum et le côlon. Toutefois, elle peut affecter n'importe quelle partie du tractus gastro-intestinale (GI) de la bouche à l'anus. Les lésions sont infiltrées par des macrophages et sont souvent inégales. Les lésions discontinues ne sont pas restreintes aux muqueuses intestinales, mais elles sont transmurales et s'étendent de la muqueuse à la séreuse. Les lésions (ulcères) sont séparées les unes des autres par des parties non-inflammées et intactes de la muqueuse intestinale, ce qui donne à cette dernière une apparence caractéristique de "Pavement" appelée "cobblestone". Par ailleurs, l'inflammation se propage souvent aux ganglions lymphatiques mésentériques et au gras. La MC est généralement accompagnée par la présence de granulomes, de sténoses intestinales, de fissures et de fistules. Toutefois, le CU est rarement accompagné de ces lésions (Abraham et Cho 2009). Ces caractéristiques permettent de différencier les deux maladies et contribuent dans leurs diagnostics différentiels. Par contre, dans certains cas, il est extrêmement difficile de diagnostiquer si c'est la CU ou la

MC. De tels cas sont appelés MII indéterminée ou non classée (MII-U ; Geboes et al. 2008). Ces difficultés pour diagnostiquer correctement, entraînent des délais dans le traitement des patients. Elles causent également des problèmes à estimer correctement l'incidence de chaque maladie (Jan Irvine et al. 2001, Benchimol et al. 2011).

Tableau 1. Les différences principales entre les caractéristiques cliniques et pathologiques dans la MC et la CU

Feature	CD	UC
Douleur abdominale	Sévère, principalement dans la partie inférieure droite	Crampes, principalement dans la partie inférieure gauche
Diarrhée	Fréquent	Fréquent
Malnutrition	Fréquent	Rare
Obstructions	Fréquent	Non
Fistule Périanal	Dans 30% des cas	Non
pANCA	Rare	Fréquent
ASCA	Fréquent	Rare
Abscès	Fréquent dans la région perianum	Rare
Sténose	Fréquent	Rare
Cancer Coloréctal	Peut arriver dans les maladies du colon	Fréquent selon la gravité et la prolongation de la maladie
Sclero, Cholangitis	Rare	Dans 5-15% des cas
Arthrite	Très fréquent	Fréquent
Région affecté	N'importe quell de la bouche à l'anus	Colon et rectum
Implication de l'iléon	Fréquent	Jamais
Implication réctale	30-50 % des cas	Dans 100% des cas
Nature des Appaence	Discontinues Cobblestone	Continues Non cobblestone
Ulcères	Profonde	Superficielle et diffuse
Oedème mucosale	Rare	Commun
Cellules Caliciformes	Pas de déplétions	Fréquemment dépletées
Cryptes Architectures	Normales	Souvent déformées
Abcès de la Crypte	Rare	Fréquent
Granulomes	Fréquent	Rare
Inflammation	Comprend toute l'épaisseur de la paroi intestinale	Limitée aux muqueuses
Implication du MLN	Fréquent	Pas fréquent
Graisse Mésentérique	Enveloppe l'intestin	Non

ASCA: Anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies, MLN: Mesenteric lymph nodes, p-ANCA Peri-nuclear anti-cytoplasmic antibodies, Sclero: Sclerosing. Adapté de Di Sabatino et al. 2013.

Classification de la maladie de Crohn

Comme mentionné ci-dessus, MII est classifié en trois types : MC, CU et MII-U (MII de classification indéterminée, également appelé MII indéterminé ou MII-I, lorsque les preuves sont insuffisantes pour classifier la maladie en MC ou CU). Environ 5 à 10% des cas de la MII sont diagnostiqués comme MII-I (Geboes et al. 2008). L'objectif de la classification est de fournir des indications sur l'éventuel évolution de la maladie et les options de traitement les plus appropriées. Etant donné que la MC et la CU sont des maladies hétérogènes, la détermination du type de la MC (ou phénotype) sera déterminé selon un des trois systèmes de classification, (Baumgart & Sandborn 2012 ; Morrison et al. 2009). Les systèmes/schémas de classification utilisée sont Rome (1988), Vienne (1998) et Montréal (2005). Ils sont basés sur l'âge au moment du diagnostic, la région affectée du tractus gastro-intestinal et le développement de la maladie, tel que la fistulisation ou la sténose intestinale (Louis et al. 2011). Parmi ceux-ci, la classification de Montréal est la plus récente et complète (Satsangi et autres, 2006 ; Table 2). Cependant, elle n'est pas exemptée des controverses et d'ambiguïtés. Par exemple, il n'y a aucun consensus à la question de savoir si l'inflammation microscopique dans une muqueuse macroscopiquement normale devrait être considérée comme une présence de la maladie. Il n'est pas clair si la maladie est de grade L1 ou L3 quand l'ileum est impliqué avec une atteinte limitée du caecum. Levine et al. (2011) ont effectué une modification et une mise à jour à la classification de Montréal, en incorporant le paramètre clinique du retard de croissance chez les enfants atteints de la MC. En dépit de cette modification, environ 5-10 % des patients atteints de la MII ne peuvent pas être diagnostiqués comme étant de la MC ou de la CU, mais sont classifiés comme MII-indéterminés (MII-I; Laass et al. 2014). On prévoit que l'inclusion des mutations génétiques trouvées chez les patients atteints de la MII rendrait ce système de classification plus compréhensif et instructif.

Tableau 2. Catégorisation de la maladie de Crohn selon la classification de Vienne, Montréal et Paris.

	Vienne	Montréal	Paris
Age du diagnostic (A)	A1 En dessous de 40 ans A2 Au-dessus de 40 ans	A1 En dessous de 17 ans A2 Entre 17 et 40 ans A3 Au-dessus de 40 ans	A1a En dessous de 10 ans A1b Entre 10 et 16 ans A2 Entre 17 et 40 ans A3 Au-dessus de 40 ans
Localisation (L)	L1 Iléale L2 Coloque L3 Iléocolique L4 Supérieur	L1 Iléale L2 Coloque L3 Iléocolique L4 Maladies GI supérieures isolées ¹	L1 Iléale L2 Coloque L3 Iléocolique L4a Maladies GI supérieures proximale du ligament de Treitz ¹ L4b Maladies GI supérieures distale du ligament de Treitz et proximal du 1/3 de l'iléon ¹
Comportement (B)	B1 Aucune sténose et pénétration B2 Sténose B3 Pénétrante	B1 Aucune sténose et pénétration B2 Sténose B3 Pénétrante	B1 Aucune sténose et pénétration B2 Sténose B3 Pénétrante ² B2B3 Pénétrante et sténose, à des temps différent ou en même temps
Croissance (G)		p Modificateur de la maladie périanale ²	P Modificateur de la maladie périanale G0 Aucun retard de Croissance G1 Retard de Croissance

L4 ou L4a/L4b est un modificateur qui peut être ajouté à L1-L3 lorsqu'il coïncide avec une maladie gastrointestinale supérieure. 2. "p" est ajouté à B1-B3 lorsqu'il coïncide avec une maladie périanale. Adapté d'Eszter-Müller et al 2014.

Épidémiologie

Les MII ont été décrits pour la première fois au 18e siècle, en Europe, durant la révolution industrielle. L'incidence a drastiquement grandi dans les pays industrialisés en Amérique du Nord, en Europe du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande dans la deuxième partie du 20ième siècle (Economou & Pappas 2008 ; Molodecky et al. 2012). La figure 1 démontre l'incidence globale et la prévalence de la MC. L'incidence annuelle moyenne dans les pays occidentaux est d'environ 1 cas par tranche de 1000 habitants (Ng et al. 2013, Molodecky et al. 2012). Le Canada est l'un des pays les plus touchés, et suivi par l'Europe du Nord. Près de 1 canadien sur 50 est affecté par la maladie. De plus, l'incidence annuelle de la MC est de 15 par 100 000 habitants. Il s'agit de la deuxième plus grande incidence après la Nouvelle-Zélande où les nouveaux cas sont de l'ordre de 16,4 par 100 000 habitants. Il y a une augmentation du gradient d'incidence et de sévérité des cas d'ouest en est au Canada, alors que la maladie est beaucoup plus problématique au Québec et en Nouvelle-Écosse qu'en Colombie-Britannique (Lowe et al. 2009). La 3e province canadienne la plus affectée est l'Alberta (Fedorak et al. 2010 ; Ng et al. 2013). Les premières nations au Canada sont la partie

de la population les moins affectées. La population urbaine est la plus touchée par rapport à la population rurale. Il existe aussi un gradient semblable en Europe du Sud au Nord. (Shivananda et al. 1996). La cause exacte de ces gradients est inconnue mais peut s'expliquer par la différence entre la répartition des zones urbaines et rurales (Ananthakrishnan 2015), l'exposition au soleil et une distribution asymétrique de l'immigration (Shivananda et al. 1996 ; Lowe et al. 2009 ; Molodecky et al. 2012).

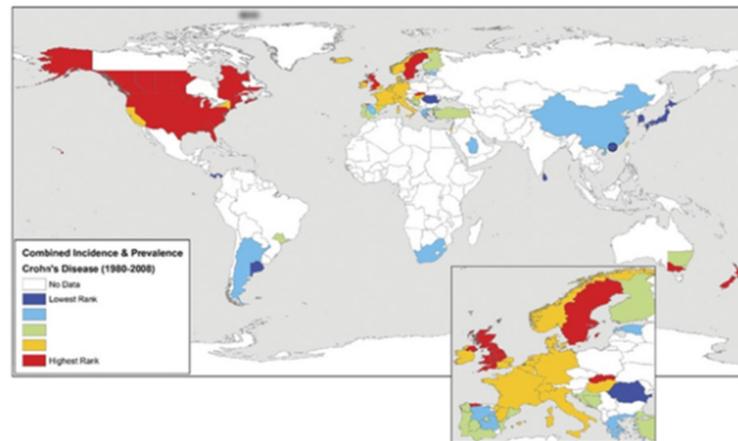


Figure 1. Taux d'incidence et de prévalence mondiale de la maladie. Cette figure démontre le taux d'incidence et de prévalence de la MC pour certains pays. Adapté de Molodecky et al. 2012

L'incidence de la MC a tendance à augmenter lors du dernier siècle. Une méta-analyse a démontré une augmentation de 2,4 à 18% (Molodecky et al. 2012). Cette augmentation est due en partie à la possibilité de disposer de meilleurs outils de diagnostic (Lowe et al. 2009). Au cours des 40 dernières années, l'incidence a également augmenté de façon significative chez les enfants (Kim & Ferry 2004). En 2011, une recension internationale a démontré que 60% des études pédiatriques concernant les cas de la MC ont rapporté une augmentation tangible du taux de la maladie (Benchimol et al. 2011). Il existe une distribution bimodale en fonction de l'âge dès le début de la maladie. Le premier pic se présente à 20 ans (entre 15 et 30 ans) et le deuxième entre 50 et 70 ans. Environ le quart des cas diagnostiqués de la MC

surviennent chez les enfants au cours des deux premières décennies de leur vie. (Benchimol et al. 2011). Le taux d'incidence de la MC est le double de celle de la CU (Rabizadeh & Dubinsky 2013). Une apparition précoce de la maladie est associée à un degré plus élevé de la sévérité de la maladie et plus de complications (Huppertz-Hauss et al. 2014). Chez les hommes, la maladie se présente durant l'enfance tandis que chez les femmes, elle se présente plutôt à l'âge adulte. En d'autres mots, les garçons sont plus susceptibles que les jeunes filles alors que les femmes sont plus affectées que les hommes (avec un ratio homme/femme de 1/1,2) (Loftus 2004 ; Vernier-Massouille et al. 2008). Cependant, l'écart diminue à la suite d'une hausse de l'incidence chez les hommes (Cosnes et al. 2011 ; Benchimol et al. 2011).

La maladie présente des défis supplémentaires chez les enfants puisqu'ils sont en plein développement. En effet, ils souffrent d'anxiété, de dépression et d'autres stress psychosociaux. Ils manifestent également des retards de croissance et environ 10 à 56% en présentent déjà lors du diagnostic. Ils sont en-dessous du troisième percentile de la taille (Abraham et al. 2012). En raison de la malabsorption des nutriments dans les intestins, les patients atteints de la MC peuvent éprouver des difficultés à combler leurs besoins en calorie (Bousvaros et al. 2006). Ceci n'est pas le seul facteur affectant la croissance, la production des hormones de croissance chez les enfants affectés est également réduite. À cause de la diminution de la disponibilité de la vitamine D, une déminéralisation de leurs os est produite, ce qui entraîne des faiblesses et ne se développent pas comme le font les enfants en bonne santé (Kim & Ferry 2004). Les enfants affectés ont fréquemment une puberté retardée. L'utilisation d'immunosuppresseurs affecte la réponse immunitaire ce qui a pour effet d'augmenter leur susceptibilité aux infections.

La MII est relativement moins fréquent dans les pays asiatiques, africains, et sud-américains. (Figure 1). Le manque de diagnostic et l'omission de rapporter la maladie, peuvent expliquer partiellement la prévalence et l'incidence réduite dans les pays en voie de développement. Par contre, l'incidence est en croissance dans cette partie du monde, tandis qu'elle semble avoir plafonné dans les pays occidentaux. L'incidence corrèle avec le niveau de développement, et d'urbanisation.

Les caucasiens sont plus affectés que les noirs, les hispaniques et les asiatiques. De plus, certaines populations peuvent être plus affectées. Par exemple, l'incidence de la MC est 3 fois

plus grande dans la population juive que le reste des populations et la tendance est encore plus importante chez les juifs ashkénazes que les juifs séfarades. Le fait que les asiatiques qui immigrer dans un pays occidental deviennent plus susceptibles à la MC suggère que les facteurs environnementaux (la diète, le style de vie sédentaire, le manque d'exposition au soleil, et *cetera*) jouent un rôle important dans le développement de la maladie. Il est intéressant de noter, que le tabac augmente le risque de développer la MC, mais il a un effet protecteur pour la CU (Loftus 2016). Une appendicectomie, les contraceptifs et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens sont tous des facteurs qui accroissent le risque d'avoir la MII. L'utilisation d'antibiotiques, les infections périnatales et infantiles, la dépression, l'anxiété et la diète occidentale riche en gras et en sucres raffinés augmentent aussi les risques de développer la MC. Une diète riche en fruits, en légumes et en fibres apporte une protection relative à la maladie (Loftus 2016). En addition, les préservatifs alimentaires présent dans la nourriture en conserve provoquent un rapetissement de la muqueuse intestinale et prédispose à la MC (Ananthakrishnan 2013, 2015).

Étiologie de la maladie de Crohn

Les mécanismes exacts étant à la base de l'étiologie de la MC demeurent inconnus (Corridoni et al. 2014). On pense que la MII résulte de la sur-réactivité et de l'agressivité exceptionnelle de la réponse immunitaire de l'hôte contre le microbiote intestinal. Une interaction complexe entre les facteurs génétiques, environnementaux et immunitaires joue un rôle crucial dans le développement de la MC (figure 2). Une variété de facteurs environnementaux déclenche la maladie chez les personnes génétiquement prédisposées. Les facteurs étiologiques sont discutés ci-dessous :

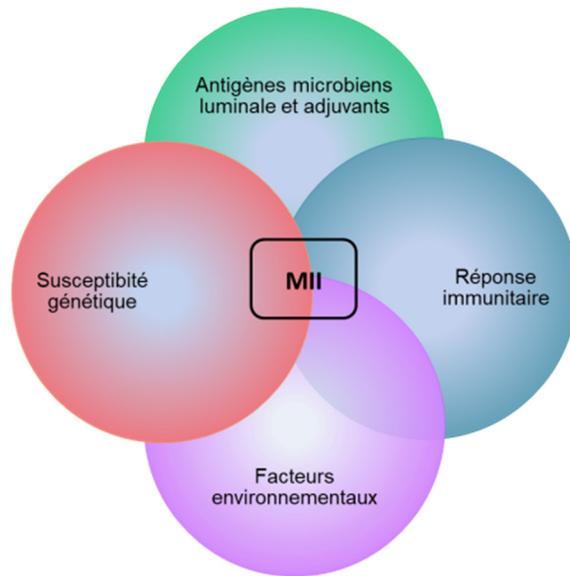


Figure 2. Gènes, environnement, réponse immunitaire et le microbiote intestinal dans le développement de la MC. Les facteurs environnementaux déclenchent la MII chez les individus génétiquement susceptibles d’être atteints en induisant une réponse immunitaire agressive contre les antigènes dérivés du microbiote intestinal

Génétique de la MII

Les études épidémiologiques dans différents groupes ethniques et familles ont fortement suggéré un rôle de la génétique dans le développement de la MC. Le taux de concordance de la maladie chez les jumeaux monozygote peut atteindre jusqu’à 50%, alors qu’il est inférieur à 10% chez les jumeaux dizygotes (Halme et al. 2006). Les parents et les relatives d’un patient atteint de la MII ont plus de risque de développer la maladie. Un enfant a 26 fois plus de chance de développer la MC (et 9 fois plus pour La CU), lorsqu’un frère ou sœur de la famille est atteint de la maladie. Ainsi la composante génétique est beaucoup plus forte dans la MC qu’en CU. L’évolution récente dans les technologies de séquençage et les collaborations internationales ont permis aux chercheurs d’effectuer des études d’association génomique à grande échelle (genome-wide association studies ; GWAS) pour identifier les déterminants génétiques de la MII. Plus de 200 loci génétiques, incluant actuellement plus de

300 SNP, révèlent des associations statistiquement significatifs ($P < 5 \times 10^{-8}$), à la maladie (Uniken-Venema et al. 2017). Cependant, dans la plupart des cas, les gènes ou leurs variants qui causent la maladie demeurent inconnus. En outre, la plupart des SNP sont dans les régions régulatrices du génome (Uniken-Venema et al. 2017). Plusieurs de ces déterminants génétiques sont communs entre la MC et la CU (Franke et al. 2010 ; Lees et al. 2011 ; Jostins et al. 2012. Marcelle 2013). La figure 3 montre les principaux gènes/loci associés avec la MII. Dans la plupart des cas, l'effet est similaire (se dirige dans la même direction) pour la MC et la CU ; mais il faut noter aussi la présence de certaines exceptions remarquables (PTPN22 et SMAD-3). Plus de 50 % des loci sont associés à la MII, et sont également associés à d'autres maladies inflammatoires présentes chez les humains (p. ex., psoriasis, spondylarthrite ankylosante et la cholangite sclérosante primaire et *cetera*). Ces loci comprennent les gènes impliqués dans la détection microbienne, les réponses immunitaires innées et adaptatives, l'inflammation, l'autophagie, le dysfonctionnement de la barrière épithéliale, la réponse au stress du réticulum endoplasmique (ER), le stress oxydatif et la régulation du microbiote intestina et *cetera*. Cependant, seuls quelques gènes sont fonctionnellement associés à la MII.

Loci de susceptibilité aux maladies inflammatoires de l'intestin

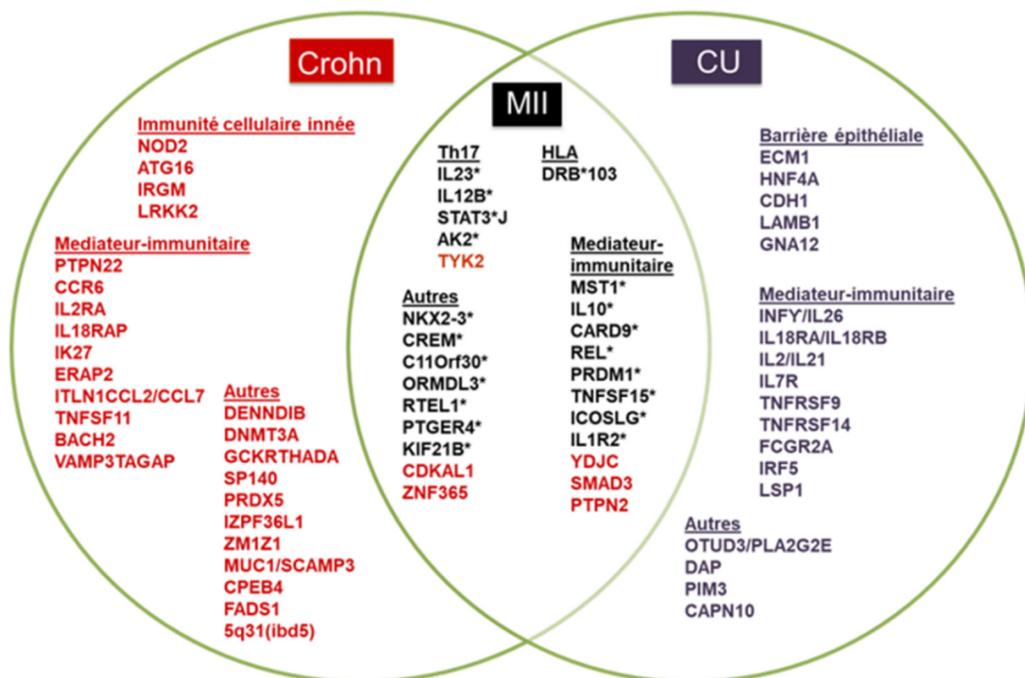


Figure 3. Gènes/loci associés avec la MII. Les principaux gènes/loci associés avec la MC, la CU et partagé par les deux maladies. sont démontrés. Tiré de Lees et al. 2011

Les gènes les plus étudiés sont brièvement mentionnés ci-dessous :

NOD2 (Nucleotide-binding-oligomerization domain-2), le gène le plus étudié, et associé à la MC (Ogura et al. 2001, Strober et al. 2008). Il est localisé sur le chromosome 16 dans le locus de MII 1. On lui accorde aussi le nom de "Caspase Activation and Recruitment Domain-containing (CARD)-15". C'est une protéine intracellulaire qui est exprimé dans le cytoplasme des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, et des cellules Paneth de l'intestin. Cette protéine se lie à la dipeptide muramyl (DPM). C'est un peptidoglycane présent dans les parois cellulaire des bactéries Gram+ et Gram-. Lors de la liaison a son ligand, NOD-2 induit l'activation de NF-kB et la production des cytokines pro-inflammatoires. Les mutations de ce gène ont été retrouvés chez les patients, au cours de cette maladie. Ces patients présentent souvent une implication iléale, des sténoses et des fistules, et nécessitent fréquemment des interventions chirurgicales (Abreu et al. 2002). Jusqu'à présent, seul les mutations de NOD-2 sont associées au phénotype clinique de la MC. Lors de sa stimulation avec DPM, ce gène muté encode une protéine qui est incapable d'activer NF-kB et qui aboutit à une immunité mucosale altérée contre la microbiote intestinal.

Autophagy-related protein 16-like (ATG16L)-1 est un autre gène associé à la MC (Hampe et al. 2007). Il est essentielle pour l'autophagie, un processus par lequel les cellules dégradent les protéines et les mitochondries défectueuses par la voie lysosomale, recyclent leurs constituants et maintiennent l'homéostasie cellulaire. Une défectueuse autophagie mène a une attaque plus faible contre les pathogènes et une incapacité à répondre aux bactéries commensales et bénéfiques comme *Bacteroides fragilis* (Uniken-Venema et al. 2017). L'IRGM ("Immunity-related GTPase family M protein") est également un autre gène relié à l'autophagie, spécifique à l'homme (non trouvé chez la souris) et il est associé à la MC. La protéine IRGM régule l'assemblage du complexe autophagique et relie l'autophagie avec NOD-2. L'interaction entre NOD2 et l'IRGM réduit l'inflammation intestinale (Noomen et al. 2009 ; Uniken-Venema et al. 2017). NOD-2 et NOD-1 détectent les bactéries, recrutent ATG16L1 sur le site d'entrée bactérienne et activent la réponse autophagique contre les

bactéries. Les défaillances du NOD-2-ATG16L1 et de l'IRGM rendent le processus d'autophagie défaillant.

IL-23R : Plusieurs variants du gène de l'IL-23R sont associées à la MII. Toutes ces variantes présentent une augmentation de fonction. L'IL-23 (un hétérodimère composé de deux sous-unités p19 et p40) se lie à ce récepteur, active STAT-3 et STAT-4 et induit les réponses de TH17, qui peuvent fournir une défense contre les bactéries, mais également favoriser l'inflammation. Les variants qui protègent contre la MII, disposent d'une capacité réduite pour induire la différenciation des cellules TH17 (Cătană et al. 2015 ; Uniken-Venema et al. 2017).

Caspase activation and recruitment domain-containing (CARD)-9 encode pour un "pattern recognition receptor" (PRR) qui orchestre la réponse immunitaire innée contre les bactéries et les champignons. Les variants génétiques qui causent une perte ou réduction d'expression de CARD-9 sont associés à la MII (Alves de Medeiros et al. 2016). CARD-9 favorise les bactéries métabolisant le tryptophane dans l'intestin. Les métabolites du tryptophane induisent l'IL-22 à partir des cellules TH17 via les récepteurs d'hydrocarbure aryle et maintiennent l'homéostasie intestinale (Marsland 2016)

Ring Factor Protein (RNF)-186 encode une ligase E3 d'ubiquitine qui régule la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. La perte de fonction du gène muté protège de la CU (Uniken-Venema et al).

Positive Regulatory Domain (PRDM)-1 encode pour la protéine BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1). Cette protéine est un répresseur de la transcription. Il intervient dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, le développement des cellules TH17, les fonctions effectrices des cellules NK, des macrophages et des cellules dendritiques. La perte de fonction des variantes de ce gène, aboutit à une réponse immunitaire exagérée et accroît la susceptibilité à la MII (Uniken-Venema et al. 2017).

En plus, les variations dans plusieurs loci/gènes humaines ont montré des associations significatives avec la MII. Elles incluent des gènes qui encodent des cations organiques OCTN-1 et -2 (Organic Cation/Carnitine Transporter-1 and -2), du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC genes), DLG-5 (Disk Large Homolog-5) (qui s'implique dans l'intégrité de l'intestin), TLR4 (Toll-like receptor-4), FUT-2 (fucosyltransferase-2), et les

gènes qui encodent des protéines qui favorisent ou inhibent l'apoptose, par exemple XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), et *cetera* (Fiocchi 2009 ; Kaser et al. 2010 ; Cătană et al. 2015 ; Uniken-Venema et al. 2017).

Facteurs environnementales

Une faible proportion des gènes/loci associés à la MII sont impliqués dans la variabilité de la maladie (13,6% pour CD et 7,5% pour CU ; Jostins et al. 2012), ce qui suggère l'importance des facteurs environnementaux. Ces facteurs incluent le microbiote intestinal, le style de vie, la diète, l'exposition au soleil, les infections, l'utilisation d'antibiotiques et les stress psychosociaux et *cetera*.

L'hypothèse concernant l'hygiène a servi pour expliquer, en partie, la croissance de l'incidence de la MII au cours des dernières cinquante années. Il a été mentionné que l'amélioration des conditions d'hygiène mène à une diminution de la diversité du microbiote intestinal et par conséquent une diminution du nombre de leurs gènes fonctionnels dans l'intestin, qui en résulte à une augmentation de l'incidence à la MII (Ley et al. 2006). L'hypothèse explique également une corrélation négative des MII avec les parasites du groupe des helminthes et les infections avec *Helicobacter pylori* (Vatn & Sandvik 2014). De plus, l'hypothèse « Cold Chain » propose qu'il existe une corrélation positive entre l'augmentation du taux de l'incidence de la MC et l'utilisation des réfrigérateurs. L'hypothèse est fondée sur une observation qui démontre que les bactéries psychrotrophiques, telles que *Yersinia* et *Listeria* croissent bien à une température allant de -0,1 à 10°C, et donc échappe à la réfrigération. La présence de ces bactéries dans nos produits alimentaires provoque une dysbiose soit un changement anormal dans la composition du microbiote intestinal. Cela active la MC tout en induisant une réponse immunitaire anormalement agressive de la muqueuse intestinale et une inflammation de l'intestin (Hugot et al. 2003, Vatn & Sandvik 2014). Il est intéressant de noter que ces bactéries sont présentes dans les lésions de la MC.

Puisque la MC ressemble à la maladie de Johne, une inflammation chronique de l'intestin causée par la paratuberculose, une sous-espèce de *Mycobacterium avium*, cette bactérie est soupçonnée être un agent causal de la MC (Chacon et al. 2004 ; Feller et al. 2007 ; Waddell et al. 2015). La recherche sur cet aspect de la maladie reste peu concluante. On

soupçonne également que les vaccins pour bébés peuvent causer la maladie. Cependant, il n'y a pas d'évidence qui démontre l'implication de n'importe quel virus ou de vaccin antiviral (Rubéole, Rougeole et l'oreillon) dans la causalité de la MC (Di Sabatino et al. 2013). En dépit de cette importante recherche, le sujet demeure controversé et non concluant.

Une variation de l'exposition au soleil peut expliquer le gradient nord sud dans l'incidence de la maladie (Schultz & Butt 2012). Cette exposition aux rayons solaires a un impact sur la production de la vitamine D dans le corps. Une carence de cette vitamine peut survenir chez les patients atteints de la MC, en raison d'une exposition réduite au soleil et d'une diminution de l'absorption de certaines sources alimentaires. La vitamine D est connue pour son action anti-inflammatoire et immunorégulatrice (Limketkai et al. 2016). Les polluants environnementaux, les contaminants de l'eau potable comme le fer, la diète, le style de vie sédentaire, la dépression, l'anxiété, les stress psychologiques, les infections périnatales, l'utilisation d'antibiotiques, les contraceptifs et les familles avec un faible nombre d'enfants augmentent le risque de la MC. En addition, l'allaitement a un effet protecteur sur la maladie (Cornish et al. 2008 ; Mikhailov & Furner 2009 ; Uniken-Venema et al. 2017). Les garçons nés par césariennes sont plus à risque d'être atteints de la MC que les filles nées de la même façon (Malmberg 2012). Il est intéressant de noter, la consommation du tabac protège de la CU mais agit comme un facteur de risque pour développer la MC. Les patients fumeurs sont plus à risque de développer des fistules, des sténoses et de rechute suite à une chirurgie. La fumée secondaire est aussi un facteur de risque (van der Heire et al. 2009). L'appendicectomie augmente le risque de MC et les patients ayant reçu cette chirurgie sont plus susceptibles de développer une sténose (Lakatos 2009). L'augmentation de consommation de protéines animales, de gras (notamment les mono et polyinsaturés et les acide gras de type oméga-6), les sucres raffinés, les édulcorants, la nourriture en canne, les préservatifs alimentaires et une alimentation faible en fibres augmente les risques de la MC (Lee et al. 2015 ; Liu et al. 2015). De plus, la maladie est plus prévalant chez les cols blancs que les cols bleus, les travailleurs de nuit ainsi que les individus ayant un horaire irrégulier (révisé par Vatn & Sandvik 2014).

Symptômes et indications cliniques

Tel qu'il a été mentionné précédemment, les périodes de la maladie active (rechutes) alternent avec celles de la maladie inactive (remissions). Les symptômes cliniques de la maladie varient selon si la maladie est active ou inactive. Elles comprennent la fatigue, la douleur abdominale, les crampes abdominales fréquentes, une envie fréquente d'aller aux toilettes, les signes d'obstruction intestinale, la diarrhée ou la constipation, la fièvre, un saignement rectal, du sang dans les selle et *cetera*. Chez les adultes la maladie cause une perte de poids, cependant, à peu près le tier des enfants atteints de la maladie présentent un retard de croissance (Beatties et al. 2006 ; Bousvaros et al. 2006). Ces effets résultent d'une inflammation chronique de l'intestin, une mauvaise absorption alimentaire dans l'intestin provoquant des carences nutritives, une augmentation de la perméabilité intestinale et la perte d'appétit chez les patients. La performance scolaire des enfants atteints est compromise. En raison de la mauvaise absorption intestinale des nutriments et des vitamines, l'ostéoporose et l'ostéomalacie peuvent survenir chez les patients atteints de la MII. Les enfants atteints de la maladie sont souvent déficients en folate (vitamine B9), vitamine B12 et le fer. Environ 25-30% des patients pédiatriques développent l'anxiété et la dépression (Rabizadeh & Dubinsky 2013). Il est intéressant de noter qu'il n'y a aucune corrélation entre la sévérité des symptômes cliniques et l'ampleur des dommages de la paroi intestinale chez les patients de la MC (Cosnes et al. 2011). Les patients atteints peuvent développer des fibroses et des sténoses intestinales (rétrécissement anormal d'une partie du lumen intestinal). Ils peuvent aussi développer des fissures et des fistules qui peuvent nécessiter des interventions chirurgicales fréquentes. Jusqu'à 29% des patients atteints de la CU et 50% de la MC nécessitent une intervention chirurgicale dans les 10 ans après le diagnostic malgré la thérapie. En outre, ils peuvent développer des manifestations non digestifs qui peuvent toucher leur articulations, peau, yeux et parfois leur vésicule biliaire (Uniken-Venema et al. 2017).

Immunopathogénèse

Dans les stades précoces, une infiltration abondante des neutrophiles dans les muqueuses est observée, entraînant par la suite le recrutement des monocytes et des lymphocytes (Fournier & Parkos 2012). Au début, les lésions sont généralement typiquement caractérisées par des ulcères et des abcès cryptiques. La chronicité de l'inflammation entraîne l'apparition de granulomes non-caséux. Quoique les granulomes représentent une des caractéristiques histologiques de la maladie de Crohn, ils sont présents dans moins que 50% des biopsies endoscopiques. Comme ils sont localisés dans les sous-muqueuses plutôt que dans les muqueuses, elles se retrouvent dans plus de 70% des spécimens chirurgicaux. D'autres caractéristiques communes de la maladie incluent une infiltration abondante des lymphocytes et des monocytes dans la lamina propria, les craquelures et les fissures dans la muqueuse qui finissent par devenir des véritables fistules perforant la paroi intestinale (Parkos 2012 ; Geremia et al. 2014). Les ulcères sont initialement petits et superficiels, puis convergent et entourent les zones non-affectées. Ils donnent à la muqueuse une apparence typique d'une chaussée ou de « cobblestone ». Les abcès intra-abdominal et péri-anal, les fistules ..., sont des complications qui existent dans la MC (Figure 4). L'apparition des fistules, des lésions qui perforent le tractus gastro-intestinal jusqu'à atteindre un autre organe ou la surface de la peau ; les fistules peuvent se propager jusque dans la vessie urinaire, l'urètre et le vagin ou ressortir près de l'anus. La fibrose peut provoquer un rétrécissement de la lumière intestinale (sténose) accompagnée par le développement des dilatations intestinales pré-sténotiques (Di Sabatino et al. 2013).

Les cellules épithéliales intestinales (CEI) dans la MC sont soumises à un stress oxydatif et à l'apoptose (Kaser et al. 2010). Cela entraîne des défaillances (défectuosités) dans les fonctions de la barrière intestinale. Il faut bien noter une augmentation de la concentration de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans la circulation, aussi bien que dans l'intestin chez les patients atteints de la MC (Neurath et al. 2014, Fina & Pallone 2008). Ces cytokines pro-inflammatoires provoquent des défectuosités dans les jonctions serrées et les jonctions adhérentes de l'épithélium intestinale qui causent également une augmentation anormale de la perméabilité intestinale (Tateishi et al. 1997). L'augmentation de cette perméabilité entraîne une augmentation de la translocation des produits bactériens comme le LPS, les fragments

bactériens et même la bactérie en entier dans les tissus intestinaux, dans les ganglions lymphatiques régionaux (par exemple les ganglions lymphatiques mésentériques) et la circulation systémique. Cette translocation bactérienne cause une activation intense du système immunitaire. Par ailleurs comme mentionné ci-dessus, il est possible de réaliser que la MC est, de plus en plus, accompagnée d'une diminution de la diversité du microbiote intestinal. Donc, la composition de ce microbiote devienne anormale (Baumgart & Sandborn 2012). Quoique, qu'il en n'est pas clair si cette composition anormale du microbiote soit la cause, ou la conséquence, de cette maladie.

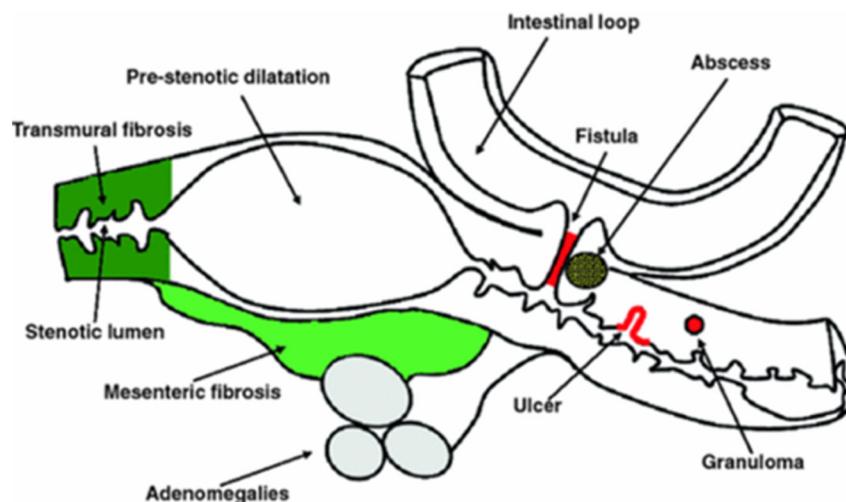


Figure 4. Les différentes lésions présentées dans l'intestin des patients atteints par la maladie de Crohn. A Noter : fibroses, sténoses, ulcères, abcès, fistules, granulomes et nœuds lymphatiques élargis (adénomégalies). Tiré de Di Sabatino et al. 2013

Les antigènes bactériens sont présentés dans le lamina propria (LP) par les DC aux lymphocytes T. De même, les antigènes activent directement les cellules immunitaires innées telles que les macrophages, les cellules NK, les cellules NKT et les IL et *cetera* (Geremia et al. 2014). Une observation a démontré que la couche de mucus, qui forme normalement une

barrière entre la couche épithéliale intestinale et la flore bactérienne intraluminale s'amincit. Bien que, on ne voit pas une réduction dans le nombre des cellules caliciformes (goblet cells) dans la MC, comme c'est le cas en CU. Cependant, une réduction du gel protecteur formant les mucines a été observée dans la MC (Cornick et al. 2015). Par conséquent, les bactéries intestinales acquièrent un contact direct avec les cellules épithéliales intestinales (CEI). Elles activent les CEI et les DC via les récepteurs comme Toll « Toll-like receptors ou TLRs ». Ce dernier type de cellules émet leurs projections à travers les espaces intercellulaires jusqu'à la surface intestinale et capture les antigènes bactériens. Ainsi, les bactéries intestinales pourraient déclencher une inflammation même si elles ne franchissent pas la barrière intestinale (Rescigno & Di Sabatino 2009). Il a été rapporté qu'un déséquilibre entre les répertoires protéiques pro- et anti-apoptotiques, induit une défectuosité des fonctions apoptotiques des cellules T activées présentes dans le lamina propria. En conséquence, il y a une prolongation de la survie des cellules T et un accroissement dans la production de leurs cytokines pro-inflammatoires, qui maintiennent l'inflammation des muqueuses et les dommages tissulaires. Les cellules du système immunitaire inné comme les cellules NK, ILC, et les macrophages produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines sont IL-12 et IL-23, qui stimulent effectivement la différenciation des lymphocytes TCD4⁺ en des cellules effectrices TH1 et TH17. IL-12 stimule les cellules TH1 à sécréter des cytokines telles que TNF- α , IFN- γ et IL-2, et induit l'expression de T-bet dans ces dernières (Macdonald & Monteleone 2005 ; Cătană et al. 2015). IL-23 stimule les cellules TH17 exprimant ROR- γ t et induit la sécrétion d'IL-17 (Abraham et Cho 2009). Alors que la MC est accompagnée par une fréquence plus élevée des TH1 et TH17, la fréquence de TH2 et TH17 est supérieure dans la CU (Fuss et al. 1996 ; Strober & Fuss 2011). On note que dans la maladie de Crohn, l'expression de α 4 β 7 intégrin est plus élevée sur les cellules TCD4⁺ infiltrant l'intestin (Zundler & Neurath 2015). En outre, les concentrations d'IL-21 et d'IL-22 sont plus élevées chez les patients atteints de la MII et contribuent à l'inflammation (Schmechel et al. 2008 ; De Nitto et al. 2010). L'IL-17 sécrétée par les cellules TH17 et d'autres cellules immunitaires (e.g. ILC3) induisent IL-8 (CXCL-8) provenant des CEI. L'IL-8 déclenche une infiltration des neutrophiles dans les parties inflammées de l'intestin (Laan et al. 2001). Le TNF- α qui est produit par TH1 et d'autres cellules immunitaires (e.g. macrophages, les cellules NK et les neutrophiles, et *cetera*.) suscite une destruction tissulaire locale, induit la production des

protéines de matrice extracellulaire provenant des fibroblastes et favorise la fibrose. La figure 5 présente diverses étapes observées dans l'immunopathogénèse de la MC

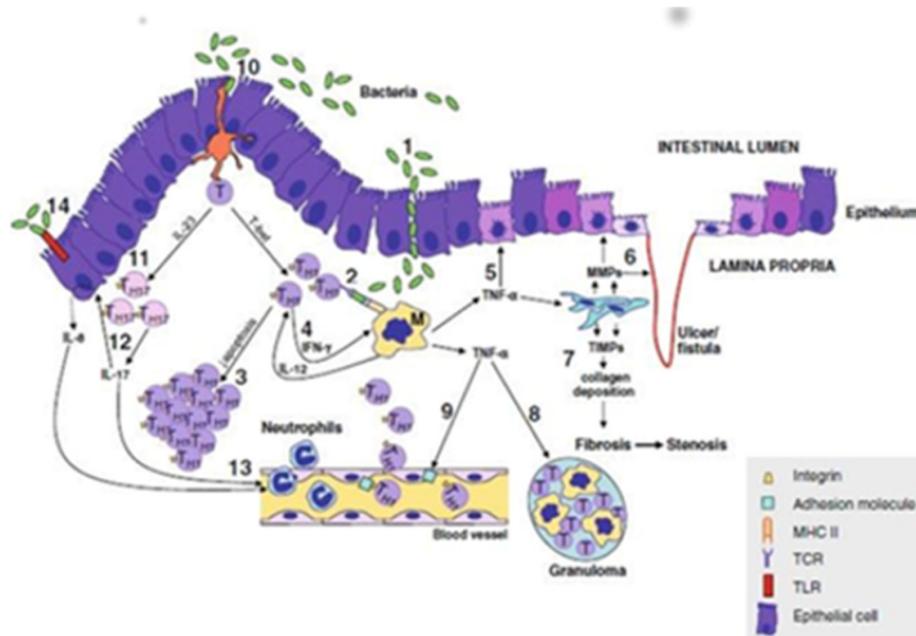


Figure 5. Représentation schématique de l'immunopathogénèse de la maladie de Crohn. Transmigration paracellulaire des pathogènes/antigènes (1). Les bactéries peuvent déclencher l'inflammation soit par les TLR (14) ou bien par les DC (10). Les DC polarisent les lymphocytes T en TH17 via IL-23 (11). Les TH1, activées par les macrophages eux-mêmes activés de façon aberrante, produisent une grande quantité des cytokines pro-inflammatoires (2). Parmi ceux-ci, l'IFN-γ promeut la production de l'IL-12 par les macrophages. L'IL-12 va soutenir l'activation des cellules T (4). Des défauts d'apoptose causent une augmentation de la survie des cellules T (3). L'IL-17, produit par les TH17, promeut le recrutement des neutrophiles dans l'intestin enflammé (13). De plus, les cellules épithéliales sécrètent l'IL-8, induite par l'IL-17 et les TLR activés (12) (14) qui va promouvoir le recrutement des neutrophiles à la muqueuse enflammée. Par ailleurs, les macrophages sécrètent du TNF-α causant le recrutement des neutrophiles dans l'intestin enflammé, par l'induction des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (9). Le TNF-α est responsable des dommages à l'épithélium (5) et à la formation de granulomes (8). Le TNF-α provoque un déséquilibre de la sécrétion d'enzymes par les fibroblastes, soit par la production de metalloprotéinases de la matrice « Matrix Metalloproteinases ou MMP », responsable de la dégradation des tissus conjonctifs et l'apparition d'ulcères et de fistules (6), ou vers un excès d'inhibiteurs

tissulaires de MMP « Tissue inhibitors of metalloproteinases ou TIMPs » créant des fistules et des fissures (7). (Tiré de Di Sabatino et al. 2013).

La cascade d'événements menant à une inflammation dans la MC est bien comprise. Cependant, peu de choses sont connues sur le développement de la fibrose et sténose intestinale. Il semble que les mécanismes de réparation tissulaires deviennent anormales, ce qui résulte en une accumulation des protéines de la matrice extracellulaires « extracellular matrix proteins ou EMPs » dans la paroi intestinale, une fibrose et une adhésion anormale entre différents segments de l'intestin, ou entre l'intestin et d'autres organes dans l'abdomen (Ravi et al. 2007 ; O'Shea & Smith 2014). Dans la fibrose, les TIMPs prédominent sur les MMPs (Matrix Metalloproteinases). La fibrose provoque une contraction et un rétrécissement de la lumière intestinale entraînant une sténose. Une production déséquilibrée des MMPs (qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaires telles que le collagène, la laminine, et la fibronectine) et les TIMPs (qui inhibent l'action de MMPs) induit la formation de la fibrose et des fistules. (Figure 6). Les protéines de la matrice dégradées jouent également un rôle actif dans le développement de l'inflammation intestinale (Petrey & de la Motte 2017).

Plusieurs types cellulaires peuvent déclencher une fibrose intestinale. À cet égard, les cellules stromales vasculaires se différencient en fibroblastes et myélofibroblastes, qui produisent des quantités abondantes des protéines de la matrice extracellulaires. TGF- β , IL-13 et IL-6 sont des cytokines importantes qui favorisent la fibrose (Rieder & Fiocchi 2009). De ces derniers, le TGF- β est la plus étudiée. Cette cytokine et son récepteur sont surexprimés durant la fibrose intestinale. Il est bien connu que l'inflammation induit la fibrose. Cependant, une fois amorcée, la fibrose se perpétue et ne répond pas aux médicaments anti-inflammatoires.

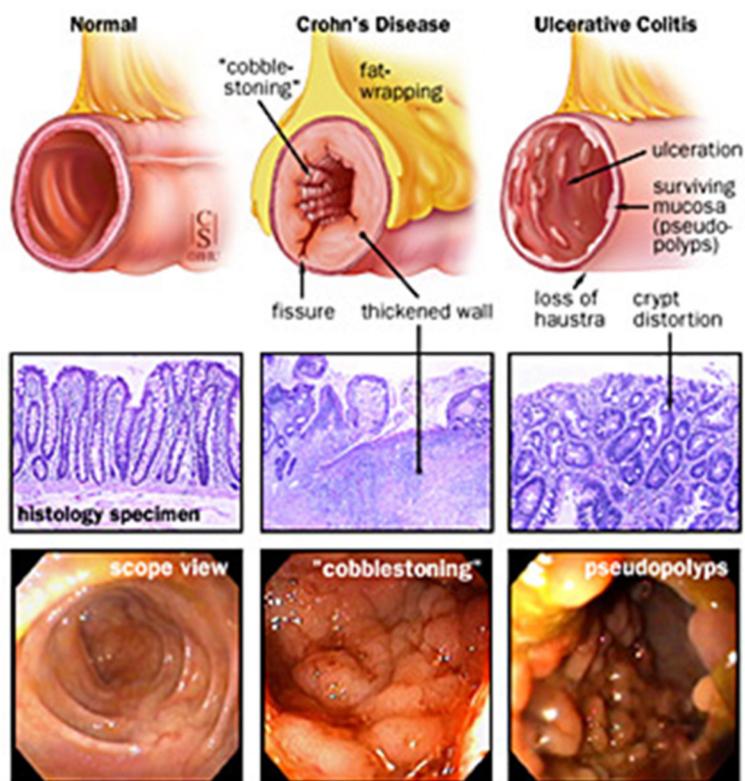


Figure 6. Apparence de la muqueuse intestinale chez les personnes saines, atteintes de la MC et de la CU. Vue transversale schématisée du tractus gastro-intestinale (haut), coupe histologique (milieu) et la vue endoscopique (bas)

(Téléchargé de : <http://baromedical.ca/medical-crohns-and-colitis.php> ; le 14 juillet 2017).

L'inflammation intestinale chronique observée chez les patients atteints de la MC peut entraîner le développement du cancer colorectal (CCR). Le risque de cancer est également proportionnel à la durée d'activité de la maladie. Les patients ont un risque 4.5 fois plus élevé de développer le CCR, dans les 8 à 10 ans après le diagnostic de la maladie (Kin & Chang 2014 ; Barral et al. 2015). Il convient de noter que le TGF- β joue un rôle important dans cette carcinogénèse. Il induit « epithelial-to-mesenchymal transition ou EMT », un processus au cours duquel les cellules épithéliales perdent leurs polarité et leurs jonctions intercellulaires et se transforment en cancer.

Diagnostique de la maladie de Crohn

Malheureusement, ce n'est pas possible de diagnostiquer la MC par un seul test. Plusieurs tests devraient être effectués, telles qu'un examen physique, une sérologie, une endoscopie, des examens radiologiques, une histologie des biopsies intestinales et y compris l'historique du patient. (Laass 2014 ; Oliveira & Monteiro 2017). Des anticorps spécifiques à *Saccharomyces cerevisiae* et à la glycoprotéine-2 (un auto-antigène) existent dans la circulation sanguine des patients atteints de la MC et aident à discerner la MC de la CU (Table 1 ; Laass 2014). Plusieurs marqueurs sanguins sont utiles pour déterminer l'ampleur de l'inflammation. À cet égard, la protéine C réactive (CRP) est souvent quantifiée, sa concentration est augmentée dans 96% des patients de la MC (Morrison et al. 2009 ; Di Sabatino et al. 2013). Il s'agit d'une protéine pentamérique de la phase aiguë et elle est produite dans le foie en cas d'inflammation. Elle se lie à la phosphocholine exprimée à la surface des cellules mourant ou mortes et certaines bactéries. Elle initie l'activation de la cascade du complément. Les selles du patient sont aussi testées pour une variété de biomarqueurs dont les concentrations varient dans la MC. Ces biomarqueurs incluent la calprotectin, l' α -anti-trypsin, le lysozyme, l'albumine, les IgA et les acides biliaires.

L'indice de l'activité de la maladie de Crohn (Crohn disease activity index ; CDAI) est un moyen pour évaluer la sévérité de la maladie et l'efficacité du traitement. Le score de CDAI qui est plus de 450 chez un patient indique que la maladie est active et sévère, tandis qu'un score de moins de 150 indique une rémission (Best et al. 1976). Il existe un indice pour la maladie similaire chez les enfants, qui est appelé l'indice de l'activité de la maladie de Crohn pédiatrique (Pediatric Crohn disease activity index ; PCDAI) (Turner et al. 2010). De même, un autre indice distinct concernant la colite ulcéreuse chez les enfants a été décrit, appelé l'indice de colite ulcéreuse. Pédiatrique (Pediatric Ulcerative Colitis disease index ; PUCDI) (Turner et al. 2007).

Traitement de la maladie de Crohn

L'objectif principal du traitement est d'induire une rémission clinique de la maladie, de la maintenir et de promouvoir une guérison de la muqueuse (Di Sabatino et al. 2013). Pour maintenir la rémission, le patient passe à un traitement moins sévère, afin de réduire les effets secondaires et la toxicité des médicaments. Malheureusement, nous ne disposons d'aucun remède spécifique pour la MC. Les traitements sont prescrits pour retarder la progression et la sévérité de la maladie, pour réduire l'inflammation et la douleur et promouvoir la guérison des lésions intestinales, du dommage aux tissus et de la fibrose (Baumgart & Sandborn 2012 ; De Cruz et al. 2013). Il est important de suivre l'efficacité du traitement en surveillant le phénotype et la sévérité de la maladie. L'approche thérapeutique pour la MC dépend de la sévérité de la maladie, son comportement et sa localisation (Di Sabatino et al. 2013 ; Lahad & Weiss 2015). La figure 7 illustre les différentes options de traitements disponibles pour la MC. Les médicaments pour traiter les patients atteints de la MC sont des anti-inflammatoires dont le 5-aminosalicylate (ex. Sulfasalazine) et des corticostéroïdes (ex. Prednisone et le Budesonide), des antibiotiques (ex. Métronidazole et le Ciprofloxacine) et des immunosuppresseurs comme l'azathioprine, le 6-mercaptopurine et le méthotrexate. Ces agents immunosuppresseurs sont des anti-métabolites qui inhibent la prolifération cellulaire et réduit l'inflammation et la cytotoxicité induite par les cellules NK (Nielsen et al. 2001). En plus de ces médicaments, des produits biologiques sont utilisés dans le traitement de la MC et dans d'autre maladie inflammatoire comme l'arthrite rhumatoïde. TNF- α est la cible biologique la plus importante. L'Infliximab et l'Adalimuma, deux anticorps monoclonaux spécifiques contre le TNF- α , sont largement utilisés. Les anticorps anti-TNF- α et des corticostéroïdes sont normalement administrés, seuls ou en combinaison, pour réduire l'inflammation. Les corticostéroïdes sont des médicaments anti-inflammatoires ayant des effets rapides. Ils sont souvent combinés avec un produit qui a une action relativement lente comme les produits biologiques. Il est bien connu, depuis longtemps que la concentration de TNF- α augmente dans la circulation et dans les intestins des patients atteints de la MC (Dionne et al. 1997). L'Infliximab est un anticorps semi- humanisé (combinaison de séquence d'acides aminés provenant des anticorps de souris et humain) tandis que l'adalimumab est un anticorps complètement humanisé. Leur mécanisme d'action est de neutraliser le TNF- α humain.

Leur utilisation prolongée mène à une résistance et une perte d'efficacité. On observe également l'apparition des effets secondaires comme l'activation des mycobactéries et des infections virales, l'émergence de cancers (lymphome) et certaines maladies auto-immunes (Morrison et al. 2009 ; Lahad & Weiss 2015). Des nouveaux anticorps comme le Certolizumab, basés sur «Fragment antigen-binding/ Fab » et spécifiques au TNF- α , sont testés cliniquement chez des patients atteints de la MC. L'anticorps ne fait que neutraliser le TNF- α et n'exerce aucun effet médié par la région Fc. Des anticorps monoclonaux contre différentes molécules d'adhésions comme le Vedolizumab, qui cible le « Mucosal Addressin cell adhesion molecule/MadCAM » et le Natalizumab, qui cible VLA-4 ou l'intégrine $\alpha 4\beta 1$, ont été approuvés par la FDA pour la MC. Ces anticorps ciblent la mobilisation des cellules enflammées dans les intestins et réduisent l'inflammation intestinale. L'usage du Natalizumab est limité à cause du développement d'une leucoencéphalopathie multifocales progressive (Ungar & Kopylov 2016). De plus, les thérapies nutritionnelles ont également montré des effets bénéfiques dans la MC

Malgré ces traitements, des dommages exhaustifs de la paroi intestinale peuvent survenir et nécessitent une intervention chirurgicale. Environ 70 à 80% des patients devaient subir une intervention chirurgicales au cours des 20 ans qui ont suivi le diagnostic de la maladie (Cosnes et al. 2011). Même après la chirurgie, la majorité des patients vont expérimenter une rechute de la maladie (De Cruz et al. 2013). Les médicaments disponibles peuvent réduire l'inflammation mais ils ne peuvent pas inverser le processus du développement de la fibrose dans l'intestin. Pour cette raison, nous avons un besoin urgent de développer des traitements qui peuvent réduire ou inhiber la formation de fibrose dans l'intestin des patients atteints de la MC. Il est intéressant de noter que des nouveaux médicaments sont encore en cours de développement (revu dans Löwenberg & D'Haens 2015 ; Ungar & Kopylov 2016). Des nouvelles cibles moléculaires sont aussi requises.

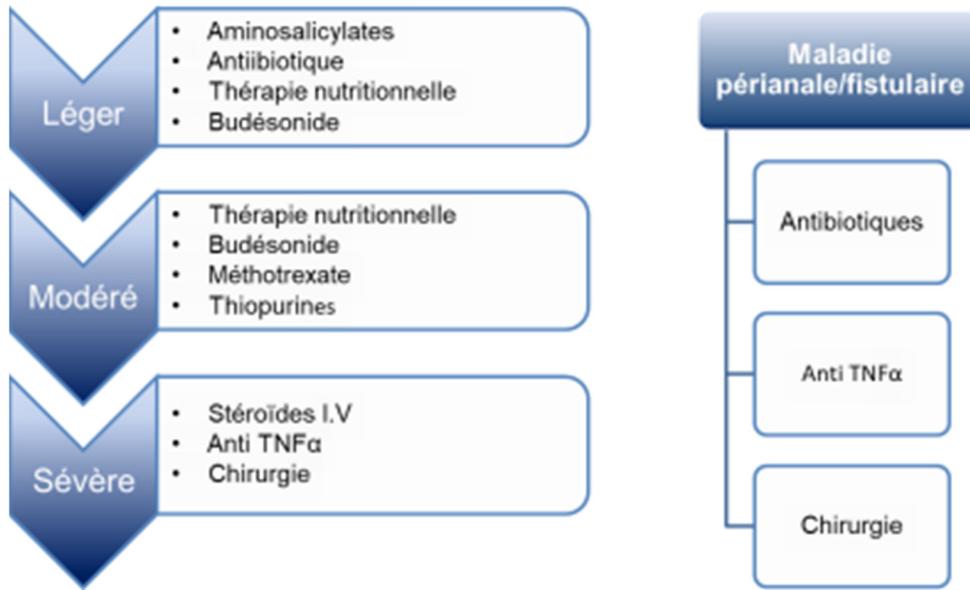


Figure 7. . Différents médicaments utilisés dans le traitement de la maladie de Crohn pédiatrique. Le choix du médicament est basé sur la sévérité, l'endroit et l'historique de la maladie. Tiré de Lahad & Weiss 2015.

Les Cellules Natural Killer

Caractéristiques générales des cellules Natural Killer

Les cellules NK sont des cellules effectrices du système immunitaire inné. Les cellules NK ont une morphologie de grands lymphocytes granuleux de faible densité, avec un cytoplasme riche en granules lytiques. Elles se développent et se différencient majoritairement dans la moelle osseuse. Cependant, le thymus, la rate, l'utérus, les amygdales et les ganglions lymphatiques peuvent être des sites possibles pour le développement de ces cellules (Freud & Caligiuri 2006). Leur phénotype est CD3⁻CD19⁻CD14⁻ et CD56⁺ et/ou CD16⁺ (FcγRIIIA), comme marqueurs de surface (Robertson & Ritz 1990 ; Iannello et al. 2008). Les cellules NK murines n'expriment pas CD56. CD27 est souvent utilisé comme un marqueur de surface équivalent à CD56 chez ces dernières. Les cellules NK représentent environ 10 à 15% des cellules mononuclées dans la circulation sanguine. En réponse aux stimuli inflammatoires, les cellules NK migrent vers les tissus et les organes affectés. Leur fonction principale est de tuer et éliminer les cellules du corps qui sont transformées, stressées ou infectées par les pathogènes. Les cellules NK sont des lymphocytes historiquement appelées « cellules tueuses naturelles » 'Natural Killer cells' en raison de leur capacité apparemment spontanée à lyser des cellules tumorales ou des cellules infectées en l'absence d'immunisation spécifique préalable. Elles dégranulent en libérant à la synapse le contenu de leurs granules cytoplasmiques, en particulier la perforine et la granzyme B. Contrairement aux cellules T, elles ont la capacité de tuer les cellules infectées par des virus dans l'organisme sans aucune sensibilisation préalable. En outre, les cellules NK, sont également capables de tuer les cellules de l'hôte qui ne parviennent pas à exprimer les molécules qui sont impliquées dans la reconnaissance du "soi" (e.g. MHC class I antigens) ou deviennent "stressée". En plus de leur fonction de tuer différentes cellules chez l'hôte, elles jouent un rôle important dans la régulation du système immunitaire (Fu et al. 2014). Lors de leur activation, elles produisent une variété des médiateurs solubles (cytokines et chimiokines). L'IFN- γ est une des plus importantes cytokines secrétée par les cellules NK. Cette cytokine active les macrophages et entraîne la différenciation des cellules T naïves en cellules T auxiliaire du type I (T helper 1 ou TH1). A noter que les cellules TH1 (et TH17) sont impliquées dans la pathogénèse de la MC. D'autres molécules qui régulent le système immunitaire telles que GM-CSF, TNF- α , IL-5, IL-

13, IL-10, TGF- β , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, et l'oxyde nitrique (NO) sont secrétées lors de l'activation des cellules NK. Il est intéressant de noter que les cellules NK secrètent de l'IL-22 (Cella et al. 2009 ; Xu et al. 2014), une cytokine de la famille de l'IL-10 capable de remédier l'inflammation dans un modèle murin de la CU (Sugimoto et al. 2008). Cependant des études récentes ont démontré que les cellules lymphoïdes innées de type 3 (ILC3) et les cellules TH2 et non pas les cellules NK sont responsables de la sécrétion de cette cytokine (Ahlforset al. 2014).

Le CD16 (ou Fc γ RIIIa) est un récepteur d'activation ayant une faible affinité pour la région Fc d'IgG. Par le biais de ce récepteur, les cellules NK peuvent tuer les cellules cibles par l'intermédiaire d'un anticorps ayant une spécificité de reconnaître l'antigène exprimée sur les cellules cibles. Ce processus est nommé « antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity ou ADCC » (Ahmad & Menezes 1996). Le processus d'ADCC joue un rôle important dans l'élimination des cellules cancéreuses et des cellules infectées par un agent pathogène. Le CD56 qui est une isoforme de « Neural Cell Adhesion Molecule ou NCAM », est impliqué dans l'adhésion homotypique des cellules NK. Il est aussi exprimé sur les lymphocytes T activés par des cytokines. Il a été démontré récemment que CD56 est capable de se lier à une molécule non identifiée qui se trouve sur *Aspergillus fumigatus* qui est un pathogène fongique opportuniste (Ziegler et al. 2017).

CD56 et CD16 sont généralement exprimés sur les sous-populations des cellules NK. En se basant sur l'expression de ces marqueurs de surface, deux principales sous-populations des cellules NK ont été distinguées et décrites (Figure 8). C'est les CD16⁺CD56^{low} et CD16⁻CD56^{high}. Environ 90% des cellules NK qui sont présentes dans la circulation sanguine proviennent du premier phénotype, tandis que le deuxième phénotype est principalement présent dans les tissus (Farag et al. 2002 ; Wilk et al. 2008). Cependant, en tout ce qui concerne leur capacité de prolifération, leur potentiel de cytotoxicité, leurs cytokines secrétées et leur réponse à des stimuli exogènes tels que les cytokines, ces deux sous-populations ne sont pas identiques. Les cellules NK CD16⁺CD56^{low} expriment des récepteurs (CD122) ayant une affinité modérée pour l'IL-2 et sont plus cytotoxiques. Elles expriment également des niveaux élevés des récepteurs « Killer-cell Ig-like Receptors ou KIR » (voir les détails ci-dessous). Par contre, les cellules NK CD16⁻CD56^{high} possèdent une forte capacité de

production des cytokines, mais sont moins cytotoxiques. Pourtant, lors de leur stimulation avec les cytokines, (e.g. IL-15), elles ressemblent à la sous-population de $CD16^+CD56^{low}$, et deviennent cytotoxiques (Wilk et al. 2008).

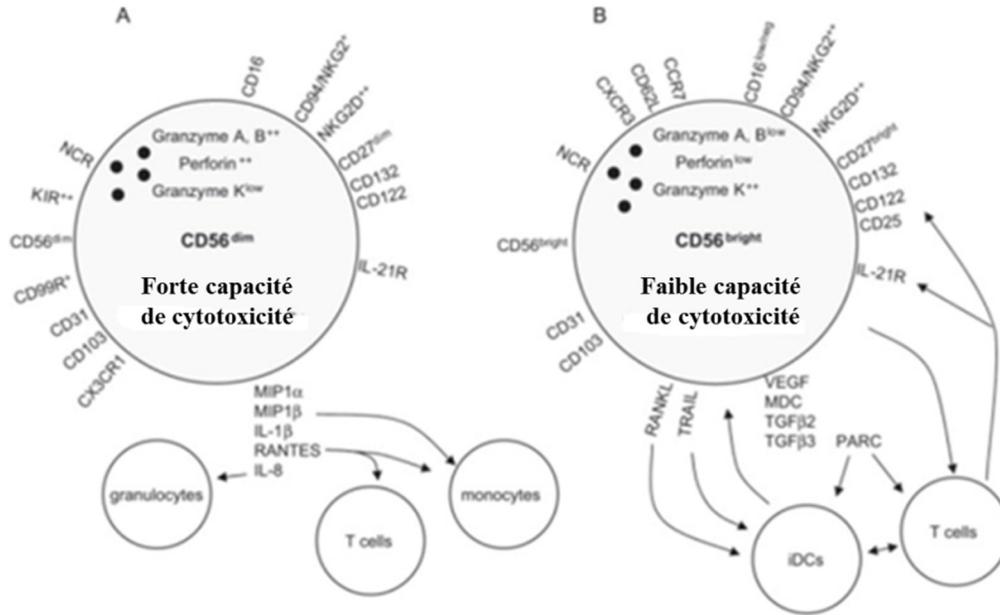


Figure 8. Les deux sous populations des cellules NK basés sur CD16 et CD56. L'image illustre les caractéristiques, les fonctions des cellules $CD56^{low}CD16^+$ et $CD56^{bright}CD16^{-/dim}$. Tiré de Wilk et al. 2008.

D'ailleurs les cellules NK humaines expriment aussi le CD27, un membre de la superfamille des récepteurs de $TNF-\alpha$ (« $TNF-\alpha$ receptor superfamily ; TNFRSF ») qui se lie à CD70. Ce dernier est également un membre de TNFRSF. Le Mac-1 (CD11b qui est connu aussi sous le nom intégrine αM), est une molécule, qui est exprimé sur les cellules NK. Il forme CR3 lors de sa liaison à l'intégrine $\beta 2$ (CD18). On se sert de CD27 et CD11b pour la classification des cellules NK en quatre sous-populations (mentionnés dans l'ordre de leur maturation) : $CD11b^+CD27^{low}$, $CD11^+CD27^{hi}$, $CD11b^{hi}CD27^{hi}$ and $CD11b^{hi}CD27^{low}$ (Fu et al. 2014). De même, trois de ces marqueurs sont également utiles pour classier les cellules NK humaines en cytotoxiques, tolérantes et régulatrices (Figure 9).

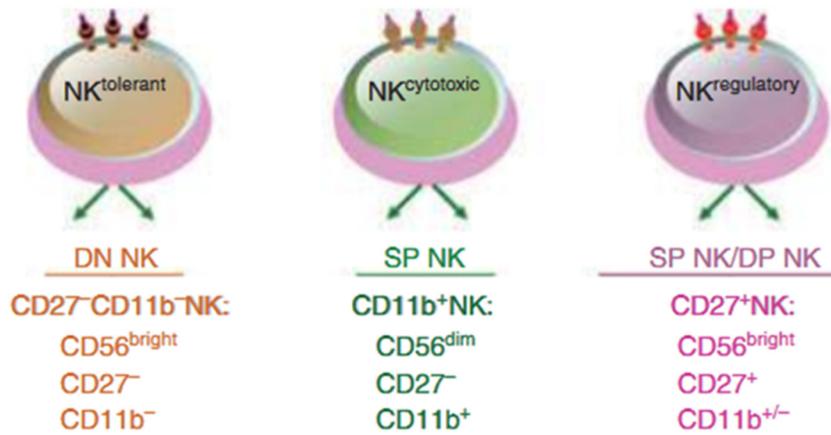


Figure 9. Les populations des cellules NK en fonction des marqueurs CD56, CD27 et CD11b. DN : Double négative, SP : Simple positive (Fu et al. 2014).

Environ 90% des cellules NK dans la circulation sanguine sont $CD27^-CD11b^+$ et cytotoxiques, néanmoins, approximativement 6% de ces dernières sont de type régulatrices et expriment CD27.

Les cellules NK constituent un sous-type d'une sous-population des cellules lymphoïdes innées (CLI) ou « Innate Lymphoid Cells/ILC ». Il y a trois sous-populations des CLI (CLI1, CLI2 et CLI3). Chacune de ses sous-populations possède un répertoire particulier en matière d'expression des facteurs de transcription et un profil spécifique des cytokines sécrétées (Mjösberg & Spits, 2016 ; Neill et al. 2017). En outre, ces caractéristiques correspondent aussi aux sous-populations de TH1, TH2 et TH17/TH22 des cellules TCD4 effectrices. Les cellules NK sont classifiées comme une sous-population appartenant au CLI1 avec un potentiel de cytotoxicité.

Comme mentionné ci-dessus, les cellules NK sont des cellules effectrices du système immunitaire inné. Néanmoins, des récentes études ont démontré l'existence des cellules NK mémoires. Ces dernières ont été découvertes chez les souris RAG^{-/-}, qui sont dépourvues des cellules T et B (O'Leary et al. 2006). Il a été démontré que ces souris présentent des réponses mémoires à une hypersensibilité induites par une haptène, et ceci se fait par l'intermédiaire des cellules NK. Ceci a été démontré par une hypersensibilité qui a été conféré à des souris RAG^{-/-} naïves après un transfert adoptif des cellules NK provenant des souris hypersensibilisés. De même, on reconnaît bien les cellules NK mémoires spécifiques aux virus HCMV qui expriment NKG2C (qui est un récepteur des cellules NK, voir ci-dessous) (O'Sullivan et al. 2015). Les mécanismes exacts étant à la base de la production des cellules NK mémoires dans le corps, ne sont pas encore connus. Cependant, ils peuvent varier selon les pathogènes ou antigènes. Alors, une très simple explication est que les cellules NK exprimant un ou plusieurs récepteurs qui reconnaissent les antigènes d'un pathogène et/ou le ligand induit par des lésions, le stress des pathogènes sur les cellules hôtes qui puissent se proliférer. L'hôte dont ces cellules NK est en expansion, produit des réponses mémoires. Ce sera très intéressant d'étudier si les réponses des cellules NK mémoires contre les bactéries intestinales existent chez les patients atteints de la MC. L'existence des cellules NK mémoires a des implications dans la lutte contre les pathogènes, le cancer et les stratégies de vaccination.

Comment les cellules NK reconnaissent les cellules cibles

Contrairement aux cellules T et B, les cellules NK expriment des récepteurs qui n'ont aucune spécificité antigénique. Les gènes de ces récepteurs sont en configuration germinale, et n'effectuent aucun réarrangements géniques, et n'expriment pas le gène RAG-1 et RAG-2. Par conséquent, les souris RAG-KO sont dépourvus des cellules T et B, mais contiennent des cellules NK fonctionnelles, bien qu'elles puissent subir des modifications subtiles (Andrew & Smyth 2010). La grande question est de savoir comment les cellules NK reconnaissent les cellules cibles a toujours fait l'objet d'une recherche intensive au cours des deux dernières décennies. Présentement, nous connaissons bien que les cellules NK expriment une multitude de récepteurs et corécepteurs à leur surface. Ces récepteurs reconnaissent différents ligands

qui sont exprimés à la surface des cellules cibles. Les récepteurs sont divisés en deux catégories, les récepteurs activateurs et les inhibiteurs qui se lient à leur ligands spécifiques à la surface des cellules cibles, et respectivement, activent ou inhibent les cellules NK, pour qu'elles puissent déclencher leur fonctions effectrices (tuer les cellules cibles et la relâche des médiateurs solubles) (Farang et al. 2002 ; Iannello et al. 2008). L'engagement des co-récepteurs fournit des signaux additionnels pour les cellules NK. Ainsi la capacité des cellules NK de déclencher des fonctions effectrices dépend de : 1) le répertoire des récepteurs inhibiteurs et activateurs qui sont exprimés par les cellules NK et 2) l'expression des ligands pour ces récepteurs sur les cellules cibles. Selon le modèle actuel du fonctionnement des cellules NK (Figure 10), les récepteurs activateurs et inhibiteurs des cellules NK se lient à leurs ligands spécifiques sur les cellules cibles et transmettent des signaux d'activation ou d'inhibition aux cellules NK. Cependant, la balance entre les signaux d'activation et d'inhibition, reçus par une cellule NK, détermine si les cellules NK vont exercer ou non leur fonctions de cytotoxicité, vont tuer ou épargner les cellules cibles. Le déclenchement de la cytotoxicité des cellules NK est accompagné également par la secretion des cytokines. Cependant la sécrétion des cytokines et d'autres médiateurs solubles (comme les chimiokines) peut se produire sans cytotoxicité si les cellules NK sont stimulées par des cytokines telles qu'IL-12 et l'IL-18.

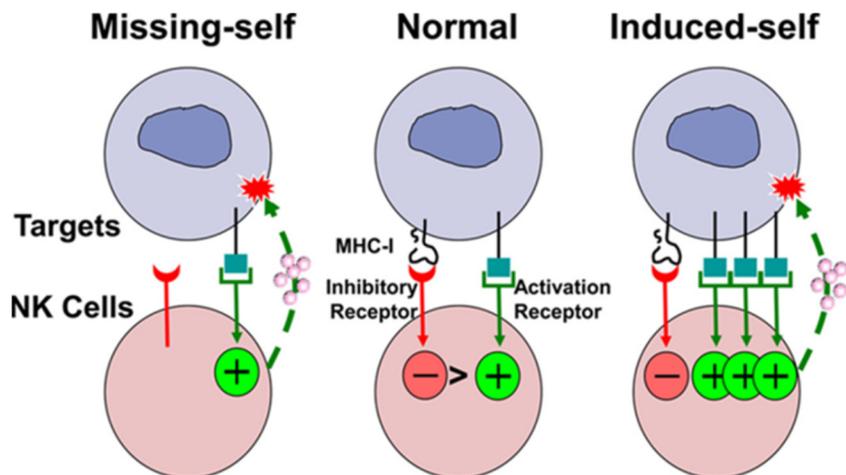


Figure 10. Un modèle de l'activation des cellules NK. Les cellules NK interagissent avec la cellule cible via ses récepteurs activateurs et inhibiteurs, qui reconnaissent leurs ligands spécifiques. L'équilibre entre les stimuli d'activations et d'inhibitions reçus par les cellules NK détermine si les cellules NK seront inhibées ou activées pour déclencher ses fonctions effectrices. Les cellules normales qui exprime les molécules du CMH de classe I ne sont pas tuées ; ces cellules sont tuées lorsqu'elles perdent l'expression de ces

molécules (missing-self : sois manquante). Les cellules deviennent susceptibles de tuer lorsqu'elles deviennent 'stressées' et qu'elles expriment les ligands qui activent les NK (induced self ; induction de soi). (De Elliott & Yokoyama 2011).

Les récepteurs et corécepteurs des cellules NK

Les récepteurs des cellules NK (NKR) sont classifiés en deux groupes inhibiteur et activateur, dont l'un ou l'autre inhibe ou déclenche les fonctions effectrices des cellules NK. D'autre part, les corécepteurs transmettent des signaux de stimulation, mais ne peuvent pas tous seuls déclencher les fonctions des cellules NK. Cependant, il est parfois difficile de distinguer entre récepteur et corécepteur. Par exemple l'intégrine LFA-1 est souvent décrite comme un corécepteur, mais souvent elle est capable de déclencher les fonctions des cellules NK (Barber et al. 2004). Différent récepteurs et corécepteurs, exprimés sur les cellules NK sont décrits ci-dessous :

1. KIRs : Ces récepteurs sont encodés par les gènes qui portent le même nom ; des gènes KIR. Ils sont le sujet d'intérêt pour cette étude de recherche. Ils sont décrits en détail ci-dessous.

2. NKG2 ou NK groupe 2 récepteurs : Les gènes de ces récepteurs sont localisés sur le chromosome 12p12.3-p13.2 dans une région appelé « NK gene complex ou NGC ». On leur confère aussi un autre nom, qui est « Killer-cell Lectin-like Receptors ou KLR ». Du point de vue structurale, ce sont des glycoprotéines membranaires intégrales de type II, «C-type, lectin-like integral membrane glycoproteins ». Il existe quatre récepteurs dans ce groupe : NKG2A/B (KLR-C1), NKG2C (KLR-C2), NKG2E/H (KLR-C3), et NKG2F (KLR-C4). B et H sont des isoformes des gènes A et E, respectivement. Ils résultent de l'épissage alternatif de leurs transcrits (Lanier 1998 ; Long 1999 ; Iannello et al. 2008). Pour leur expression en surface, ces récepteurs requièrent une autre molécule le CD94, qui est «lectin-like». Le CD94 forme un hétérodimère avec le NKG2 et ce complexe sera exprimé à la surface. Chacun des récepteurs NKG2 se lie avec le HLA-E, une molécule du CMH de classe I non classique (CMH-classe Ib). Il est à noter que le HLA-E lie un peptide qui est dérivé de peptides de signal du CMH classique du class I (HLA-A, B et C) et du CMH non classique du class 1b (HLA-G). Si ces molécules du CMH class I ne sont pas exprimés par les cellules, HLA-E aussi ne sera pas présente à la surface des cellules en raison de l'absence d'un peptide. La

queue cytoplasmique de NKG2A porte deux 'ITIMs' (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs »). NKG2A agit comme un récepteur inhibiteur sur les cellules NK. Cependant, dans cette famille de récepteurs, NKG2C et NKG2E sont des récepteurs activateurs (tableau 3). Ces récepteurs sont exprimés principalement sur la sous-population CD56^{high}CD16^{-/low} des cellules NK.

NKG2D (KLR-K1 ; CD314) est le membre le plus atypique de la famille NKG2/CD94. Il ne nécessite pas la présence de CD94 pour son expression sur la surface, mais il se sert de DAP-10 comme un partenaire de signalisation (Wu et al. 1999 ; Burgess et al. 2008). Le DAP-10 porte un motif YxxM dans sa queue cytoplasmique. Lors de la phosphorylation de ses résidus de tyrosines, ce motif recrute la sous-unité régulatrice (le p85) de la PI-3K et le GRB-2 (« Growth factor receptor-bound protein-2 »). Ce motif est aussi présent dans la queue cytoplasmique de CD28 (une molécule co-stimulatrice des cellules T). Par ailleurs, NKG2D ne se lie pas à HLA-E. Les ligands de NKG2D sont des molécules qui sont induites par le stress (par exemple sur les cellules qui ont subi des dommages d'ADN, des transformations malignes, et des infections). Les cellules normales du corps n'expriment pas ces ligands. Ces protéines comportent MIC-A (« CMH class I heavy chain-like-A), MIC-B et ULBP 1-6 (« UL-16 Binding Proteins 1-6). L'UL-16 est une protéine codée par le gène UL-16 (Unique Long-16) du HCMV (« Human Cytomegalovirus »). Les gènes MICA/B sont extrêmement polymorphiques et sont localisés sur le chromosome humain 6q25 à l'extérieur du locus de CMH (Bauer et al. 1999 ; Obeidy & Sharland 2009). Les ligands du NKG2D ne se lient pas à un peptide et ne s'associent pas avec β -2 microglobuline. Les cellules NK reconnaissent les cellules 'stressées' à travers les interactions NKG2D-MICA/B/ULBP. Les cellules cancéreuses peuvent produire des formes solubles des protéines MIC pour échapper à la mort qui est médié par les cellules NK via le NKG2D. L'IL-12 et l'IL-15 augmentent l'expression de NKG2D sur les cellules NK, tandis que TGF- β et l'IL-10 induit sa diminution. Également, ce dernier est exprimé sur les cellules TCD8⁺ activées où il agit comme une molécule co-stimulatrice. (Park et al. 2011).

Tableau 3. Les récepteurs NKG2/CD94 et ILT exprimés par les cellules NK

Récepteur	Ligand	Partenaire de signalisation	Fonction
NKG2A/B (CD159a)	HLA-E	ITIMs dans la queue cytoplasmique	-
NKG2C (CD159e)	HLA-E	DAP-12	+
NKG2E/H-CD94	HLA-E	DAP-12	+
NKG2F-CD94	HLA-E	ITIMs dans la queue cytoplasmique	-
NKG2D (KLR-K1)	SIP	DAP-10	+
ILT2 (CD85j)	HLA	ITIMs dans la queue cytoplasmique	-
ILT4 (CD85d)	HLA	ITIMs dans la queue cytoplasmique	-

SIP : Les protéines induites par le stress (*Stress-induced proteins*). Plus (+) et moins (-) indiquent l'activation et l'inhibition, respectivement.

3. ILT : Immunoglobulin-like Transcripts (CD85) : On leur donne aussi le nom de "Leukocyte Ig-like Receptor ou LILR" et "Macrophage Ig-like Receptors "(MIR) (Brown et al. 2004). Il existe 13 membres dans cette famille. Ils sont soit des récepteurs inhibiteurs ou activateurs. Ils sont surtout exprimés à la surface cellulaires des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques, et certaines sous-populations des cellules T et B. seulement un membre de cette famille, ILT-2 (CD85j), est un récepteur inhibiteur, qui est exprimé sur les sous populations des cellules NK (Brown et al. 2004). La famille des récepteurs ILT se lie aux molécules des deux CMH class I classique et non classique. Toutefois, il existe une compétition entre l'ILT-2 et les cellules TCD8+ concernant la liaison avec les antigènes du CMH class I, mais ce dernier se lie préférentiellement à HLA-G. Les gènes d'ILTs sont localisés sur le chromosome 19, à proximité des gènes KIR. A noter q'une proteine qui est codée par le gène UL-18 du HCMV "HCMV-encoded protein UL-18 " agit également comme un ligand pour l'ILT-2 (Prod'homme et al. 2007)

4. NCR (« Natural Cytotoxicity Receptors »): Cette famille comporte 4 membres : NKp46 (NCR1 ou CD335), NKp44 (NCR2 ou CD336), NKp80, et NKp30 (NCR3 ou CD337) (tableau 4 ; révisé dans Pazina et al. 2017). Ils ont tous des glycoprotéines transmembranaires du type 1 comme une molécule d'IgG (voir figure 11 pour les structures et les partenaires de signalisation des NCR). Les NCRs sont exprimés à la fois sur toutes les cellules NK au repos et activées, à l'exception de NKp44, qui est exprimés seulement sur les cellules NK activées par des cytokines. En outre, NKp46 est exprimé sur des cellules autre que les NK, comme les Cellules Lymphoïdes Innées du type-1, et du type 3 (CLI-1 et CLI-3) et sur une sous population mineur des cellules T. Les liaisons des NRC avec leurs ligands déclenchent les fonctions des cellules NK. NKP46 et NKP30 se lient aux protéines liant l'acide sialique telles que l'hémagglutinine du virus Influenza. Cependant, les NCR se lient également à certains ligands (e.g. certaines molécules nucléaires qui sont exprimés à la surface des cellules cancéreuses) et inhibent les cellules NK (tableau 4 pour les ligands). Tous les NCR expriment un ou plus "splice variants" qui peuvent transmettre des signaux d'inhibition aux cellules NK.

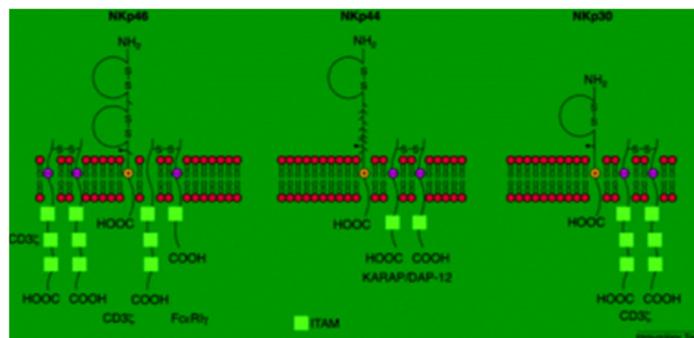


Figure 11. NCR Humaine. De Moretta et al 2000

Tableau 4. Les ligands et les fonctions des récepteurs NCR

NCR	Ligand	Fonction
NKp46	HA d'Influenza et du Vaccinia virus	+
	EMP-1 du Plasmodium falciparum	+
	HS-GAGs	+ / régulation
	Vimentin	+
	Properdin (le fragment P de complément)	+
NKp44	HA d'Influenza et du Sendai virus	+
	La protéine d'enveloppe du WNV et du Dengue virus	+
	L'antigène nucléaire de la cellule en prolifération	-
	BCG	?
	HS-GAGs	+
NKp30	NKp44L	+
	HA du Vaccinia virus	+
	P65 (La protéine de tégument) du HCMV	+
	EMP-1 du Plasmodium falciparum	+
	HS-GAGs	+ / régulation
	B7-H6	+
	BAT-3/BAG-6	+

B7-H6: B7 homologue-6, BAG-6: « Bcl2-associated anthogene-6 », BAT-3: « HLA-B-associated Transcripts-3 », BCG: Bacillus Calmette Guérin, EMP: « Erythrocyte Membrane Protein », HA: Haemagglutinin, HCMV: Human Cytomegalovirus, HS-GAGs: Heparan Sulfate Glycosaminoglycans; NKp44L: NKp44 ligand induite par le VIH chez les cellules TCD4⁺ et représente une « a splice variant Mixed Lineage Leukemia-5 », WNV: West Nile Virus. Plus (+) et moins (-) indiquent l'activation et l'inhibition, respectivement. (Tiré et modifié de Pazina et al. 2017).

5. SRR (Les récepteurs reliés au SLAM ou « SLAM-related receptors »). Le SLAM (« Signalling Lymphocyte Activation Molecule ») (CD150) est exprimé sur les cellules T. La traduction de leurs signaux intracellulaires est accompli via une protéine adaptatrice appelée SLAP (« SLAM-associated Protein »). Il existe une famille des SRR, qui sont des molécules « Ig-like ». Elles sont exprimées sur toutes les cellules hématopoïétiques (van Driel et al. 2016 ; Wu & Veillette 2016). Ceux qui sont exprimés sur les cellules NK comprennent CD48, 2B4 (CD244), NTB-A (« Non T, Non B cell Antigen », CD352), et CRACC (« CD2-like Receptor

Activating Cytotoxic Cells », CD139). Ils agissent comme des récepteurs auto-ligands à l'exception de CD48 et 2B4, qui interagissent les uns avec les autres (tableau 5). Certains de ces récepteurs agissent comme PRR (« pattern recognition receptors ») et reconnaissent les antigènes microbiens tels que l'agglutinine du virus de l'Influenza. Alors, les SRR utilisent SAP ou des molécules apparentées comme EAT-2 (« Ewing's sarcoma-associated transcript-2 ») pour la traduction de leurs signaux intracellulaires (tableau 5). Les gènes qui encodent les SRR sont localisés sur le chromosome humain 1q22. Tous transmettent un signal d'activation aux cellules NK. Mais, quand SAP est mutée et non fonctionnelle, ou elle devient inadéquate, 2B4 agit comme un récepteur inhibiteur. Dans ce cas-là son motif ITSM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif ») qui est présent dans la queue cytoplasmique peut recruter les phosphatases (SHP-1 and 2) et inhiber les cellules NK (van Driel et al. 2016 ; Wu & Veillette 2016). Le gène de SAP est localisé sur le chromosome X. La présence d'une mutation dans SAP cause la maladie XLP (« X-linked Lymphoproliferative disease ») chez les individus infectés par le virus d'Epstein-Barr (EBV ou « Epstein-Barr virus »).

Tableau 5. Les SRR exprimés sur les cellules NK.

Récepteur	Ligand	Adaptateur de signalisation	Fonction
2B4 (CD244)	CD48, HA	SAP	+ et -
NTB-A (CD352)	Interaction homotypique HA, BA	SAP ou ETA-2	+
CD84	Interaction homotypique, BA	?	+
CRACC (CD319)	Interaction homotypique	EAT-2	+
CD48	CD2, 2B4, BA	None	Li gand

BA: Antigènes bactériens, CRACC: "CD2-related molecule activating cytotoxic cells", EAT-2: "Ewing's sarcoma-associated transcript-2", HA: Haemagglutinin, "NTB-A: "Non T and Non B cell antigen", SAP: "SLAM-associated protein". Les signaux plus (+), moins(-) et point

d'interogation(?) indiquent, respectivement, l'activation ou costimulation, inhibition et inconnu. (Compilé à partir de van Driel et al. 2016)

6. NKR-P1. Plusieurs allèles de ce gène sont présents chez les souris. Mais il y a seulement un allèle chez l'humain. Il encode NKR-P1A (Klr1/CD161) qui est exprimé sur les cellules NK humaines et certains sous-populations des cellules T CD4⁺, T CD8⁺ TCR αβ⁺, les cellules NKT, et les cellules T TCRγδ⁺. Il se lie aux LLT-1 (« lectin-like transcript-1 ») qui est exprimé sur certain cellules hématopoïétiques activées incluant les cellules NK, les cellules T, et les cellules présentatrices d'antigènes (APC ; « Antigen presenting cells ») (Kirkham et al. 2014). Certaines cellules tumorales l'expriment également. La tolérance des cellules NK est induite par l'interaction entre NKR-P1 et LLT-1. Pour échapper aux réponses des cellules NK, les cellules cancéreuses (e.g. cancer de la prostate et glioblastome) expriment LLT-1(Kirkham et al. 2014). Tout dépendant des souches des souris, elles expriment des allèles de a à h du **NKR-P1**. Le NKR-P1c a été identifié en premier chez les souris, par l'intermédiaire d'un anticorps monoclonal NKP-1, tout en lui **accordant** le même nom. De point de vue structural, NKR-P1 est une molécule "C-type, lectin-like". En plus, deux homologues activateurs du NKR-P1, NKp80 et NKp66, ont également été rapportés chez les humains (Kirkham et al. 2014).

7. CD160 (BY55) : On l'a surnommé BY55, puisque il a été identifié par un anticorps monoclonal, qui possède le même nom. C'est une molécule semblable à l'immunoglobuline et ancrée à la membrane cytoplasmique par un GPI (« glycosylphosphatidylinositol »). Elle est exprimée sur la sous population des cellules NK (CD56^{bas}), sur les cellules T TCR γδ-positive et sur des sous populations des lymphocytes TCD8⁺. Elle se lie avec une forte affinité aux HVEM (Herpesvirus entry modulator ») (CD270/TNFRSF14), HLA-G et HLA-C, et avec une faible affinité à d'autres molécules de HLA (Iannello et al. 2008 ; Tu et al. 2015). Les cellules NK et les CTL qui sont positives pour CD160 s'accumulent habituellement dans des conditions inflammatoires. L'activation des cellules NK via CD160 mène à une sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, dont IFN-γ, TNF- α et IL-6.

8. LAIR-1 (« Leukocyte-associated Immunoglobulin-like Receptor-1 ») (CD305) et LAIR-2 (CD306) : Ce sont des récepteurs inhibiteurs qui sont exprimés sur les cellules NK,

les monocytes, les cellules T, les cellules B, les neutrophiles et les thymocytes immatures. Ils se lient aux collagènes et C1q qui est la première composante de la cascade du complément (Son et al. 2016). Les cellules NK sont exposées aux collagènes lors leur extravasation dans les tissus.

9. SIGLECs (« Sialic acid-binding Ig-like lectins ») : C'est une famille «Ig-like lectins » qui se lient certains sialoglycanes exprimés à la surface des cellules cibles. Deux membres de cette famille, le SIGLEC-7 et le SIGLEC-9, sont exprimés à la surface des cellules NK. Le premier se trouve sur toutes les sous- populations des cellules NK, tandis que le deuxième est exprimé seulement à la surface d'une sous-population des cellules représentée par un CD56^{dim}. L'expression des sialoglycoprotéines est plus élevée dans les cellules cancéreuses pour échapper à la réponse des cellules NK (Fraschilla & Pillai 2017).

10. KLRG-1 (« Killer cell lectin-like receptor G »). (KLRG)-1 est une lectine du type II et type C. C'est un récepteur inhibiteur. Il est également connu comme « Mast cell function-associated antigen ou MAFA » (Iannello et al. 2008). Il se lie à des molécules d'adhésions dépendantes du Ca⁺⁺ (cadherins), et qui forment des jonctions adhérentes pour relier ensemble les cellules dans les tissus. KLRG1 est exprimé sur des cellules NK et T différenciées en phase terminale. Il existe une corrélation entre son expression sur les lymphocytes avec la diminution de la prolifération, la réduction de la capacité de sécréter l'IFN- γ et une susceptibilité plus élevée à l'apoptose. Il est intéressant de noter que la liaison croisée de KLRG1 par les anticorps spécifiques induisent l'activation d'AMPK, un senseur d'énergie dans les cellules, qui s'implique dans le vieillissement (Müller-Durovic et al. 2016).

11. DNAM-1 (CD226) : La molécule « Dynax accessory molecule » (DNAM)-1 est une glycoprotéine transmembranaire ressemble à une immunoglobuline. Elle se lie au nectine-2 (CD112) et d'autres molécules semblables au nectine (e.g. CD155, qui est connu comme un récepteur de Poliovirus ou « nectin-like 5 » (Iannello et al. 2008). DNAM-1 transmet un signal costimulateur aux cellules NK et promouvoit également la migration transendothéliale, l'adhésion et la diapédèse. Deux molécules apparentées au DNAM-1, TACTILE (« T cell-activated increased late expression ; CD96 ») et TIGIT (« T-cell Ig and ITIM domain of the deleted KIR2DS4* ») lient aux nectines et à des molécules semblables aux nectines,

inhibent les cellules NK (et T) (Dougall et al. 2017). Leurs ligands sont exprimés sur les cellules T activées, les cellules dendritiques, les cellules épithéliales et les cellules cancéreuses.

12. CD16 (Fc γ RIIIa) : C'est un récepteur qui a une faible affinité pour la région Fc (« Fragment cristallisable ») d'IgG. Tel qu'abordé précédemment, les cellules NK sont médiateur de l'ADCC via des anticorps et tuent les cellules qui expriment les antigènes spécifiques à ces anticorps (Figure 12). CD16 est exprimé sur les cellules NK, les monocytes et les macrophages. CD32 est un autre Fc γ R activateur qui est exprimé également à la surface des cellules NK (Brandsma et al. 2015).

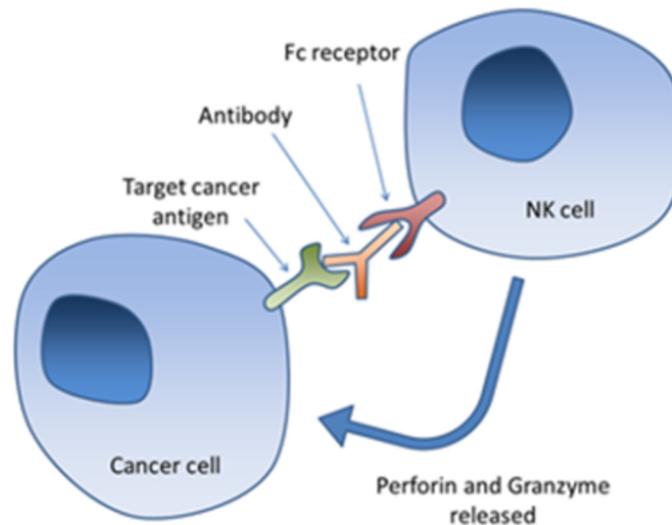


Figure 12. L'image illustre comment une cellule NK tue une cellule cible via un anticorps. Téléchargé de <https://www.google.ca/search?tbm=isch&q=ADCC&chips> le 26 juillet 2017.

13. FcRL : (« Fc receptor-like »). Ces sont des glycoprotéines transmembranaires semblables aux immunoglobulines. Les membres de cette famille sont exprimés sur les

cellules B (Capone et al. 2016). Toutefois, le FcRL3 et FcRL6 sont aussi exprimés sur les cellules NK et les lymphocytes T CD8+. Les ligands pour FcRL-3 demeurent inconnus, bien que FcRL-6 se lie au HLA-DR et les IgM et IgG intracellulaires (Li et al. 2014). La queue cytoplasmique de FcRL6 comporte un ITIM et agit comme un récepteur inhibiteur. Tandis que la queue cytoplasmique de FcRL3 comporte un ITIM et un ITAM, et il peut activer ou inhiber les cellules NK.

14. Intégrines : Les intégrines attachent les protéines du cytosquelette aux protéines des matrices extracellulaires. Elles sont importantes pour les interactions des cellules NK avec d'autres cellules et avec des protéines de la matrice. Elles jouent un rôle dans la migration des cellules (ceci inclue les cellules NK) vers les tissus. Chaque intégrine est un hétérodimère transmembranaire formé d'une chaîne α et β . De ces intégrines, LFA-1 (CD11a/CD18 ou α L β 2) se lie à ICAM (« Intercellular cell adhesion molecule ») 1- et ceci est important pour que les cellules NK se lient avec les cellules cibles. CD103 (α E β 7) est exprimée sur les cellules NK et d'autres cellules immunitaires intestinales. Elle se lie aux E-cadhérines et sert à retenir les lymphocytes dans l'intestin (Harburger & Calderwood 2009). « Very Late Antigen » (VLA)-4 (α 4 β 1) se lie à la fibronectine et au « Mucosal addressin cell adhesion molecule » (MadCAM) et fonctionne comme un récepteur d'hébergement intestinale. VLA-5 (α 5 β 1 or CD49e/CD29) se lie au collagène. Grâce aux interactions avec la matrice extracellulaire, VLA-5 favorise la survie et la prolifération des cellules et aide à la diapédèse des cellules NK et d'autres cellules immunitaires (Harburger & Calderwood 2009 ; tableau 6).

15. CD57 : Il représente un épitope du glucoside (3-sulfate d'acide glucuronique) identifié par des anticorps monoclonaux de souris HNK-1 et Leu-7 sur des molécules encore non identifiées. le CD57 est exprimé sur des sous-populations des cellules NK et T après leur stimulation chronique. Il représente un marqueur de la différenciation terminale sur ces types de cellules. Les cellules NK et T exprimant CD57 accroissent chez les patients atteints de cancer ou d'infections virales chroniques (Nielsen et al. 2013).

16. CD69 : C'est un antigène, qui est exprimé sur les lymphocytes, lors de leur activation. Donc, il peut détecter les lymphocytes récemment activés. Il se lie au récepteur de type 1 pour shingosine-1 phosphate (S1PR1) et empêche les lymphocytes induit par S1P de quitter le thymus, les patches de Peyer et les ganglions lymphatiques. Les antigènes microbiens

intestinaux induisent son expression sur les lymphocytes du lamina propria via la production de l'IFN-I par les cellules dendritiques (Radulovic & Niess 2015). En plus, il induit aussi la tolérance mucoale par des mécanismes inconnus.

Le tableau 6 liste différents récepteurs de cellules NK, leurs ligands, leur expression sur les cellules NK et leurs fonctions.

Tableau 6. Différents récepteurs et corécepteurs de cellules NK

Récepteur	Ligand	Expression	Fonction
CD2 (LFA-2)	CD58 (LFA-3), CD48 (faible affinité)	Tous NK	Adhésion, Costimulation
CD16 (FcγRIIIa)	Fc d'IgG1 et d'IgG3	Sous ensemble	ADCC
CD32 (FcγRIIc)	Fc d'IgG1 et d'IgG3	Tous NK	Costimulation
CD56 (NCAM)	CD56	Sous ensemble	Adhésion homotypique
CD57	?	Sous ensemble	Marqueur de différentiation terminale
LFA-1 (αLβ1)	CD 54 (ICAM-1-5)	Tous NK	Adhésion, Costimulation
CD8	CMH class I	Sous ensemble	Adhésion, Costimulation
CD69	S1PR1 et ?	NK activées	Arrêt de migration vers l'intestin
CD59	C8, C9	Tous NK	Protégé cellules de MAC
CD27	CD70	Sous ensemble	Costimulation
CD11b (Mac-1; αM)	αMβ2 (CR3) se lie au iC3B, C4B	Sous ensemble	Costimulation
CD28	B7	NK de fœtus	Costimulation
CD103 (αEβ7)	E- cadhérine	Sous ensemble	Rétention à l'intestine
VLA-4 (α4β1) (CD49d/CD29)	MadCAM, Fibronectine, VCAM	NK activées	Hébergement dans l'intestine
VLA-5 (α5β1) (CD49e/CD29)	Collagène	NK activées	Interaction avec ECM
NKG2D	SIP	Tous NK	Costimulation
CEACAM-1 (CD66a)	CEA	Tous NK	Costimulation
NKp80	AICL	Tous NK	Costimulation

AICL: « Activation-induced c-type lectin », C8: La complément protéine 8, CEA: Antigène chorioembryonique, CEACAM: « CEA-Cell Adhesion Molecule », FcγR: Récepteur pour la région Fc d'IgG, iC3B: Un composant de complément, C4B: Un composant de complément, ECM: « Extracellular matrix », ICAM: « Intercellular cell adhesion molecule », LFA: « Leukocyte function antigen », MAC: « Membrane attack complex », Mac-1:

« Macrophage antigen-1 », MadCAM: « Mucosal addressin cell adhesion molecule », S1PR1: « Type 1 receptor for sphingosine-1 phosphate », VCAM: « Vascular cell adhesion molecule », VLA: « Very late antigen ».

"KILLER-CELL IMMUNOGLOBULIN-LIKE RECEPTORS"; CD158

Caractéristiques des "*Killer-Cell Immunoglobuline-Like Receptors*" (KIR)

Structurellement, les KIRs appartiennent à la superfamille des molécules semblables à l'immunoglobuline (« Immunoglobulin Super Family ; IgSF »). Elles sont des glycoprotéines membranaires intégrées de type I et sont souvent exprimées sous forme de monomères à la surface des cellules NK (Lanier 1998 ; Khakoo & Carrington 2006). Le génome humain contient quinze gènes KIR fonctionnels et deux pseudo-gènes situés sur le chromosome 19q13.4 en tandem de la tête jusqu' à la queue dans une courte région (150 kb) d'ADN. La région qui héberge les gènes KIR est appelée Complexe des récepteurs des leucocytes (« Leukocyte Receptor Complex ; LRC »). La figure 13 montre la structure d'un gène typique de KIR et d'un récepteur encodé. Chaque KIR possède une région extracellulaire pour se lier au son ligand, une tige, une région transmembranaire, et une queue cytoplasmique. La région extracellulaire comprend deux ou trois domaines d'immunoglobuline. La queue cytoplasmique peut être courte ou longue. Chaque KIR avec une queue longue comporte deux ITIM (« Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs ») dans sa queue cytoplasmique et agit comme un récepteur inhibiteur. Lors de sa liaison avec son ligand, les résidus de tyrosines présentes dans la queue deviennent phosphorylés et recrutent SHP-1 (« SH-2 domain-containing phosphatase-1) et -2. Les phosphatases déphosphorylent plusieurs molécules impliquées dans l'activation des cellules NK (Watzl & Long 2010). Par conséquent, les cellules NK sont inhibées et ne déclenchent pas leur fonction effectrice. D'autres part, les récepteurs KIR avec une queue cytoplasmique courte possèdent un acide aminé chargé (lysine) dans leur région transmembranaire et s'associent de manière non covalente avec une protéine adaptatrice appelée DAP-12. La protéine adaptatrice possède des ITAM (« Immunotyrosine-based Activating Motifs ») dans sa queue cytoplasmique. Lors de la liaison à ses ligands, les résidus de tyrosine dans les ITAM deviennent phosphorylés et recrutent plusieurs kinases, qui phosphorylent plusieurs molécules, telles que VAV-1, et activent les cellules NK (MacFarlane & Campbell 2006).

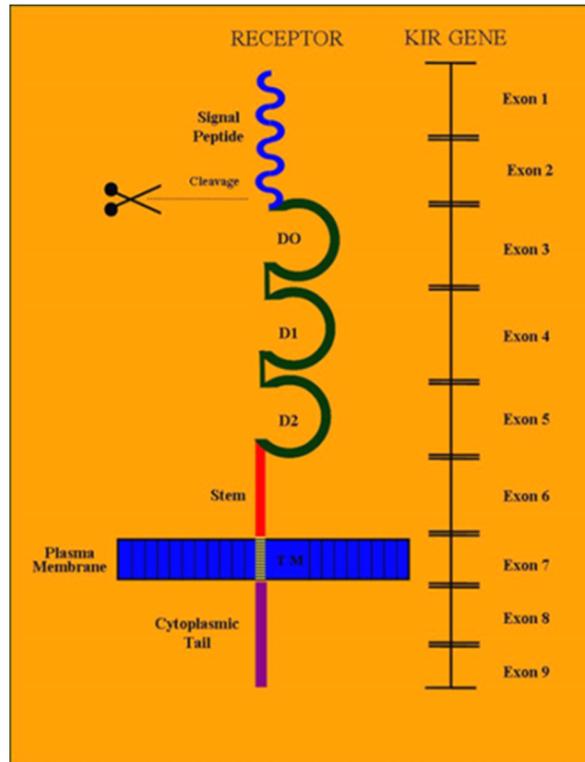


Figure 13. Structure d'un gène KIR typique et le récepteur encodé. Un gène KIR typique est formé de 9 exons qui encodent pour une protéine possédant un peptide signale (clivé dans le réticulum endoplasmique, une région extracellulaire comprenant des domaines semblables aux Immunoglobulines, une tige, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique. (D'Iannello et al. 2000).

La nomenclature des KIR

Les KIRs ainsi que les gènes qui les encodent ont été nommés en fonction du nombre des domaines Ig (2D pour 2 domaines et 3D pour 3 domaines) dans leur région extracellulaire et la longueur de sa queue cytoplasmique (S pour « short » ou L pour « long ») avec KIR comme un préfixe (Middleton & Gonzalez 2010 ; Voir Figure 14). Par exemple, KIR2DL1 signifie un récepteur (ainsi que son gène codant) ayant deux domaines extracellulaires et une longue queue cytoplasmique. Le nombre final désigne des gènes individuels de KIR dans la famille. Les KIRs inhibiteurs décrits sont KIR2DL1, KIR2DL2/3 (variants alléliques), KIR2DL5a, KIR2DL5b, KIR3DL1 et KIR3DL2, et les KIR activateurs sont KIR2DS1-KIR2DS5, KIR3DS1 (un variant allélique de KIR3DL1). KIR2DL4 est un récepteur exceptionnel. Il a une longue queue cytoplasmique, cependant, elle porte un ITIM atypique.

La queue renferme également une arginine (un acide aminé chargé) et forme des liaisons non covalentes avec un homodimère de la chaîne γ de Fc ϵ R. Ce homodimère agit comme un partenaire de signalisation. Lors de la liaison à son ligand, le récepteur déclenche la relâche des cytokines (p. ex. IFN- γ) des cellules NK, mais non pas leur cytotoxicité (Remi et al. 2001 ; Remi 2010 ; Voir aussi ci-dessous). Le tableau 7 représente les KIR, leurs partenaires de signalisation et leurs ligands.

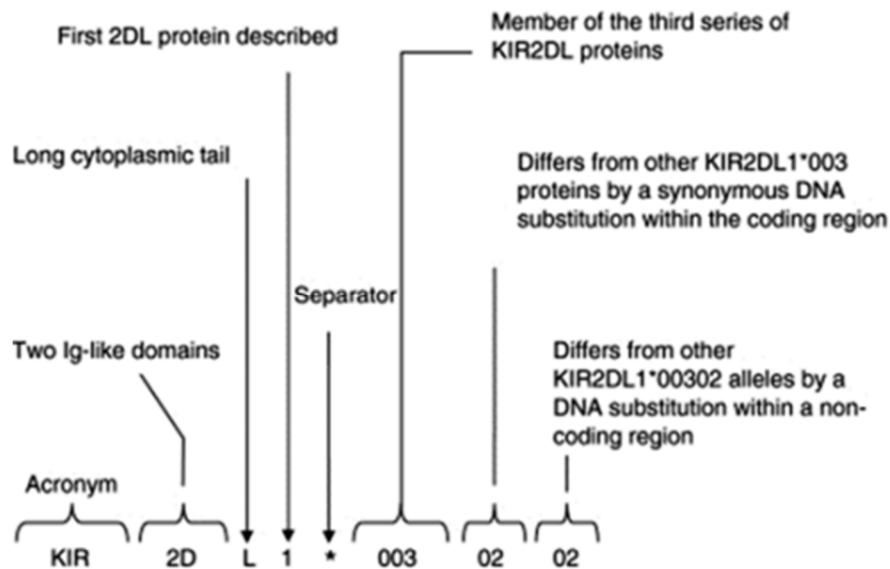


Figure 14. Nomenclature des KIR. Le nom de chaque gène est précédé du préfixe KIR qui est suivi d'un nombre des domaines (2D ou 3D), la longueur de la queue cytoplasmique (L pour long ou S pour court) et un astérisque (séparateur). Les trois premiers chiffres après le séparateur sont utilisés pour indiquer les allèles qui ont des différences dans leurs séquences codantes (003 dans ce cas). Les deux chiffres suivants distinguent les allèles qui diffèrent par des différences synonymes (non codantes) dans leurs séquences codantes (02 ici). Les deux derniers chiffres sont utilisés pour différencier les allèles qui diffèrent par substitution dans les régions non-codantes du gène (c.-à-d. introns et régions promotrices). (De Middleton & Gonzalez 2010)

Tableau 7. KIR et leurs partenaires de signalisation et Ligands chez l'homme

NOM	ALIAS	PARTENAIRE DE SIGNALISATION	LIGAND
KIR2DL1 (CD158a)	p58.1, NKAT-1	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-C2
KIR2DL2/3 (CD158b1/2)	p58.2	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-C1
KIR2DL4 (CD158d)	KIR103	FcεR1γ chain	HLA-G, HS
KIR2DL5a (CD158f1)	-	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-C?
KIR2DL5b (CD158f2)	-	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-C?
KIR3DL1 (CD158e)	p70; NKB1	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-Bw4
KIR3DL2 (CD158k)	p140, NKAT-4	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	HLA-A3, A11, CpG
KIR3DL3 (CD158z)	KIR-44	ITIMs recrutent SHP1, SHP2	?
KIR2DS1 (CD158h)	p50.1	DAP-12	HLA-C2, ?
KIR2DS2 (CD158j)	p50.2	DAP-12	HLA-A11, HLA-C1, ?
KIR2DS3 (CD158?)		DAP-12	?
KIR2DS4 (CD158i)	p50.4	DAP-12	HLA-C1/C2, -1102
KIR2DS5 (CD158g)		DAP-12	?
KIR3DS1 (CD158e2)	p70	DAP-12	HLA-F

DAP: "Dynax accessory protein", HS: Heparan sulfate, ITIM: "Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif", SHP: "SH2-domain containing phosphatase". Modifié d'Iannello et al. 2010.

Les Ligands des KIR

Les KIR avec deux domaines-Ig se lient aux molécules de HLA-C, qui peuvent être divisées en deux groupes : I et II. Cette division est basée sur le dimorphisme du résidu 80 présent dans leurs séquences protéiques. Les molécules HLA-C du groupe I (HLA-C1) qui comprennent HLA-Cw1, 3, 7, 8, 13 et 14, et *cetera* renferment une asparagine à cette position. Les molécules du groupe II (HLA-C2) qui comprennent HLA-Cw2, 4, 5, 6, 17 et 18 *et cetera* présentent un résidu arginine à la position 80. KIR2DL2 et ses allotypes reconnaissent les HLA-C du groupe II (HLA-C2), cependant KIR2DL2/KIR2DL3 reconnaît les antigènes de

HLA-C du groupe I (Figure 15 ; Tableau 7). Ainsi, les KIR à deux domaines (KIR2DL1 et KIR2DL2 / 3) peuvent reconnaître et se lier à tous les antigènes humains connus de HLA-C (Cw1-18) (Winter et al. 1997 ; Valés-Gómez et al. 1998 ; Parham, 2005). Parmi les KIR inhibiteurs à deux domaines, KIR2DL1 se lie à ses Ligands HLA-C2 avec la plus forte affinité. D'une autre côté, la liaison de KIR2DL3 à ses Ligands est la plus faible. Par contre, une affinité moyenne lie le KIR2DL2 à ses Ligands de HLA-C1. Ces variations présentes dans les affinités de liaison des KIR ont des répercussions sur les fonctions des cellules NK. Par exemple, chez une personne qui est homozygote pour HLA-C2 et qui cohérite KIR2DL3, les cellules NK auront un plus faible seuil d'activation par rapport à une personne qui est homozygote pour HLA-C2 et cohérite KIR2DL1 (Parham 2005).

Le KIR3DL1 (un KIR contenant trois domaines d'Ig) se lie aux molécules de HLA-B avec la présence d'une isoleucine à la position 80. Il se lie aux molécules de HLA-Bw4 avec une thréonine à sa position 80, mais avec une affinité beaucoup plus faible. Les allotypes de HLA-B ont deux sérotypes mutuellement exclusifs : Bw4 ou Bw6. Comme les molécules de HLA-C, les molécules de HLA-Bw4 comportent également un dimorphisme à la position 80 (soit la thréonine ou soit l'isoleucine) (Cella et al. 1994 ; Rojo et al. 1997 ; Saunders et al. 2015). Ainsi, le KIR3DL1 reconnaît tous les antigènes de HLA-Bw4. Jusqu'à présent, aucun KIR n'a pu créer une liaison avec HLA-Bw6 (Figure 15 ; Tableau 7). A noter : les différents allotypes de KIR3DL1 varient dans leur affinité pour leurs ligands (HLA-Bw4).

Comme mentionné ci-dessus, le KIR2DL4 est un récepteur activateur atypique qui est exprimé sur toutes les cellules NK. Il est exprimé dans les endosomes. Il se lie aux molécules de HLA-G solubles, qui sont des molécules de CMH de classe 1b non classiques. Les cellules NK pinocytose HLA-G solubles, qui se lie à KIR2DL4 dans les endosomes et déclenche la libération d'IFN- γ et d'autres médiateurs solubles à partir des cellules NK (revu par Rajagopalan 2010). Les trophoblastes de fœtus exprimant HLA-G induisent la sénescence via KIR2DL4 dans les cellules NK déciduales/ utérines. Le phénotype de sécrétion associé à la sénescence des cellules NK induit un remodelage vasculaire qui est requis pour la réussite de la grossesse (Rajagopalan 2014). Cependant, ces résultats ont été récemment contestés et les auteurs ont suggéré le sulfate d'héparane comme un ligand pour KIR2DL4 (Brusilovsky et al.

2013 ; Le Page et al. 2014). Alors, d'autres études sont nécessaires pour résoudre ces controverses.

Les KIR activateurs ayant une queue courte ont démontré une liaison à très faible affinité avec les Ligands HLA comparé a à leurs homologues inhibiteurs (Figure 15 ; Katz et al. 2001 ; Ghanned et al. 2014). On se rend de plus en plus compte que ces KIRs se lient à des ligands méconnus, qui sont exprimés sur les cellules malignes et celles infectées par des virus (Katz et al. 2004). Par exemple, des études épidémiologiques ont suggéré la liaison de KIR3DS1 avec HLA-Bw4 / Ile, mais les efforts pour démontrer l'exactitude de cette liaison avec ce Ligand n'a jamais été fructueuse. En fait, il a récemment été démontré que KIR3DS1 se lie aux conformations ouverts de HLA-F, qui est une molécule de CMH classe I non classique et lie le fer (Garcia-Beltran et al. 2016).

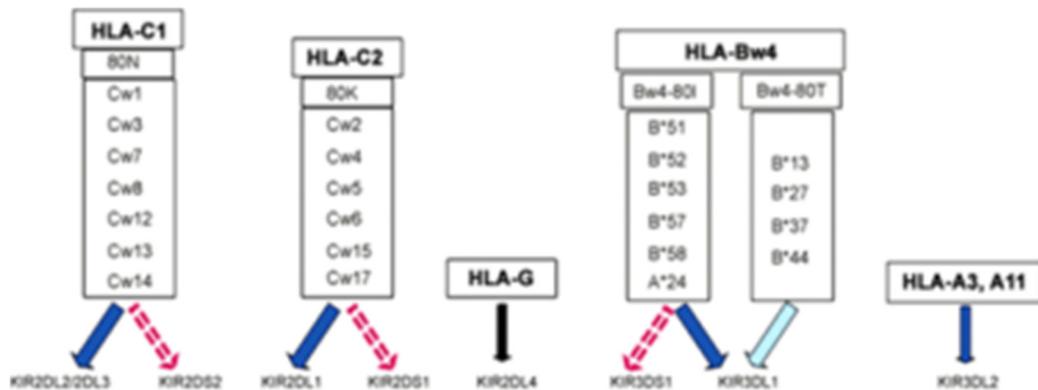


Figure 15. Les CMH class I comme ligands des KIRs. Les flèches bleues foncés indiquent les affinités les plus fortes entre les KIRs et leurs Ligands en comparaison avec les flèches bleues claires qui indiquent des affinités moins marquées entre les KIR et leurs ligands. Les flèches pointillées rouges indiquent les liaisons à très faible affinité. Il a récemment été démontré que KIR3DS1 peut se lier à conformations ouvertes de HLA-F (non montré ici). De Ghannad et al. 2014.

Les haplotypes des gènes KIR

Quant aux génotypes des KIRs, les humains sont fortement hétérogènes. En effet, il est plutôt rare que deux individus n'ayant aucun lien de parenté, détiennent de pareils génotypes KIR. Cette hétérogénéité des génotypes humains résulte de deux sources : les haplotypes des KIRs diffèrent dans leur contenu génétique et les gènes sont très polymorphiques (Hsu et al. 2002 ; Parham 2005 ; Iannello et al. 2008 ; Manser et al. 2015). Compte tenu de leur bagage génétique, deux haplotypes KIR, A et B, ont été décrits. L'haplotype du groupe A possède un seul gène activateur, le KIR2DS4. Cependant, ce gène a une délétion de 22 paires de bases dans son exon 5 et ne code pas pour un récepteur fonctionnel (Middleton et al. 2007). Alors aucun récepteur activateur fonctionnel n'appartient à ce haplotype. Sa composition est presque fixe, et contient sept gènes KIR inhibiteurs et deux pseudogènes (Figure 16). D'autre part, l'haplotype du groupe B est plus diversifiée et possède souvent un nombre varié des KIRs activateurs, mais fréquemment manque KIR2DS4. En outre, quatre gènes sont toujours présents dans les deux haplotypes. On les nomme « les gènes de cadre » et sont présents dans l'ordre, de la région télomérique jusqu'à l'extrémité centromérique : KIR3DL2, KIR2DL4, KIR3DP1 et KIR3DL2 (Figure 16).

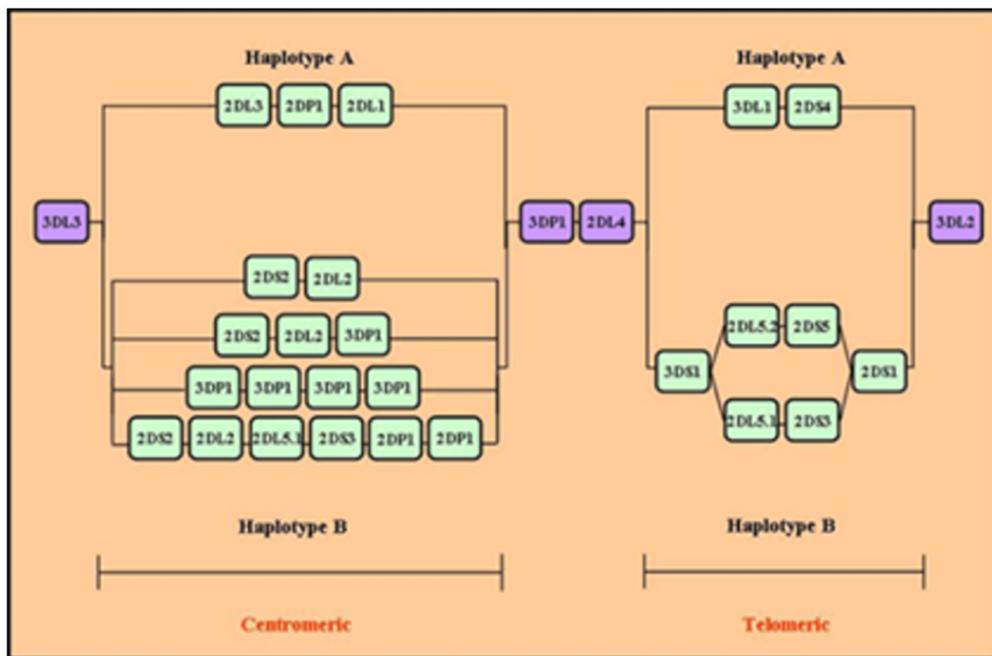


Figure 16. Les Haplotypes des KIRs. Les régions centromériques et télomériques utilisées par les haplotypes A et B des KIRs. À noter que les haplotypes B sont plus diversifiés et contiennent la plupart des gènes KIR activateurs. (D'Iannello et al. 2008).

Le polymorphisme des gènes KIR

La famille des gènes KIRs est multigénique et polymorphique. Le polymorphisme est plus prononcé chez les gènes inhibiteurs que chez les gènes activateurs. L'ampleur de leur polymorphisme s'approche de celle des gènes du CMH (Middleton & Gonzelez 2010). Certains variants alléliques sont si fréquentes qu'on leur donne le statut de gènes individuels. Par exemple KIR2DL2 et KIR2DL3 étaient considérés en tant que des loci indépendants. Cependant les analyses de la ségrégation alléliques ont démontré qu'ils sont des variants alléliques situés sur le même locus. C'est aussi le même principe pour KIR3DL1 et KIR3DS1. La figure 17 illustre le nombre de variants alléliques décrites dans chacun des gènes KIR. Par exemple, plus de 70 et 30 variantes alléliques pour KIR3DL1 et KIR3DS1 ont été documentés, respectivement. Il est intéressant de noter la présence des variantes alléliques dans chacun des gènes KIR, qui encode pour des récepteurs non fonctionnels (Middleton & Gonzelez 2010).

KIR Alleles								
Gene	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	2DS1	2DS2	2DS3
Alleles	48	30	55	52	48	16	22	15
Proteins	28	13	31	28	20	8	8	6
Nulls	1	0	1	0	0	0	0	1
Gene	2DS4	2DS5	3DL1	3DS1	3DL2	3DL3	2DP1	3DP1
Alleles	31	18	110	30	112	111	28	27
Proteins	14	12	66	17	82	57	0	0
Nulls	0	0	2	1	1	0	0	0

Figure 17. Le polymorphisme des gènes KIR. Cette figure illustre le nombre des variants alléliques pour chaque gène KIR, des protéines encodées et des allèles nuls qui encodent des protéines non-fonctionnelles. « Immuno Polymorphism Database (IPD)-KIR Database Statistics »; <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>. Téléchargé le juillet 12, 2017

Expression des gènes KIR

Il est intéressant de noter, que chez un individu, les gènes KIR ne sont pas exprimés sur toutes les cellules NK. Alors, pour un individu, chacun des gènes KIR est exprimé sur une sous-population des cellules NK. Les cellules NK en voie de développement acquièrent l'expression des gènes KIRs de façon aléatoire et stochastique. En partie, cela se produit en raison de la présence de multiples promoteurs bidirectionnels dans ces gènes et le type de promoteur détermine le patron d'expression du gène KIR (Cichocki et al. 2011 ; Li et al. 2016). En moyenne, chez un individu, une cellule NK exprime deux à trois gènes KIRs différents (Yawata et al. 2008). D'autre part, KIR2DL4 est dépourvu de tels promoteurs bidirectionnels et s'exprime sur toutes les cellules NK. Les cellules NK au sein d'un individu sont hétérogènes, et tout dépend de l'expression de différents gènes KIRs hérités chez cet individu. Les cellules NK en voie de développement acquièrent en premier l'expression des

récepteurs NKG2/CD94, qui empêchent l'auto-immunité. Cependant, au fur et à mesure qu'elles se développent les NKG2/CD94 sont remplacés par les KIRs. La figure 18 illustre l'expression des différents récepteurs sur les cellules NK chez un individu sain.

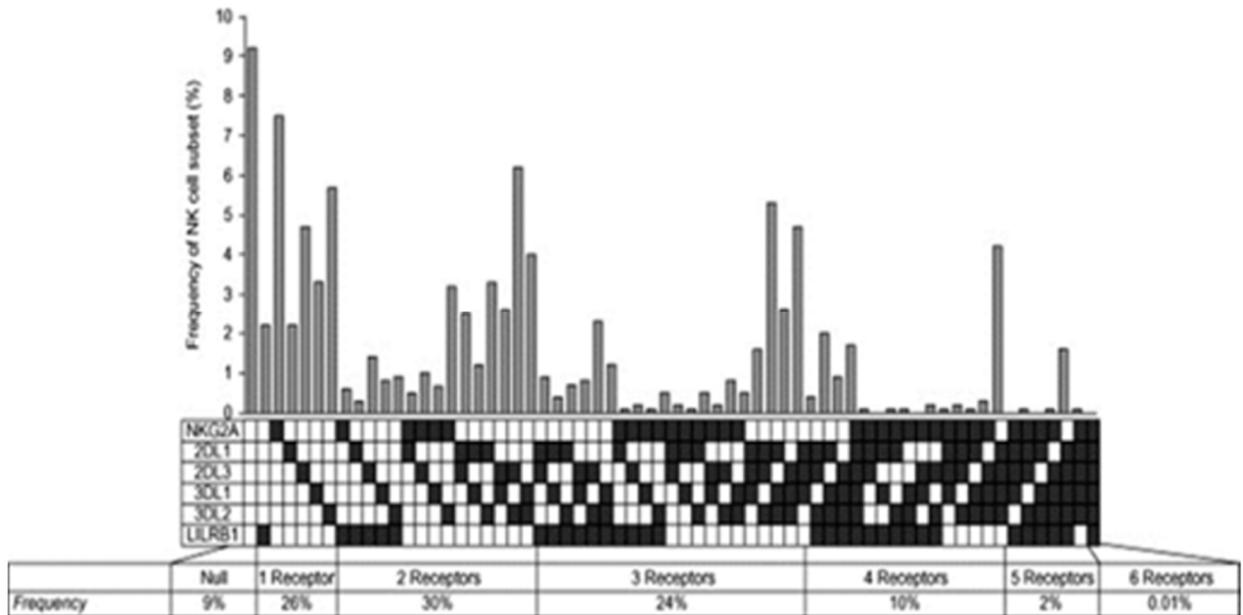


Figure 18. Expression variée des KIR, NKG2A et LILRB1 dans les cellules CD16+CD56dim NK. Les barres indiquent les fréquences des 64 NK sous-populations dans un individu sain. Les boîtes noires indiquent les récepteurs exprimés à chaque sous-population. Tiré de Yawata et al. 2008.

On pense que chaque cellule NK doit exprimer au moins un récepteur inhibiteur qui reconnaît une molécule du soi du CMH de class I (exprimée par des cellules saines chez un individu en bonne santé) pour éviter de tuer les cellules saines du corps. Cependant, tel qu'illustré dans la figure ci-dessus (Figure 18), environ 9 % des cellules NK n'expriment aucun récepteur inhibiteur. Toutefois, elles ne tuent pas leurs propres cellules. De telles cellules NK sont incapables de tuer n'importe quelle cellule cible. En fait, il a été proposé que l'expression d'un KIR inhibiteur est essentielle pour qu'une cellule NK acquière un potentiel cytolytique. Si une

cellule NK ne parvient pas à exprimer un KIR inhibiteur, elle n'acquière pas la capacité de tuer une cellule cible. Par conséquent, l'expression des KIR inhibiteurs 'licence' les cellules NK à tuer. Autrement dit, l'expression des KIR inhibiteurs (ou d'autres NKIR inhibiteurs) "éduque" les cellules NK à ne pas tuer les cellules autologues exprimant le CMH de classe I (voir Elliott & Yokoyama 2011). Néanmoins, si une cellule NK acquiert le potentiel de tuer, puis ensuite elle se trouve en face d'une cellule cible (une cellule cancéreuse ou «stressée») qui a perdu le ligand pour un récepteur inhibiteur, elle va pouvoir tuer la cellule cible.

Les génotypes de KIR/HLA et les fonctions des cellules NK

Les génotypes KIR / HLA d'un individu affectent les fonctions des cellules NK. L'expression de KIR et de leurs ligands spécifiques du CMH chez un individu détermine à quel point les cellules NK sont inhibées dans des conditions normales (en bonne santé). Comme illustré à la Figure 19, une personne qui est homozygote pour le groupe II HLA-C (C2) et KIR2DL1, ses cellules NK sont fortement inhibées (Parham 2005 ; Ghannad et al. 2014). Ses cellules NK ont un seuil relativement inférieur pour l'activation. De tels individus sont relativement protégés contre les maladies auto-immunes mais ils sont plus susceptibles aux infections sévères par des agents pathogènes. À l'autre bout du spectre, les individus qui sont homozygotes pour C1 et KIR2DL3 voient leurs cellules NK être relativement moins inhibées. De telles cellules NK auraient un seuil relativement supérieur pour l'activation et ces individus seraient en mesure de mieux résister aux agents pathogènes. Cependant, ils seraient plus sujets aux maladies auto-immunes. En plus des génotypes KIR / HLA, le polymorphisme dans les gènes KIRs pourrait également affecter les fonctions des cellules NK. Par exemple, si une variante allélique d'un gène KIR n'est pas exprimée sur la membrane cellulaire, ce gène perdra sa fonction inhibitrice ou activatrice.

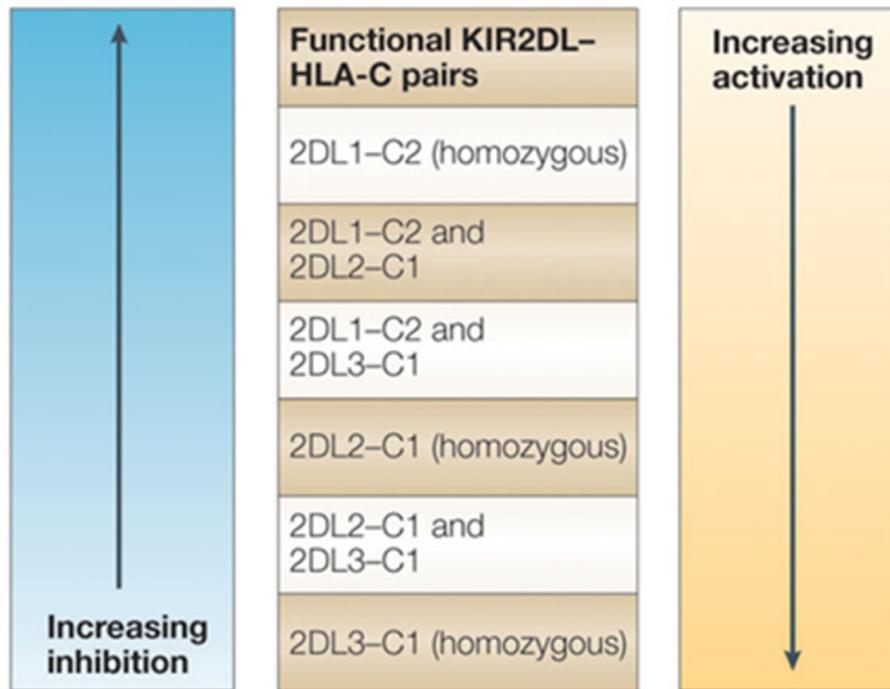


Figure 19. Paires des KIR-HLA et l'activation et inhibition des cellules NK. Cette figure est une représentation schématique des différents récepteurs KIR2DL et de leurs ligands spécifiques du HLA-C sur l'inhibition relative et seuil de l'activation des cellules NK chez les humains. Tiré de Parham 2005.

Les gènes KIR et les maladies chez l'homme

Les génotypes des KIR/HLA et le polymorphisme des gènes KIR sont impliqués dans les fonctions des cellules NK. Il n'est pas surprenant, de démontrer qu'ils affectent la susceptibilité / la résistance des humains à diverses maladies (Parham 2005 ; Lehuen et al. 2010 ; Ghannad et al. 2014). Ils modulent également l'évolution d'une maladie chez l'homme. En général, les individus possédant un nombre relativement plus élevé des gènes KIR activateurs et/ou des gènes inhibiteurs, qui codent pour les récepteurs ayant des affinités relativement plus faible pour leurs ligands spécifiques du CMH de classe I sont plus susceptibles de développer des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques comme le psoriasis, le diabète de type 1 (T1D), le lupus érythémateux systémique (« Systemic Lupus Erythematosu ; SLE »), l'arthrite et la sclérose en plaques (SEP) et *cetera*. Cependant, ils sont

relativement plus résistants au développement des cancers tels que la leucémie myéloïde aiguë (LMA) et le cancer du sein, et présentent une résistance relativement plus élevée à une infection virale comme le VIH, le VHC et la grippe et *cetera*. En outre, le contraire est également valable pour les personnes avec un nombre plus bas de KIR activateurs et / ou avec KIR inhibiteurs qui ont une plus forte affinité de liaison pour leurs ligands spécifiques du CMH (Parham 2005 ; Iannello et al. 2008 ; Lehuen et al. 2010 ; Rajalingam 2011 ; Jamil & Khakoo 2011 ; Ivarsson et al. 2014 ; Ghannad et al. 2014). Le polymorphisme et les génotypes des KIR/HLA ont également été impliqués dans les troubles de la reproduction tels que la pré-éclampsie, les fausses couches et la croissance intra-utérine retardée des nouveau-nés (Hiby et al. 2008 ; Chazara et al. 2011 ; Moffett et al. 2015).

Les cellules NK et les maladies autoimmunes

Les cellules NK non seulement tuent les cellules autologues infectées par du virus, les cellules cancéreuses et les cellules "stressées", mais elles régulent également les réponses immunitaires adaptatives par plusieurs mécanismes. Les interactions entre les KIRs, ainsi que d'autres récepteurs et les corécepteurs de cellules NK avec leurs ligands appropriés modulent ces réponses. Par conséquent, il n'est pas surprenant que les cellules NK jouent un rôle à deux tranchants dans le développement des maladies auto-immunes (Schleinitz et al. 2010 ; Poggi & Zocchi 2014 ; Popko et al. 2015). Divers mécanismes par lesquels les cellules NK modulent le développement et la pathogenèse de ces maladies sont cités ci-dessous. Elles peuvent promouvoir des maladies par

- 1) La production des cytokines pro-inflammatoires
- 2) Tuer des cellules autologues du corps lors d'une activation excessive et/ou lorsque des cellules autologues perdent/ diminuent l'expression des ligands pour les récepteurs inhibiteurs et/ou augmentent l'expression des ligands pour les récepteurs activateurs (rupture de l'auto-tolérance).
- 3) Promouvoir des réponses adaptatives auto-immunes en activant les DC et en promouvant la présentation des autoantigènes aux lymphocytes T et B.
- 4) Relâchement des auto-antigènes provenant des cellules autologues mortes

- 5) Tuer et éliminer les cellules autologues via ADCC en présence d'auto-anticorps
- 6) Production des cytokines et activation de cellules immunitaires
- 7) Tuer les cellules T régulatrices (Tregs)
- 8) Augmentation de la différenciation des monocytes en DC
- 9) Promouvoir la fibrose à travers la production des cytokines qui activent les fibroblastes

Elles peuvent également empêcher ces maladies par le biais des mécanismes ci-dessous :

1. Tuer et éliminer les cellules infectées par les agents pathogènes, et en éliminant les infections microbiennes et alors réduisant le mimétisme moléculaire
2. Tuer des cellules T et B auto-réactives
3. Tuer les DC et les empêcher de présenter les autoantigènes
4. Production des cytokines (e.g. IL-10 and TGF- β) qui inhibent les fonctions des lymphocytes T et B auto-réactives

Etudes des KIR dans des modèles murins

Il convient de noter que les souris n'ont aucun gène KIR fonctionnelle dans leur génome. Par conséquent, ils n'expriment aucun KIR sur leurs cellules NK et sur d'autres cellules immunitaires. Pour cette raison, l'impact de ces gènes sur différentes maladies humaines ne peut pas être étudié chez ces animaux. Cependant, il existe des souris transgéniques qui expriment certains gènes KIR humains et leurs gènes apparentés du CMH humain (Van Bergen et al. 2013). Ces souris transgéniques peuvent être utilisées pour de telles recherches. Il serait pertinent de mentionner ici que les souris expriment des homologues fonctionnels des gènes KIR appelés LY49 qui codent pour les récepteurs de même nom. Les LY49 sont structurellement différents des KIR car elles ne sont pas des molécules semblables à l'Ig. Il s'agit plutôt de glycoprotéines transmembranaires de type II, qui sont exprimées sur les cellules NK, qui se lient aux antigènes du CMH de classe I murin et qui peuvent être inhibitrices ou activatrices dans leurs fonctions (Rahim & Makrigiannis 2015). Ly49 sont

importants dans la compréhension du rôle des cellules NK dans les modèles murins de maladies humaines.

Les cellules NK et les gènes KIR dans la maladie de Crohn

La MC est une maladie inflammatoire chronique qui implique fortement les réponses immunitaires, mais seulement quelques études ont investigués les associations des gènes KIR et leurs ligands spécifiques avec cette maladie. La première étude à ce sujet a révélé des associations significatives entre KIR2DS2 et la CU chez les adultes caucasiens (Jones et al. 2006). Une autre étude a investigué ces associations dans une population caucasienne brésilienne comprenant 137 patients atteints de la MC et 250 individus sains, et sans aucun lien de parenté. La conclusion de cette étude était la présence d'un déséquilibre entre les gènes KIR activateurs et inhibiteurs et leurs ligands entraînant au moins en partie, la pathogenèse des MII. Cette notion a été supportée par Hollenbach et al. (2010) qui a rapporté que la susceptibilité à la maladie de Crohn est médiée par le KIR2DL2/KIR2DL3 et leurs ligands (HLA-C). Cependant, il n'a pas trouvé aucune association entre les gènes KIR activateurs ou inhibiteurs et la MC dans une population nord-américaine mixte. Cette population de cas contrôles est composée d'une proportion élevée d'individus d'origine juive. Pour génotyper les gènes KIRs, l'auteur a utilisé un "high throughput MALDI-TOF mass spectroscopy-based automated multiplex assay". Il convient de noter que les gènes KIR sont fortement homologues et polymorphiques ; par conséquent, le plus grand défi du point de vue technique est le développement d'un essai automatisé multiplex pour leur génotypage. Dernièrement, Díaz-Peña et al. (2016) a démontré une association significative de KIR2DL3 / HLA-C1 avec une susceptibilité à la MC dans une cohorte espagnole comprenant 125 patients atteints de la MC et 339 témoins sains. Les auteurs ont utilisé des sondes oligonucléotidiques spécifiques à la séquence de HLA et KIR pour leur génotypage. Il est à noter que KIR2DL3 a la plus faible affinité de liaison pour ses ligands HLA-C1 par rapport à KIR2DL2 et KIR3DL1 (Parham 2005), ce qui suggère que les cellules NK chez les patients atteints de la MC sont faiblement inhibées et jouent un rôle dans l'immunopathogenèse de la maladie.

L'association entre les gènes KIR moins inhibiteurs et la susceptibilité à la MC implique le rôle des cellules NK dans le développement de cette maladie. Tel que discuté dans

la section précédente, il a été démontré que ces cellules puissent jouer à la fois un rôle protecteur et de pathogénèse dans le développement des maladies auto-immunes et inflammatoires chez l'homme (Johansson et al. 2005 ; Poggi & Zocchi 2014 ; Popko et al. 2015). Des conclusions similaires ont été rapportées concernant les cellules NK chez les patients atteints de la MC. Certaines études ont suggéré un rôle protecteur des cellules NK, tout en soulignant une diminution de leurs nombres dans la circulation sanguine et dans la muqueuse de la lamina propria (LP) des patients atteints de la MC comparé aux cellules provenant des sujets contrôles en santé. Les études, effectués avec des cellules provenant des patients atteints de la MC, ont démontré qu'elles avaient un potentiel cytotoxique compromis (van Ierssel et al. 1995 ; Giacomelli et al. 1999 ; Melgar et al. 2004). Au contraire, plusieurs études récentes suggèrent fortement que la MC est accompagné par une activation des cellules NK, qui jouent un rôle pathogène dans le développement de la maladie (Liu et al. 2009 ; Liu et al. 2011 ; Steel et al. 2011 ; révisé dans Yao et al. 2011). Au moins, deux facteurs majeurs peuvent induire une confusion dans l'évaluation des fonctions effectrices et l'activation des cellules NK (ou de tout autre type cellulaire) chez les patients atteints de la MC : l'activité de la maladie et les effets du traitement. Comme il s'agit d'une maladie récidivante et de rémission, les fonctions et l'activation des cellules NK doivent être étudiées lorsque la maladie est active. En outre, les patients atteints de la MC reçoivent souvent des médicaments anti-inflammatoires (stéroïdes ou non), des anticorps anti-TNF- α et/ou de l'azathioprine. Ces médicaments réduisent le nombre des cellules NK ainsi que leur cytotoxicité (Van Ierssel et al. 1995a ; van Ierssel et al. 1995b ; van Ierssel et al. 1997 ; Steel et al. 2011). En fait, une des études a constaté une augmentation des proportions des cellules NK CD16⁺ dans la lamina propria du côlon, chez les patients atteints de MII, mais pas après leur traitement par l'azathioprine (Steel et al. 2011). Il est donc important qu'afin d'examiner le rôle des cellules NK dans la pathogénèse de la MC, des investigations doivent être effectuées chez des sujets qui sont naïfs de tout traitement ou sont très peu exposés aux médicaments. En outre, les analyses devraient être effectuées avec des manipulations minimales des cellules. Cette manipulation peut altérer l'état d'activation des cellules. Enfin, ces études devraient être menées lorsque la maladie est dans un état actif.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Hypothèse

En se basant sur la littérature discutée précédemment dans « Introduction et revue de littérature », l'hypothèse émise était la suivante : les gènes KIRs activateurs augmentent le risque de développer la maladie de Crohn (MC). En outre, les cellules NK provenant des patients atteints de la MC pourraient avoir un potentiel cytotoxique plus élevé, une expression plus marquée des gènes KIRs activateurs et d'autres marqueurs d'activation.

Raisonnement

Les personnes qui héritent un nombre plus élevé de gènes KIRs activateurs auraient un seuil d'inhibition plus faible des cellules NK. Par conséquent, leurs cellules NK pourraient être activées plus facilement et pourraient causer une destruction et inflammation dans les tissus, tout en sécrétant plus de cytokines pro-inflammatoires et en tuant les cellules épithéliales intestinales autologues. Comme discuté dans la section ci-dessus, le déséquilibre des gènes KIRs activateurs et KIRs inhibiteurs hérités et présents dans plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques a été documenté. Une fréquence plus élevée des gènes KIRs activateurs est associée à une protection contre différents cancers et à une plus grande susceptibilité de développer plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques.

Objectifs

Deux buts spécifiques pour le présent projet de recherche :

1. Comparer la fréquence des gènes KIRs activateurs des patients atteints de la MC et des individus en santé sans aucun lien de parenté.
2. Comparer l'expression des gènes KIRs, des marqueurs d'activation et le potentiel cytotoxique des cellules NK des patients atteints de la MC et des sujets en santé ne montrant aucun lien de parenté.

RÉSULTATS

Article 1

Activating Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genes confer risk for Crohn's disease

Objectif

A déterminer et comparer les fréquences des gènes KIRs activateurs dans trois différentes cohortes de patients atteints de la MC et de contrôles en santé. Ces résultats sont compilés dans un article ci-joint ici. Elle a été soumise et est en révision dans le journal « *PLOS-One* ».

Résumé

Les gènes KIR (Killer Immunoglobine-like receptor) sont très polymorphiques et encodent pour les récepteurs qui sont exprimés à la surface des cellules. Ces récepteurs contrôlent l'activité effectrice des cellules NK. Six de ces gènes sont activateurs et sont exprimés à la surface des cellules NK. Ces récepteurs permettent de contrôler l'activité effectrice des cellules NK. Il s'agit, ici, de démontrer le lien entre le répertoire de ces récepteurs et la susceptibilité/résistance de développer la maladie de Crohn. C'est une maladie auto-immune qui consiste en une inflammation chronique de l'intestin. Plusieurs études ont déjà démontré que le patrimoine génétique a une influence quant à la susceptibilité d'un patient à cette maladie. Nous avons utilisé l'approche de "candidat gene" selon laquelle nous avons génotypé des cas et des contrôles pour ces gènes KIR activateurs par PCR en utilisant des amorces spécifiques à ces gènes dans trois cohortes indépendantes de patients caucasiens canadiens (Montreal, Ottawa et Winnipeg). Cette association a été analysée par une régression logistique inconditionnelle. Par la suite, on a pu obtenir de fortes associations entre la plupart de ces gènes et la maladie de Crohn. De même, une analyse globale de ces résultats pour les cohortes démontre une association de quatre gènes avec la MC. Finalement, on déduit que les gènes KIR activateurs est un facteur de risque important de la maladie de Crohn autant chez les enfants que chez les adultes. Nos résultats mettent en lumière l'implication des gènes KIR activateurs dans cette maladie auto-immune et inflammatoire et cela peut permettre de développer de nouvelles approches immunothérapeutiques.

**Activating Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor genes confer risk for Crohn's
disease in Caucasian children and adults**

**Suzanne Samarani^{1,2,3,5}, David R Mack⁶, Charles N Bernstein⁷, Alexandre
Iannello^{1,2,3,5}, Olfa Debbeche^{1,2,3,5}, Prevost Jantchou^{2,4,5}, Christophe Faure^{2,4,5}, Colette
Deslandres^{2,4,5}, Devendra K Amre^{2,4,5}, Ali Ahmad^{1,2,3,5}**

Laboratory of Innate Immunity¹; CHU Sainte-Justine Research Center²; Department of
Microbiology, Infectious Diseases & Immunology³; Department of Pediatrics⁴;
University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada⁵; Department of Gastroenterology,
Hepatology & Nutrition, Children's Hospital of Eastern Ontario, Ottawa, Canada⁶; IBD
Clinical & Research Center, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada⁷

Running Title: Activating KIR genes confer risk for Crohn disease

Correspondence:

Ali Ahmad (ali.ahmad@recherche-ste-justine.qc.ca)

or

Devendra Amre (devendra.amre@umontreal.ca)

CHU Sainte-Justine Research Center

3175 Cote Ste-Catherine, Montreal, Qc, H3T 1C5, Canada

ABSTRACT

Background: Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) genes encode receptors, which are mainly expressed on, and control functional activities of, Natural Killer (NK) cells. There exist six distinct activating KIR genes in humans, who differ from one another with respect to the repertoire of these genes. Because activated NK cells can potentially cause tissue destruction, we hypothesized that variation in the inherited activating KIR genes in humans is associated with their innate susceptibility/resistance to developing Crohn disease (CD).

Methods: We performed case control studies on three independent Canadian Caucasian CD patient cohorts: two comprising children (Montreal having 193 cases and 245 controls, and Ottawa having 93 cases and 120 controls) and the third one comprising predominantly adults (Winnipeg having 164 cases and 200 controls). We genotyped cases and controls for activating KIR genes by PCR with gene-specific primers and investigated associations between the genes and cases using unconditional logistic regression.

Results: We observed strong associations between all the six KIR genes and CD in Ottawa children, with the strongest risk observed for the KIR2DS1 ($p=1.7 \times 10^{-10}$). Associations between all but the KIR2DS2 were replicated in the Montreal cohort with the strongest association evident for the KIR2DS5 (8.0×10^{-10}). Similarly associations between five genes were observed in the adult Winnipeg cohort. In this cohort, strongest associations were evident with the KIR2DS5 (8.75×10^{-8}). An overall analysis for all cohorts showed strong associations with four of the genes, with the strongest association evident for the KIR2DS5 ($p=1.35 \times 10^{-17}$). In the combined analysis for four KIR genes, individuals carrying one or more of the KIR genes were at significantly higher risks for acquiring CD ($p=3.5 \times 10^{-34}$).

Conclusions: Activating KIR genes are associated with risk for developing CD in both children and adults.

Key words: Crohn disease, IBD, KIR, Leukocyte Receptor Complex

INTRODUCTION

Crohn's Disease (CD), a type of inflammatory bowel disease (IBD), is a chronic, relapsing and remitting disease of the gastrointestinal tract. Considered a disease commonly affecting children and young adults, it is one of the most prevalent gastrointestinal tract diseases in the industrialized world. In North America alone, it affects one in three hundred children and its incidence appears to be on the rise in the developing countries (reviewed in 1,2). As no cure for the disease exists, morbidity from the disease is quite high in particular in children who suffer from numerous consequences such as frequent surgery, growth impairment and psychosocial distress (2,3). Deciphering the etio-pathogenesis of the disease is the focus of ongoing research.

Although the exact pathogenesis of CD remains unclear, it is believed to result from an excessive immune response of the host to intestinal microbiota, food constituents and/or self-antigens (4,5). Several twin and family-based epidemiological studies have shown that genetic predisposition plays an important role in the development of this disease (6; reviewed in 7). Therefore, it is not surprising that a major research effort has been directed towards identification of genetic determinants that predispose humans to develop this disease. Genome-wide association studies (GWAS) as well as their meta-analyses have led to identification of ~150 susceptibility loci/genes for CD (8-12). Among the strongest genetic determinants associated with the development of this disease include those that encode interleukin (IL)-23 receptor, Nucleotide-binding and Oligomerization Domain-containing protein (NOD)-2, the Autophagy-16-like Protein-1 (ATG16L1) and the Immunity-related GTPase M (IRGM; 13-16). These discoveries have increased our understanding about the immunopathogenesis of the disease. Collectively, results from these studies strongly suggest the implication of innate immunity pathways in the development of this disease. Currently identified genetic determinants, however, account for ~10-20% of the inherited variability in CD (17). Therefore, research for exploring novel genetic determinants of the disease still remains an area of priority.

Although GWAS have identified key genetic determinants of CD, coverage of current chips is limited to the areas of the genome known to harbour single-nucleotide polymorphisms (SNPs) and some small insertion-deletions. A large portion of the

genome is characterized by structural variations that encompass copy-number variations, entire gene deletions or multiple genes of high homology. There is currently growing interest in understanding whether genetic determinants present in such regions of the genome could be associated with CD susceptibility. Interestingly, there are numerous portions of the genome that cannot be adequately tagged by SNPs implying that their direct study via a candidate gene approach would be necessary to identify potential susceptibility genes. One such region of the genome is the Leucocyte Receptor Complex (LRC) on chromosome 19q13.4, a dense region spanning ~150 kb that harbours many key genes that influence immune function (18,19). Of particular interest are genes termed as the Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor (*KIR*) genes located within the LRC that code for receptors, which are expressed on the surface of immune cells such as the Natural Killer (NK) cells and a subset of antigen-experienced CD8⁺ T lymphocytes (CTL), and whose expression regulates the functional activities of these cells. The *KIR* family comprises sixteen genes, which are located in a tandem head to tail arrangement (20). Of these, seven *KIR* genes (*KIR2DL1*, *KIR2DL2/3*, *KIR2DL5A*, *KIR2DL5B* and *KIR3DL1-3*) encode receptors with long-tailed cytoplasmic tails. These receptors inhibit the functions of the immune cells upon stimulation with their cognate MHC class I ligands. Hence, these genes are called inhibitory *KIR* genes. Six of the *KIR* genes (*KIR2DS1-5* and *KIR3DS1*) are called activating genes, as they encode short-tailed receptors that activate the immune cells upon binding with their cognate ligands. In addition to gene polymorphism, *KIR* haplotypes also vary from one another with respect to the number of activating *KIR* genes. Some haplotypes, named as Group A *KIR* haplotypes, often carry only one activating *KIR* gene, *KIR2DS4* (21). This gene is often mutated due to the presence of a 22 base pair deletion in exon 5. The deleted variant encodes a protein with only Ig-like domain and is non functional, as it cannot be expressed on the cell surface as a receptor (22,23). On the other hand, group B haplotypes often carry a full complement or a subset of any six activating *KIR* genes (21). Consequently, humans differ from one another with respect to the number of inherited activating *KIR* genes. The inheritance of activating *KIR* genes is thought to increase immune competence of the individual. Such individuals are likely to clear viral infections and be less susceptible for malignancy. However, they are also likely to be more

susceptible to autoimmune and chronic inflammatory diseases. Indeed several activating *KIR* genes have been associated with protection from infectious diseases like AIDS, HCV-induced hepatitis, etc as well as with susceptibility to certain autoimmune and chronic inflammatory diseases like Type 1 diabetes, leukemia and different forms of arthritis (24-31; reviewed in 32). Few studies have investigated the potential association of activating *KIR* genes with CD. We addressed this issue and report here that in Canadians of the Caucasian ancestry, activating *KIR* genes confer strong susceptibility to the development of this disease.

MATERIALS & METHODS

Patient Populations and DNA extraction: We carried out a case-control study based on cohorts acquired from three gastroenterology clinics at Ottawa, Montreal, and Winnipeg, in Canada. The Ottawa cohort comprised unrelated cases and controls of Caucasian origin (cases=93, controls=120), the Montreal cohort comprised of Caucasian unrelated cases and controls that were exclusively of French ancestry (cases=193, controls=245), and the Winnipeg cohort comprised unrelated predominantly adult cases and controls of Caucasian origin (cases=164, controls=200). The diagnosis of the CD cases was based on standard criteria that included clinical, radiological, endoscopic and histopathological findings. As *KIR* genes frequencies may vary between apparently ethnically homogeneous populations, we selected controls from different sources to enhance population representation. These included children visiting the orthopaedic department of the study hospital for minor fractures (Ottawa and Montreal), their siblings (Montreal), a random sample of population-based children and adults (Montreal and Winnipeg) and a birth cohort (Montreal). Only healthy controls without any cancer or autoimmune disorders were included. A subset of the control subjects from Ottawa and Montreal have been previously utilized for replicating or confirming associations between reported susceptibility genes (*viz.* *NOD2*, *ATG16L1*, *IL23R*, *IL10*, *STAT3*, *ZNF365*, *PTPN2*, locus 20q13 etc.) and CD in Canadian children (33-37). Blood and/or saliva samples were collected from the participants as a source of DNA. Genomic DNA from the samples was extracted, quantified by UV spectrometry, coded and aliquoted. The aliquots were kept at -80°C in the bank maintained at the CHU Sainte-Justine Research Center. Informed

consent was obtained from each study participant or his/her legal guardian, and the Institutional Ethics committees approved the studies.

KIR Genotyping: The presence or absence of each activating KIR in all cases and controls was determined by using PCR and sequence-specific primers on their genomic DNA samples as described (38-41). Standard PCR protocols were used which comprised initial denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 30-35 cycles, each comprising 30 seconds of denaturation at 95°C, 30 seconds of annealing at 60-68°C and 2 minutes of extension at 72°C. The final step included extension for 10 minutes. The optimal conditions for PCR (number of PCR cycles and annealing temperatures) were determined for each gene in preliminary experiments. The amplified DNAs from the PCR reactions were run on 2-2.5% agarose gels and electrophoresced in Tris-buffered saline (TBS) buffer. The gels were stained with ethidium bromide, scanned and imaged. The detection of a DNA band of the expected molecular weight was considered as the presence of the gene in the genomic DNA sample. In the case of *KIR2DS4*, two sets of primers were used to determine whether the gene was present, and if so, whether it had the 22 bp mutation in its exon 5. Since the *KIR2DS4* variant with the 22 bp deletion encodes a protein that cannot be expressed on the cell surface as a receptor, its presence was considered as absence of the gene (22,23). We used DNA samples known to be positive or negative for the gene as positive and negative controls, respectively. The PCR reactions included a negative control (the reaction without DNA template) as a safeguard against false positive cases as well as a positive control for HLA-DRB, as a safeguard against false negative cases. The results from our genotyping showed 99% concordance with those obtained from using a commercial *KIR* typing kit (Miltenyi Biotec GmbH; data not shown).

Population stratification: We examined the presence of population stratification in the three cohorts by examining null markers (n=26) across the genome. A subset of cases/controls from each of the 3 cohorts was genotyped and the inflation factor (λ) was estimated using the GC program (42).

Statistical analysis

All study participants were genotyped with respect to the presence or absence of all six activating KIR genes. After assessing quality control (false positive, false negative, non-

specific bands, contaminations, etc), we compared the KIR gene frequencies between cases and controls using Chi-square tests. Subsequently, we carried out unconditional logistic regression analyses, fitting a separate model for each activating KIR gene. We also assessed the effects of harbouring multiple activating KIR genes. For this purpose, we carried out an analysis considering the carriage of activating genes as a continuous variable. We examined homogeneity of noted associations for each gene using chi-square statistics. Genes showing homogeneous associations were further examined on the pooled cohorts using logistic regression. Odds ratios (OR), corresponding 95% confidence intervals (95% CI), and p-values were estimated. All analyses were carried out using STATA software (version 10.1; STATA Corp TX USA).

RESULTS

The clinical and demographic characteristics of the CD cases are shown in [Table 1](#). Based on 26 null markers, we found no evidence of population stratification in any of the 3 cohorts ($\lambda=1.0$, 1.02 and 1.0 respectively for the Ottawa, Montreal and Manitoba cohorts). Initially we conducted this study in the Ottawa cohort of Canadian children of Caucasian ancestry. Initially we conducted this study in the Ottawa cohort of Canadian children of Caucasian ancestry. As shown in [Table 2](#), the frequencies of all the activating *KIR* genes were significantly higher ($p<0.05$) in the cases than in the controls suggesting that the inheritance of these genes enhanced risk for developing CD. The gene that posed the maximum risk in this population was *KIR2DS1* (OR=7.2, 95% CI=3.78-13.7, p-value= 1.7×10^{-10}). The gene rank in conferring the CD risk was $2DS1 > 2DS2 > 2DS4 > 2DS3 > 2DS5 > 3DS1$.

We searched for potential replication in another independent and ethnically homogeneous population and investigated the presence or absence of the six activating *KIR* genes in the Montreal cohort (all of which comprised Canadian children of the French ancestry). As shown in [Table 3](#), the results were almost similar to those obtained with the Ottawa cohort. All the activating *KIR* genes showed higher frequencies in the cases than in the controls. Except for 1 gene (*KIR2DS2*, $p=0.12$), associations with the other five *KIR* genes were strongly significant (p-values ranging from 10^{-3} to 10^{-10}). In the Montreal cohort, the carriage of *KIR2DS5* gene posed the maximum risk (OR=3.58, 95% CI=2.39-

5.37, $p=8.0 \times 10^{-10}$). The gene rank in conferring the CD risk was $2DS5>2DS1>3DS1>2DS3>2DS4$.

To investigate whether noted associations with the KIR genes and CD were unique to children, we examined these associations in a predominantly adult Caucasian cohort (~90% cases >16 years of age at diagnosis) of CD from Winnipeg. As shown in [Table 4](#), significant associations were evident for 5 of the 6 genes. The carriage of *KIR2DS5* gene posed the maximum risk (OR=3.27, 95% CI=2.09-5.12, $p=8.75 \times 10^{-8}$). In all three cohorts, harbouring the functional *KIR2DS4*, which is the only activating *KIR* found in A haplotypes, enhanced risk for CD compared with harbouring no and/or the mutant gene. Barring 2 genes (*2DS1* and *2DS2*) associations between other four activating *KIR* genes were homogenous across the cohorts. A combined analysis for these 4 genes showed strong associations between all the genes ([Table 5](#)) (p-values ranging from 10^{-9} to 10^{-11}) and CD. As each *KIR* gene appeared to confer risk individually, we assessed whether carriage of multiple *KIR* genes further enhanced it in children ([Table 6](#)). Increasing carriage of *KIR* genes was strongly associated with risk for CD in all 3 cohorts individually as well as in the combined cohorts (p-value= 7.5×10^{-35} for carriage of >5 genes).

DISCUSSION:

To the best of our knowledge, this is the first study implicating multiple activating *KIR* genes in enhancing the risk for developing CD both in children and adults of Caucasian origin. It is noteworthy that the magnitudes of the associations noted here for most of the genes are comparable to the ones reported earlier for *NOD2* and *IL23R*, which represent the most strongly associated genes with CD (15,16). Few studies have so far investigated potential associations between *KIR* genes and susceptibility/resistance to developing CD. In a relatively recent study, Wilson et al (43) examined associations between *KIR* genes and CD in a Brazilian Caucasian population comprising of 137 CD patients and 250 healthy unrelated individuals. The authors concluded that imbalances between activating and inhibitory *KIR* genes and their ligands may explain, at least in part, the pathogenesis of the inflammatory bowel diseases. Although no independent effects with either of the *KIR* genes were observed, some interactions between the *KIR* genes and their HLA

ligand genes were noted. The authors concluded that imbalances between activating and inhibitory KIR genes and their ligands may explain, at least in part, the pathogenesis of the inflammatory bowel diseases. Jones et al (44) showed that the *KIR2DS2* gene was associated with enhanced risk for Ulcerative Colitis (the other type of IBD) in Caucasian adults. Although much stronger associations were noted in our children and adult cohorts, the results from these two studies are in line with our findings. However, Hollenbach et al. (45) did not find any association of activating or inhibitory *KIR* genes with CD in a North American population. The discordance in results between the Hollenbach et al (45) and our studies could be due to differences in methodological approaches (MALDI-TOF mass spectroscopy-based automated multiplex assay versus PCR), targeted populations (mixed Jewish/Caucasian versus Caucasian) and/or in the use of different gene-specific primers. Additional support for our findings comes from the Jostins et al (4) meta-analyses of GWAS. In their data, eQTL analysis for the SNP rs11672983 suggested that it was associated with the expression of target genes within the KIR gene complex. Nonetheless, it is interesting that our strong association with the KIR activating genes was not previously demonstrated in GWAS studies. We believe the reason is the extreme homogeneity of the region that limits the use of high-throughput technologies in adequately capturing variation in the complex. A testament to this are the observations that even in the 1000 genome project, the sequencing technologies used have been unable to capture the region (null sequences reported). We thus believe that for regions of such homogeneity, manual PCR based methods (such as the one we utilized) are most informative.

Unlike inhibitory KIR, most of which are known to bind specifically to a subset of MHC class I antigens, the specific ligands for activating KIR remain relatively undiscovered. In this regard, *KIR2DS4* was shown to bind to certain MHC class I antigens but with relatively lower affinity (46). In fact it was later shown to bind an unidentified non-MHC ligand expressed by primary human melanoma cells (47). More recently, *KIR3DS1* was shown to bind open conformers of HLA-F, a non-classical MHC class I antigen (48). Our results suggest that the intestinal epithelial cells from CD patients are likely to express ligands for activating KIR. Given that activating *KIR* genes have been shown to confer susceptibility/resistance towards human diseases, finding specific ligands for the encoded

receptors should be an area of high priority research. Furthermore, it would also be highly desirable to investigate the potential effects of blocking these receptors on the disease severity in CD patients. Such studies could be undertaken in mice, which lack functional *KIR* genes but do carry their functional homologues.

Our findings provide not only important insights concerning the immunopathogenesis of CD, they may also lead to novel anti-CD therapeutics as well. It is noteworthy that *KIR* genes are expressed on the cell surface and hence are more accessible to antibodies or peptides than other target proteins that may be expressed inside cells, e.g., NOD2. *KIR*-specific antibodies, peptide mimics or soluble ligands, if developed, could be used for treating CD and related immune-mediated diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The studies were supported by a research grant from the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (CCFC) to AA and DA. The authors thank the study participants, Drs Willis and Jarvis and A. Mack for their contributions to the study.

The authors declare no competing financial interest.

REFERENCES:

1. Baume G, Strober W (2003) The immunological and genetic basis of Inflammatory Bowel Disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 521-533.
2. Sands B (2004) From symptom to diagnosis: Clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterology* 126:1518-1532.
3. Malik TA (2015) Inflammatory Bowel Disease: Historical Perspective, Epidemiology, and Risk Factors. *Surg Clin North Am.* 95(6):1105-22. doi: 10.1016/j.suc.2015.07.006.
4. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP et al (2012) Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491(7422):119-24. doi: 10.1038/nature11582.
5. Asakura H, Suzuki K, Kitahora T, Morizane T (2008) Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *J. Gastroenterol Hepatol.* 23(12):1794-801. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05681.x.
6. Binder V, Orholm M (1996) Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. *Neth J Med.* 48(2): 53-56.
7. Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen U, Lappalainen M, Farkkila M et al (2006) Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 12(23):3668-72.
8. Franke A, McGovern DPB, Barrett JC, Wang K, Radford-Smith GL et al (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nature Genetics* 42 (12):1118-25. doi: 10.1038/ng.717.
9. Revas MA, Beaudoin M, Gardet A, Stevens C, Sharma Y et al (2011) Deep resequencing of GWAS loci identifies independent rare variants associated with inflammatory bowel disease. *Nature Genetics* 43(11):1066-73. doi: 10.1038/ng.952.
10. Budarf ML, Labbe C, David G, Rioux JD. (2009) GWA: Rewriting the story of IBD. *Trends in Genetics* 25:137-146.
11. Cho JH, Brant SR (2011) Recent insights into the genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 140 (6):1704-12. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.046.

12. Liu JZ, Van Sommeren S, Huang H, Ng SC, Alberts R et al (2015) Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet.* 47(9):979-86. doi: 10.1038/ng.3359.
13. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA et al (2007) Sequence variants in Autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genetics* 39 (7):830-2.
14. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M et al (2007) A genome wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn's disease in ATG-16L1. *Nat. Genetics* 39 (2):207-11.
15. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS et al (2006) A genome-wide association study identifies IL-23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314 (5804): 1461-3.
16. Hugot JP, Chamaillard M, Zoulai H, Lesage S, Cézard JP et al (2001) Association of NOD-2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411 (6837):599-603.
17. McGovern DP, Kugathasan S, Cho JH (2015) Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 149(5):1163-1176.e2. doi:10.1053/j.gastro.2015.08.001.
18. Yawata M, Yawata N, Abi-Rached L, Parham P (2002) Variation within the human killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) gene family. *Crit. Rev. Immunol.* 22 (5-6):463-82.
19. Parham P (2005) Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol. Immunol.* 42 (4):459-62.
20. Bashirova AA, Martin MP, McVicar DW, Carrington M (2006) The Killer Immunoglobulin-like Receptor gene cluster: Tuning the genome for defense. *Ann Rev. Genomics & Hum. Genetics* 7:277-300.
21. Hsu KC, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ et al (2002) Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: Evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J. Immunol.* 169 (9):5118-29.

22. Maxwell LD, Wallace A, Middleton D, Curran MD (2002) A common KIR2DS4 deletion variant in the human that predicts a soluble KIR molecule analogous to the KIR1D molecule observed in the Rhesus monkey. *Tissue Antigens* 60:254-8.
23. Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM (2007) Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and non-deleted version in different populations. *Human Immunol.* 68 (2):128-34.
24. Martin MP, Gao X, Lee JH, Nelson GW, Detels R et al (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays progression to AIDS. *Nat. Genetics* 31 (4):429-34.
25. Yen JH, Lin CH, Tsai WC, Tsai WC, Wu CC et al (2007) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene's repertoire in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 35 (2):124-7.
26. Jiao YL, Ma CY, Wang LC, et al. Polymorphisms of KIR gene and HLA-C alleles in patients with ankylosing spondylitis: possible association with susceptibility to the disease. *J Clin. Immunol.* 2008;28:343-9.
27. Williams F, Meenagh A, Sleator C, et al. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor gene KIR2DS1 is associated with psoriatic arthritis. *Hum. Immunol.* 2005;66:836-41.
28. Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving Hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872-4.
29. van der Silk AR, Koeleman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Rorp BO et al (2003) KIR in type 1 diabetes: Disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 52:2639-42.
30. Zaema A, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C, Amre DK, Sinnott D, Ahmad A. Novel associations between activating Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor genes and childhood leukemia. *Blood.* 2011 Aug 4;118(5):1323-8. doi: 10.1182/blood-2010-10-313791. Epub 2011 May 25.
31. de Smith AJ, Walsh KM, Ladner MB et al. The role of KIR genes and their cognate HLA class I ligands in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014 Apr 17;123(16):2497-503. doi: 10.1182/blood-2013-11-540625.

32. Kulkarni S, Martin MP, Carrington M. The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease. *Seminars in Immunol.* 2008;20:343-52.
33. Amre DK, Mack DR, Morgan K et al. Autophagy gene ATG16L1 but not IRGM is associated with Crohn disease in Canadian children. *Inflamm. Bowel Dis.* 2009;15:501-7.
34. Amre DK, Mack D, Israel D, et al. Association between genetic variants in the IL-23R gene and early-onset Crohn's disease: results from a case-control and family-based study among Canadian children. *Am. J. Gastroenterol.* 2008;103:615-20.
35. Amre DK, Mack DR, Morgan K, et al. Investigation of reported associations between the 20q13 and 21q22 loci and pediatric-onset Crohn's disease in Canadian children. *Am. J. Gastroenterol.* 2009;104:2824-8.
36. Amre DK, Mack DR, Mrgan K, et al. Interleukin 10 (IL-10) gene variants and susceptibility for paediatric onset Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2009;29:1025-31.
37. Amre DK, Mack DR, Morgan K, et al. Susceptibility loci reported in genome-wide association studies are associated with Crohn's disease in Canadian children. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2010; Jun;31(11):1186-91. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04294.x.
38. Zhi-ming L, Yu-lian J, Zhao-li F, et al. Polymorphisms of Killer-Cell Immunoglobulin-like Receptor Gene: Possible association with susceptibility to or clearance of Hepatitis B Virus infection in Chinese Han population. *Croat Med J.* 2007;48:800-6.
39. Gomez-Lozano N, Vilches C. Genotyping of human killer-cell immunoglobulin-like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence-specific primers: an update. *Tissue Antigens* 2002;59:184-93.
40. Hiby SE, Reagan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum. Reproduction* 2008;23:972-6.
41. Maxwell LD, Williams F, Gilmore P, Meenagh A, Middleton D. Investigation of Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor gene diversity: II. KIR2DS4. *Hum. Immunology* 2004;65:613-21.

42. Delvin B, Roeder K, Wasserman L. Genomic control, a new approach to genetic-based association studies. *Theor. Pop. Biol.* 2001;60: 155-165.
43. Wilson, T.J, Jobim M, Jobim LF, et al. Study of killer immunoglobulinlike receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum. Immunology* 2010;71:293-7.
44. Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JRF, Jewell DP, Trowsdale J, Young NT. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in Ulcerative Colitis susceptibility. *Genes & Immunity* 2006;7:576-82.
45. Hollenbach, J.A, Ladner MB, Saeteurn K, et al. Susceptibility to Crohn's disease is mediated by LIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics* 2009;61:663-71.
46. Katz G, Markel G, Mizrahi S et al. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short-tail number 4. *J. Immunol.* 2001;166:7260-7.
47. Katz G, Gazit R, Arnon TI, et al. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J. Immunol.* 2004;173:1819-25.
48. Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR, Rucevic M, Lamothe-Molina PA, Pertel T, Kim TE, Dugan H, Alter G, Dechanet-Merville J, Jost S, Carrington M, Altfeld M. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol.* 2016 Sep;17(9):1067-74. doi: 10.1038/ni.3513.
49. Chapel A, Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Ziegler M, Lunemann S, Martrus G, Altfeld M. Peptide-specific engagement of the activating NK cell receptor KIR2DS1. *Sci Rep.* 2017 May 25;7(1):2414. doi: 10.1038/s41598-017-02449-x.

Table 1. Clinical characteristics of the pediatric CD patient cohorts

Characteristic	Ottawa N=93	Montreal N=193
Age at diagnosis		
Mean (\pm SD)	12.4 (\pm 3.1)	12.5 (\pm 3.2)
Gender (%)		
Females	44 (47.3)	91 (47.2)
Males	49 (52.7)	102 (52.8)
Disease location (%)†		
L1 \pm L4	23 (25.3)	38 (20.1)
L2 \pm L4	15 (16.5)	64 (33.9)
L3 \pm L4	53 (58.2)	87 (46.0)
Disease behaviour (%)†		
B1 \pm p	71 (76.3)	172 (90.1)
B2 \pm p	7 (7.5)	9 (4.7)
B3 \pm p	15 (16.1)	10 (5.2)

†Classification based on the WGO's Montreal Classification implemented at diagnosis. Three patients had disease restricted to either only the upper tract or anal region and for three patients the location could not be adequately classified. For two patients, the disease behaviour at diagnosis was not clear. The percentages may not add up due to rounding.

Table 2. Association between the presence/absence of activating KIR genes and risk for CD in the Ottawa pediatric cohort.

Gene	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P-value
2DS1				
+	76 (81.7)	46 (38.3)	7.2 (3.78-13.7)	1.7 x 10 ⁻¹⁰
-	17 (18.3)	74 (61.7)		
2DS2				
+	78 (83.8)	75 (62.5)	3.12 (1.60-6.07)	0.001
-	15 (16.10)	45 (37.5)		
2DS3				
+	47 (50.5)	34 (28.3)	2.58 (1.46-4.56)	0.001
-	46 (49.50)	86 (71.7)		
2DS4				
+	71 (76.3)	66 (55.0)	2.64 (1.45-4.80)	0.001
-*	22 (23.7)	54 (45.0)		
2DS5				
+	43 (46.2)	32 (26.7)	2.37 (1.33-4.20)	0.003
-	50 (53.8)	88 (73.3)		
3DS1				
+	54 (58.1)	47 (39.2)	2.15 (1.24-3.73)	0.006
-	39 (41.9)	73 (60.8)		

* indicates the presence of the 22 bp deleted forms and/or absence of the gene

Table 3. Association between the presence/absence of activating KIR genes and risk for CD in the Montreal pediatric cohort.

Gene	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P-values
2DS1				
+	127 (65.8)	102 (41.6)	2.70 (1.8-4.0)	6.7 x 10 ⁻⁷
-	66 (34.2)	143 (58.4)		
2DS2				
+	123 (63.7)	138 (56.3)	1.36 (0.93-2.0)	0.12
-	70 (36.3)	107 (43.7)		
2DS3				
+	111 (57.5)	83 (33.9)	2.64 (1.79-.3.90)	1.01 x 10 ⁻⁶
-	82 (42.5)	162 (66.1)		
2DS4				
+	137 (71.0)	139 (56.7)	1.87 (1.25-2.78)	0.002
-*	56 (29.0)	106 (43.3)		
2DS5				
+	140 (72.5)	104 (42.4)	3.58 (2.39-5.37)	8.0 x 10 ⁻¹⁰
-	53 (27.5)	141 (57.6)		
3DS1				
+	126 (65.3)	101 (41.2)	2.68 (1.81-3.96)	7.4 x 10 ⁻⁷
-	67 (34.7)	144 (58.8)		

* indicates the presence of the 22 bp deleted forms and/or absence of the gene

Table 4. Association between the presence/absence of activating KIR genes and risk for CD in the adult Winnipeg cohort.

Gene	Patients N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI)	P-values
2DS1				
+	91 (55.5)	94 (47.0)	1.41 (0.93-2.12)	0.11
-	73 (44.5)	106 (53.0)		
2DS2				
+	107 (65.2)	85 (42.5)	2.54 (1.66-3.89)	1.9 x 10 ⁻⁵
-	57 (34.8)	115 (57.5)		
2DS3				
+	98 (59.8)	67 (33.5)	2.95 (1.92-.4.52)	8.14 x 10 ⁻⁷
-	66 (40.2)	133 (66.5)		
2DS4				
+	115 (70.1)	104 (52.0)	2.17 (1.40-3.34)	5.0 x 10 ⁻⁴
-*	49 (29.9)	96 (48.0)		
2DS5				
+	122 (74.4)	94 (47.0)	3.27 (2.09-5.12)	8.75 x 10 ⁻⁸
-	42 (25.6)	106 (53.0)		
3DS1				
+	119 (72.6)	93 (46.5)	3.04 (1.96-4.73)	8.14 x 10 ⁻⁷
-	45 (27.4)	107 (53.5)		

* indicates the presence of the 22 bp deleted forms and/or absence of the gene. The analysis from 170 cases and 200 controls are shown.

Table 5. Association between the presence/absence of 4 activating KIR genes and risk for CD in the pooled cohorts.*

Gene	OR (95% CI)	P-value
2DS3	2.73 (2.11-3.53)	8.0×10^{-15}
2DS4	2.14 (1.64-2.78)	8.15×10^{-9}
2DS5	3.06 (2.36-3.97)	1.35×10^{-17}
3DS1	2.66 (2.06-3.44)	4.0×10^{-14}

* Based on implementing the logistic regression model after accounting for study site.

Table 6. Association between number of activating KIR genes and CD in the children cohorts

Number of genes	Ottawa	Montreal	Pooled*
	OR (95% CI) P-value	OR (95% CI) P-value	OR (95% CI) P-value
≤ 2	Reference	Reference	Reference
3-4	8.1 (3.84-17.1) 2.0 x 10 ⁻⁸	3.83 (2.3-6.38) 2.2 x 10 ⁻⁷	4.9 (3.21-7.47) 1.3 x 10 ⁻¹³
5-6	12.9 (5.36-31.1) 1.2 x 10 ⁻⁸	13.4 (7.22-25.0) 2.4 x 10 ⁻¹⁶	13.5 (8.10-22.36) 1.0 x 10 ⁻²³
P-value for trend**	2.1 x 10 ⁻⁹	1.8 x 10 ⁻¹⁶	2.5 x 10 ⁻²⁴

* Pooled estimates after accounting for study site.

** based on including the variable representing the number of KIR genes as a continuous variable in the logistic regression model

Article 2

The peripheral blood Natural Killer cells are more activated and cytotoxic in Crohn disease patients

Objectif

A déterminer et comparer l'expression des récepteurs KIR et non-KIR, de différents marqueurs d'activation et des intégrines sur les cellules NK du sang périphérique provenant des patients atteints de la maladie de Crohn par rapport à des sujets contrôles sains et en bonne santé. Aussi à démontrer la dégranulation et le potentiel de cytotoxicité des cellules NK entre les patients et les sujets contrôles. Ces résultats sont présentés dans l'article 2 et soumis dans le journal « Innate Immunity ».

Résumé

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire dont on ne connaît pas la cause principale. Comme c'est déjà connu que plusieurs facteurs (génétique, immunitaire, environnementale, microbiote intestinale et *cetera*) peuvent causer cette maladie. Comme l'immunité innée peut être des causes, ce qui nous permet de suggérer que les cellules NK peuvent jouer un rôle dans la susceptibilité et le risque de développer cette maladie. Alors comme nous avons démontré récemment qu'il y a une association entre les KIR activateurs et la MC, dans cette étude, nous avons investigué l'expression de ces gènes sur la surface des cellules NK chez ces patients. Nous avons démontré que les récepteurs activateurs KIR et non-KIR sont fortement exprimés à la surface des cellules NK. Aussi bien, les récepteurs inhibiteurs KIR et non KIR sont faiblement exprimés chez les patients. Plusieurs molécules d'intégrines, qui acheminent la migration des cellules vers l'intestin, sont fortement exprimées aussi. Ainsi, ceci démontre que les cellules NK du sang périphérique des patients atteints de la MC sont plus activées et cytotoxiques comparés à celles des contrôles sains. Ces résultats ouvrent des portes à de nouveaux traitements basant sur cellules NK pour cette maladie.

Peripheral blood Natural Killer cells are more activated and cytotoxic in Crohn disease patients

Suzanne Samarani^{1,2,3,6}, Patrick Sagala^{1,2,3,6}, Prevost Jantchou^{2,4,6}, Guy Grimard^{2,5,6}, Christophe Faure^{2,4,6}, Colette Deslandres^{2,4,6}, Devendra K Amre^{2,4,6}, Ali Ahmad^{1,2,3,6}

Laboratory of Innate Immunity¹; CHU Sainte-Justine Research Center²; Department of Microbiology & Immunology³; Department of Pediatrics⁴; Department of Surgery⁵; University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada⁶

Short Title: Activation of peripheral blood NK cells in Crohn's disease

Correspondence:

Ali Ahmad

CHU Sainte-Justine Research Center; 3175 Cote Ste-Catherine, Montreal, Qc, H3T 1C5, Canada

E-mail: ali.ahmad@recherche-ste-justine.qc.ca;

Tel: 1-514-345-4931 ext 6157

Lettre 2007.04.02

ABSTRACT

We investigated the expression of KIR and non-KIR receptors and different integrins on peripheral blood NK cells in Crohn disease (CD) patients vis-a-vis healthy control subjects. We also determined recent degranulation history and cytotoxic potential of the NK cells using freshly isolated peripheral blood from both CD patients and healthy control subjects. Multiple color flow cytometry was used for these determinations. Our results show that NK cells from CD patients expressed higher levels of activating KIR as well as other non-KIR activating receptors vis-à-vis healthy control donors. They also showed increased frequencies of the cells expressing these receptors. The expression of inhibitory KIR and other non-KIR receptors tended to decrease compared with the cells from healthy donors. NK cells from the patients also expressed increased levels of different gut-homing integrin molecules. Furthermore, NK cells from CD patients showed a recent history of increased cytotoxic events and exhibited higher cytotoxicity against an NK cell-sensitive K562 cell line. Collectively, these data suggest that peripheral blood NK cells in CD patients are more activated and more cytotoxic compared to their counterparts from healthy individuals. They are very likely to be implicated in the immunopathogenesis of the disease.

Key words: Activating receptors, Crohn disease, Cytotoxicity, Integrins, KIR, NK cells, NK cell receptors

INTRODUCTION

Natural Killer (NK) cells are important effector cells of the innate immune system. They comprise about 10-15% of the mononuclear cells in the peripheral blood (Robertson & Ritz 1990; Freud & Caligiuri 2006; Iannello et al., 2008). Phenotypically, they are non T and non-B lymphocytes and express CD16 (Fc γ RIIIa; the low affinity receptor for Fc region of IgG) and/or CD56 (an isoform of the Neural Cell adhesion Molecule/N-CAM) on their surface. Based upon the levels of expression of these two molecules, NK cells have been subdivided into different subsets of which CD56^{hi}CD16⁻ and CD56^{dim}CD16⁺ have been well characterized (Wilk et al, 2008). NK cells can kill autologous cells of the body when the latter cells become infected with intracellular pathogens (e.g., viruses), transformed or stressed due to DNA damage or inflammatory conditions. NK cells can effectively kill and eliminate these cells. They can also kill pathogen-infected and cancer cells with the help of antibodies in a process called antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC; Ahmad & Menezes 1996; Iannello et al., 2008; Ochoa et al, 2017). The cells targeted in ADCC express specific antigens for the antibodies, which bind to CD16 on NK cells. Furthermore, they can also regulate immune responses by secreting a variety of soluble mediators such as IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES, etc (Fu et al., 2014). By secreting these soluble mediators, NK cells can affect the quality and strength of an adaptive immune response. They can also modulate adaptive immune responses by their interactions with DC, effector T cells and Tregs (Schuster et al 2016; Thomas & Yang 2016).

NK cells express a wide variety of inhibitory and activating receptors as well as co-stimulatory molecules on their surface (Frag et al., 2002; Iannello et al., 2008; Elliott & Yokoyama 2011). The receptors and co-receptors bind to their cognate ligands on the surface of target cells. The balance of inhibitory and activating signals received by an NK cell determines whether the target cell in question will be killed or spared. From the functional point of view, most important, of these receptors are Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR), which are either of inhibitory or activating type (Lanier 1998; Parham 2005; Khakoo & Carrington 2006). Each KIR, especially in the case of inhibitory ones, binds to public epitopes present on a subset of related MHC class I/HLA molecules. Different inhibitory KIRs bind with their cognate HLA ligands with different affinities and exert varying degrees of inhibition on NK cells. KIR receptors are encoded by the same-name (*KIR*) genes. The *KIR* gene family is polygenic and highly polymorphic. The individuals that inherit KIR-HLA genotypes that exert relatively weaker inhibition of their NK cells and/or inherit increased number of activating KIR genes present relatively more resistance to intracellular pathogens. They can control and clear viral and microbial infections relatively more efficiently as compared to the individuals who inherit KIR-HLA genotypes that exert tighter inhibition of their NK cells and/or inherit none or a smaller number of functional activating *KIR* genes (Parham 2005; Khakoo & Carrington 2006). Such individuals are also more resistant to the development of a variety of cancers. However, they are more prone to the development of

different auto-immune diseases and chronic inflammatory diseases. In this regard, inheritance of less inhibitory KIR-HLA genotypes and a higher number of activating *KIR genes* has been associated with the development of several autoimmune diseases such as ankylosing spondylitis, type 1 diabetes (T1D), multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, etc (Parham 2005; Rajalingam 2011; Ivarsson et al., 2014; Ghannad et al., 2014). It has been proposed that NK cells in these individuals have relatively low activation threshold, become activated from different environmental triggers, cause autoaggression and promote inflammation. Consistent with this theme, we have recently shown significant positive associations of activating KIR genes with the development of Crohn disease (CD) using three independent cohorts of Caucasian CD patients (Samarani et al., manuscript submitted). CD is a chronic inflammatory disease of gastro-intestinal tract that particularly affects terminal part of ilium and colon. The disease has an autoimmune component as the patients develop a variety of autoantibodies that target antigens such as pancreatic autoantigens (e.g., glycoprotein-2, CUB and zona pellucida-like domains-containing protein 1, GM-CSF and phospholipids, etc) (Jurickova et al., 2013; Michaels et al., 2015; Sipeki et al., 2015; Mitsuyama et al., 2016).

The significant positive associations of activating KIR genes with the development of CD suggests involvement of NK cells in the pathogenesis of this disease. They also suggest that these cells express these receptors more frequently. Consequently, NK cells from CD patients might express different activation biomarkers at higher levels as compared with healthy control subjects. Therefore, we investigated the expression of KIRs, a variety of other receptors and integrin molecules on NK cells from CD patients vis-à-vis healthy control subjects.

MATERIALS & METHODS

Study population:

For these studies, whole peripheral blood from 20 CD and the same number of healthy controls were used. All the study participants were 7-17 years of age and were Caucasians residing in Quebec. Of the CD patients, 9 were newly diagnosed, 6 had relapsing disease, and 5 were in remission. The patients in remission were currently receiving TNF- α blocking antibodies (Infliximab or Adalimumab), prednisone or azathioprine. Demographic and clinical parameters of the study participants are given in Table 1. Controls were age- sex-matched donors who came to the Ste-Justine Hospital orthopedic clinic or as visitors and had no known disease. Written informed consent was obtained from all the blood donors or their legal guardians. The study was approved by the CER (Comite d'ethics de recherche) of CHU Ste-Justine.

Flow cytometry:

The expression of KIRs and other molecules (listed in Table 2) in NK cells was determined by multi-color flow cytometry. Whole peripheral blood from each donor was used in these determinations. Before staining, Fc Receptors (FcR) were blocked in 1 ml of whole blood using the Human FcR Binding Inhibitor (eBioscience, catalogue # 14-

9161-73). RBCs in the samples were lysed using RBC lysis buffer from eBioscience (catalog #00-4300-54). After washing with PBS containing 0.5% FBS (PBS/FBS), aliquots (100 ul each) were stained with PerCp-eFluor 710-conjugated anti-human CD3, CD14 and CD19 antibodies (see Table 2 for vendors and catalog # for the antibodies used in this study), APC-conjugated anti-human CD56 and anti-human CD16 and marker-specific (FITC- or PE-conjugated) antibodies. Only for one KIR (2DS3) unconjugated antibody was used (Table 2). For its detection, the cells were incubated with the anti-KIR2DS3 antibody, washed and incubated with the secondary antibody (polyclonal PE-conjugated F(ab') anti Rabbit IgG from eBioscience, catalog # 12-4739-89). After washing with PBS/FBS, the cells were stained with anti-CD3, anti-CD16 and anti-CD16 antibodies as described above in this section. Since antibodies specific for all KIRs were not available, combinations of two antibodies, each of which binds to a different subset of KIRs, was used as specified in Table 3. Controls were incubated under similar conditions with fluorochrome-conjugated isotype-matched control antibodies (all from eBioscience). For some receptors (e.g., KIR2DL4), which are expressed intracellularly in endosomes/lysosomes, the cells were fixed and permeabilized with Cytfix/Cytoperm reagents (BD Biosciences) before addition of the marker-specific antibodies.

After addition of the antibodies, the reaction tubes were gently vortexed and incubated for 30 minutes at room temperature. The cells in each tube were washed twice with PBS/FBS, resuspended in 2% paraformaldehyde and analyzed by flow cytometry using BD LSRII Fortessa. Single fluorochromes were used for compensation (elimination of spectral overlapping) using minus one method and for the setting of gates. The data was acquired using FlowJo and analysed using FACSDiva (Tree Star). The gates for lymphocytes were set by forward and side scatter.

Determination of NK cells' recent history of cytotoxicity:

The surface expression of LAMP (Lysosome-associated membrane protein)-1 or CD107a has been used as a measure recent cytotoxic activity of NK cells and CD8+ T lymphocytes (CTL). CD107a is normally expressed on the inner surface of cytotoxic granules in these cells. When the cells degranulate (upon mediating cytotoxicity and release of cytokines), CD107a is translocated onto the cell surface and remains there for a few hours. Therefore, at any given time, surface expression of this molecule in NK cells and CTL correlates with their recent degranulation (cytotoxicity; Alter et al., 2004). We determined CD107a expression on NK cells with and without stimulation with K562 cells, which are erythroleukemic cells, lack surface expression of MHC class I molecules and are often used as target cells to activate NK cells and determine their cytotoxicity (Lozzio et al., 1975; Derby et al., 2001). In this assay, 100 ul of whole blood was used with and without addition of 1×10^5 K562 cells at 37°C for one hour. Thereafter, FITC-conjugated anti-CD107a antibodies (eBioscience, catalogue # 11-1079-42) and the Golgi Stop (Monensin; BD Bioscience) were added and the cells were further incubated for 3 hours. The microcultures were placed on ice, and the cells were stained with PerCp efluor 710-conjugated anti-CD3 and PE-Cy7-conjugated anti-human CD56 and PE-Cy7-

conjugated anti-human CD16 antibodies. After lysis of RBCs with the RBC Lysis Buffer (eBioscience; catalog #00-4300-54), the cells were analyzed by flow cytometry. The data were acquired on LSRII Fortessa, acquired by FACSDiva and analyzed with FlowJo (TreeStar).

Determination of NK cell-mediated cytotoxicity:

We also used microcytotoxicity assays for determining direct cytotoxic potential of NK cells using K562 as target cells. For this purpose, we used a flow cytometric assay with some modifications (Derby et al., 2001) in which the target cells, K562, are labelled with PKH-67 (MINI67 kit; Sigma), a fluorochrome that emits green fluorescence. The labelled cells (5×10^4) were incubated with 100 μ l of whole blood giving a target to effector ratio close to 1:20 and incubated at 37°C for 4 hours. Thereafter, 7-aminoactinomycin (7-AAD) was added to the micocultures to distinguish dead cell from live cells. After the incubation, number of live cells (PKH+7AAD-) was determined in the micocultures by flow cytometry. Percent cytotoxicity was determined by the formula: $\{(\text{number of live cells without the effectors} - \text{number of live cells in the presence of effectors}) / \text{number of live cells without the effectors}\} \times 100$.

Statistical analyses:

Data were expressed as median and interquartile ranges. Differences between medians were tested for significance using Mann-Whitney with post-hoc comparison. All analyses were performed with GraphPad Prism Version 4 (GraphPad Software).

RESULTS

NK cell subsets in CD patients and healthy controls:

We determined absolute numbers of total NK cells as well as of their different subsets based upon the expression of CD56 and CD16. No significant differences were observed in the percentages of NK cells in the peripheral blood lymphocytes but their absolute numbers were significantly increased in patients' blood (Figure 1). Furthermore, significant perturbations were observed in some subsets: significant decreases were observed in the percentages and numbers of CD56^{hi}CD16⁺ subset whereas reverse was true for CD56^{dim}CD16⁺ subset. We also observed an expansion of CD56^{dim}CD16^{dim} NK cells in CD patients relative to healthy controls.

Expression of KIR on peripheral blood NK cells CD patients and healthy controls:

The expression of KIR on NK cells in the peripheral blood was determined using KIR-specific antibodies as described in the Materials & Methods section. As shown in Figure 2, the expression of all the six activating KIR, as determined by their mean fluorescence intensities (MFI), was significantly increased on NK cells in CD patients compared with healthy controls. Furthermore, the percentages of NK cells expressing these receptors was also significantly increased in the patients except for KIR2DS3 for which the increase was statistically non-significant ($p > 0.05$). The expression of inhibitory KIR is

shown in Figure 3. However, CD patients showed a general trend of a decreased expression of KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL5 and KIR3DL1 on NK cells compared with those from healthy controls. Furthermore, the percentages of NK cells expressing these receptors also decreased significantly (≤ 0.05) in these patients. The reverse trend was observed for KIR2DL3 for these parameters. Interestingly, the expression of KIR2DL4, an atypical inhibitory KIR, was increased but the percentages of NK cells expressing this receptor were not increased significantly ($p > 0.05$) in CD patients compared with healthy control subjects.

Expression of non-KIR receptors and markers on NK cells:

We determined the expression of different non-KIR receptors on NK cells in the peripheral blood of CD patients and healthy control subjects. The expression and the percentages of NK cells expressing CD69, NKG2C, NKG2D and IL-23R tended to increase in CD patients as compared with those healthy control subjects. In contrast, although the expression of NKG2A showed non-significant ($p > 0.05$) changes, the percentages of NK cells expressing this inhibitory receptor decreased significantly in CD patients. The expression of CD57, and percentages of NK cells expressing this marker showed significant decreases in CD patients compared to their counterpart cells from healthy controls (Figure 4).

Expression of integrins on NK cells:

We determined the expression of CD103 ($\alpha E\beta 7$), VLA4 ($\alpha 4\beta 1/CD49d-CD29$) and integrin $\beta 7$ on NK cells. The expression of these integrins was significantly increased on NK cells in CD patients. Furthermore, the percentages of NK cells expressing these integrins also tended to increase in the patients' blood (Figure 5).

Expression of CXC3R1, NKp46 and NKp44 on NK cells:

The expression of the chemokine receptor CXC3R1, NKp46 and NKp44 on NK cells from CD patients vis-à-vis healthy controls is shown in Figure 6. The expression levels of CXC3R1 and NKp46 as well as the percentages of NK cells expressing them were increased CD patients compared with the healthy controls. However, the expression of NKp44 was decreased and so were the number of NK cells expressing this receptor in CD patients as compared with the cells from healthy control individuals.

NK cell from CD patients show a recent history of increased degranulation events:

The level of expression of CD107a on the surface of NK cells in CD patients was significantly higher (see MFIs in Figure 7). The expression was also higher in CD patients as compared with healthy control subjects after stimulation of their NK cells with K562. Furthermore, more NK cells expressed this marker in CD patients with and without stimulation with K562 as compared with healthy control subjects.

NK cells from CD patients are more cytotoxic compared with healthy controls:

In direct microcytotoxicity assays, PBMC from CD patients exhibited significantly increased NK cell-mediated killing of K562 cells as compared with PBMC from healthy control subjects (Figure 8). The % cytotoxicity values for CD patients ranged 53.82-94.39, whereas they ranged 16.14-45.70 for healthy control subjects.

DISCUSSION

In this study, we compared the expression of KIR, various non-KIR molecules and integrins on peripheral blood NK cells from CD patients and their age-matched healthy control subjects. We also compared recent degranulation history and cytotoxic potential of these innate immune cells from the patients and healthy control subjects. We found increased expression of activating KIR and increased percentages of NK cells expressing these receptors. On the contrary, the expression and the percentages of NK cells expressing inhibitory KIR were increased in CD patients compared with those of healthy controls. Increased numbers of NK cells expressing activating KIRs may result from the observed increased frequencies of these genes occurring in CD patients (Samarani et al., manuscript submitted). Increased frequencies of activating KIR genes and of inhibitory *KIR* genes, which encode receptors with lower affinities for their MHC class I ligands, have been associated with several human autoimmune and chronic inflammatory conditions that include sepsis, ankylosing spondylitis, systemic lupus erythematosus, leukemia, T1D and autism etc (Almate et al., 2011; Tajik et al., 2011; Torres et al., 2012; Díaz-Peña et al., 2015; Hou et al., 2015; Oliveira et al., 2017; reviewed in Rajalingam 2011; Ivarsson et al., 2014). In this regard, similar trends were observed in IBD patients by some researchers but not by others (reviewed in Yadav et al., 2011). In individuals that harbor increased frequencies of activating *KIR* genes and/or of less inhibitory *KIR* genes, NK cells have very low activation threshold. This means their NK cells could be spuriously activated by environmental stimuli such as microbial infections, radiation, stress and/or certain diets and cause autoaggression and produce more pro-inflammatory mediators.

We found that NK cells from CD patients expressed more CD69 compared with those from healthy controls. It is noteworthy that CD69 is a C type lectin and is expressed on the cell surface as an s-s linked homodimer. It is expressed very early on lymphocytes upon activation from different stimuli (Testi et al., 1994). It is also the earliest marker expressed on NK cells when they are stimulated with K562 cells. Furthermore, its expression correlates with that of CD107a (Dons'koi et al., 2011). Functionally, CD69 inhibits functioning of the sphingosine 1 phosphate (S1P) receptor type 1 (S1P₁), which inhibits egress of lymphocytes from thymus, lymph nodes and inflamed tissue in response to S1P. Upon interaction with its ligand, galectin-1, CD69 induces expression of cytokines such as IFN- γ from NK cells (Cibrián & Sánchez-Madrid, 2017). An increased expression of CD69 on peripheral blood NK cells in CD patients shows that they are in an activated state and are more likely to be retained in inflamed intestine and its lymphoid structures.

IL23/IL-23R system has been implicated in the pathogenesis of CD. Loss of function variants of the IL-23R are protective in humans from CD (Sivanesan et al., 2016). Increased expression of the receptor on NK cells observed here is in accordance with the results reported by Liu et al. (2011). The researchers also showed an increased expression of the cytokine (IL-21) in the circulation and inflamed colons of CD patients. It is noteworthy that a therapeutic monoclonal antibody, Risankizumab, targets p19 subunit of IL-23 and was clinically effective in active CD in a recent clinical trial (Feagan et al., 2017).

In line with the results concerning the expression of activating and inhibitory KIR, we found an increased expression of activating non-KIR receptors NKG2C and NKG2D but a decreased expression of NKG2A. NKG2C-positive NK (and T) cells are often expanded in humans infected with HCMV, although no ligand for the receptor has yet been recognized (Rolle & Brodin, 2016). Production of pro-inflammatory cytokines such as IL-15, IL-12, IL-21 and IL-18, and activating KIR play a role in this expansion. Interestingly, IL-21, a pro-inflammatory cytokine whose expression increases in the circulation of CD patients, induces expression of NKG2C in immature NK cells (Brady et al., 2004; Liu et al., 2009). The expression of NKG2C is considered a biomarker for memory type NK cells. Interactions between HLA-E, whose expression increases on the surface of HCMV-infected cells, and NKG2C cause expansion of NKG2C-positive cells in HCMV-infected individuals. NKG2C-positive NK cells show increased production of IFN- γ and TNF- α compared with NKG2C-negative NK cells. It is noteworthy that these cytokines have been implicated in the pathogenesis of CD (Neurath, 2014). The serostatus of our study participants is unknown. It is possible that a higher number of CD patients may be infected with this virus compared with healthy donors causing an increased expression of this receptor on their NK cells. The patient NK cells also express higher levels of NKG2D, an atypical member of the NKG2 family of NK cell receptors. Other than NK cells, activated human CTL also express this receptor. The receptor binds so-called 'stress-induced' ligands such as MICA, MICB and ULBP-1-6 (El-Gazzar et al., 2013). Normally, healthy cells in the body rarely express these ligands. It has been demonstrated that intestinal epithelial cells in CD patients express higher levels of these ligands as well as NKG2D on their NK cells (La Scaleia et al., 2012), and hence may be targeted by these cells in this disease. Targeting NKG2D by a monoclonal antibody showed some clinical benefit in IBD patients (Allez et al., 2016). The expression of NKG2A, an inhibitory receptor of the NKG2A that binds HLA-E, was observed to be decreased in CD patients. The receptor is expressed on developing NK cells before the expression of KIR (Farag et al., 2002; Iannello et al., 2008; Elliott & Yokoyama 2011). Its decreased expression may contribute towards reduced activating threshold of NK cells in CD patients.

The expression of different integrins such as CD103 ($\alpha E\beta 7$), VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) and $\beta 7$ were all increased on peripheral blood NK cells in CD patients compared to their expression on NK cells in healthy controls. These integrins play an important role in extravasation and homing of NK cells (and other lymphocytes) into tissues (Peng & Tian, 2014). CD103,

also known as mucosal lymphocyte antigen-1, plays an important role in the homing and retention of lymphocytes in the gut (Gahmberg et al., 2009). It binds E-cadherin expressed on the basolateral surface of intestinal epithelial cells. The integrin $\alpha 4\beta 7$ is another gut-homing receptor that binds the Mucosal addressin cellular adhesion molecule (MadCAM)-1, a vascular adhesion molecule that directs lymphocyte extravasation to intestinal lamina propria. Etrolizumab is a $\beta 7$ -specific therapeutic antibody that inhibits trafficking of lymphocytes to the gut by blocking both $\alpha 4\beta 7$ and CD103. Another antibody, Vedolizumab, targets $\alpha 4\beta 7$ heterodimer and is more specific. Both these antibodies are approved for therapy in IBD patients (Katsanos & Papadakis 2017). VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$; CD49d-CD29) binds the vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 expressed on activated vascular endothelial cells in inflamed tissues. It plays a role in the extravasation of lymphocytes into tissues. A humanized therapeutic monoclonal antibody Natalizumab blocks this integrin by targeting its $\alpha 4$ subunit, and has been approved for use in CD patients. However, it also blocks extravasation of lymphocytes into brain via blood brain barrier endothelial cells and its usage results in the development of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML; Zundler et al., 2017). Our results suggest that increased expression of the integrins on peripheral blood NK cells in CD patients shows their increased potential to migrate to inflamed sites in the intestine.

Interestingly, the expression of two Natural Cytotoxicity Receptors (Kruse et al., 2014), NKp46 and NKp44, showed opposite trends. The expression of NKp46, an activating receptor that is constitutively expressed on all human NK cells, was significantly increased in CD patients whereas the expression of NKp44, which is also an activating receptor and is expressed only on cytokine-activated NK cells, was significantly decreased. Interestingly, an imbalance in the expression of these two receptors in CD patients has been described earlier (Takayama et al., 2010). Our results are in line with the published data and suggest that NK cells in CD patients have an activated phenotype. CX3CR1, also known as Fractalkine receptor and binds Fractalkine, neurotactin or CX3CL1 (Ferretti et al., 2014). The receptor-positive lymphocytes are chemoattracted to inflamed sites in tissues. Interestingly, it has been documented that this chemokine receptor is involved in increased migration of T cells to the gut in IBD patients (Sans et al., 2007; Kobayashi et al., 2007).

We found increased expression of CD107a on NK cells in CD patients compared to NK cells from healthy controls. The increased expression of this molecule was also observed on K562-stimulated NK cells from CD patients as compared with similarly stimulated NK cells from healthy controls. Other than lysosomes, CD107a is also expressed on the inner membranes of cytotoxic granules in NK cells and CTL (Eskelinen et al., 2003). When these cytotoxic cells undergo degranulation (upon triggering the killing of a target cell or upon secretion of cytokines), CD107a is translocated to the cell membrane and remains there for a few hours. Thus, at any given time, its levels of expression on the surface of an NK cells reveals the cell's recent degranulation and cytotoxicity history (Alter et al., 2004). A significantly increased expression of CD107a on peripheral blood NK cells from CD patients vis-à-vis healthy controls suggests that these cells in CD

patients had been more active than in healthy controls with respect to their cytotoxicity and secretion of cytokines. Furthermore, the increased expression of CD107a in K562-stimulated NK cells in the patients compared with similarly stimulated NK cells from healthy controls suggests that the cells from the patients are more cytotoxic. These results were confirmed in direct cytotoxicity assays, in which peripheral blood from CD patients showed significantly increased % cytotoxicity against an NK-sensitive target cells compared with the blood from healthy controls. To the best of our knowledge, no study has so far examined the expression of CD107a on NK (or other cytotoxic) cells in CD patients. Taken together, our data on peripheral blood NK cells suggest that these cells are highly activated and more cytotoxic compared with healthy controls. An earlier study, however, reported that peripheral blood NK cells in CD patients show less than normal cytotoxicity due to the presence of an inhibitory factor in the circulation (Giacomelli et al., 1999). However, the authors showed that purified NK cells from the patients were quite normal in their cytotoxicity. More recently, it was shown that purified peripheral blood NK cells from CD patients were slightly more cytotoxic when used fresh. However, they were much more cytotoxic after their in vitro stimulation with IL-21 compared with similarly treated cells from healthy controls (Liu et al., 2009). It is noteworthy that the concentrations of the cytokine are significantly increased in the gut and circulation of CD patients (De Nitto et al., 2010). Thus our results are in accordance with these observations.

Our results have the caveat that we have examined NK cell cytotoxicity in the peripheral blood in this study and not in mononuclear cells isolated from intestinal tissues. It is noteworthy that NK cells that reside in, and/or infiltrate into, intestinal (and other) tissues are CD56^{hi}CD16^{-low} (Melgar et al., 2004; Chinen et al., 2007). These cells are less cytotoxic compared with the CD56^{dim}CD16⁺ subset that are the predominant (90%) population in peripheral blood. However, the former subset becomes as cytotoxic as the latter one once it is stimulated with cytokines such as IL-15 (Wilk et al., 2007). Given that increased levels of several pro-inflammatory cytokines have been described in the circulation as well as in the lamina propria of gut in CD patients (Neurath 2014), it is very likely that NK cells in the gut of these patients also acquire cytotoxic potential. In this regard, two studies showed increased numbers of NK cells with higher levels of perforin in the inflamed gut of CD patients although the results on their cytotoxic potential were contradictory (Melgar et al., 2004; Chinen et al., 2007). Confounding factors in these assays include variability in the disease activity of the patients (whether they had active disease or were in remission) and their treatment regimens. Several drugs prescribed for CD patients such as azathioprine, corticosteroids and different biologics adversely affect numbers and functions of NK cells in the body (Van Ierssel et al., 1997; Orandi et al., 2017). In particular, azathioprine induces apoptosis in immature NK cells, inhibits proliferation of CD16⁺ NK cells and reduces their cytotoxicity. It was demonstrated that CD16⁺ NK cells are increased in the lamina propria of colons in CD patients and they are highly cytotoxic. However, their numbers and cytotoxic potentials decrease in the patients receiving azathioprine (El-Azhary 2003; Steel et al., 2011; Orandi et al., 2017). It is noteworthy that all the patients studied by Melgar et al. (2004) showed

no cytotoxicity of their LP NK cells because all of them were receiving prednisolone or azathioprine.

Taken together, our results suggest increased activation status of peripheral blood NK cells in CD patients is a contributing factor to the pathogenesis of this chronic inflammatory disease. In addition to their increased cytotoxic activities (shown here), NK cells may also contribute to the disease in several other ways: increased production of pro-inflammatory cytokines (such as IFN- γ and TNF- α , etc) and chemokines (such as CCR2 and RANTES, etc), killing of Tregs, activated T cells and DC. It is because of these multiple functions of NK cells, they have been postulated to play a dual role in autoimmune diseases (Johansson et al., 2006; Perricone et al., 2008). For example, by killing activated T cells, they could protect the host from T cell-mediated autoimmunity. However, their activation could also cause auto-aggression and inflammation if the host's autologous cells become stressed/infected and become more susceptible to NK cell-mediated killing. Blocking of one or more NK cell activating receptor may alleviate disease progression as has been demonstrated in cardiac inflammation (Ong et al., 2017). However, further studies are required to test the relevance of such an approach in CD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the study participants, Paulo Cordeiro and Carl-Frederick Duchatellier for their contributions to the study and technical assistance. The study was originally supported by a Grant-in Aid (GIA) of research from Crohn & Colitis of Canada.

REFERENCES

Ahmad A, Menezes J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J.* 1996 Feb;10(2):258-66.

Allez M, Skolnick BE, Wisniewska-Jarosinska M, Petryka R, Overgaard RV. Anti-NKG2D monoclonal antibody (NNC0142-0002) in active Crohn's disease: a randomised controlled trial. *Gut.* 2016 Aug 3. pii: gutjnl-2016-311824. doi: 10.1136/gutjnl-2016-311824

Almalte Z, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C, Amre DK, Sinnott D, Ahmad A. Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood.* 2011 Aug 4; 118(5):1323-8. doi: 10.1182/blood-2010-10-313791.

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*, 2004, 294:15-22.

Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol.* 2004 Feb 15; 172(4):2048-58.

Chinen H, Matsuoka K, Sato T, Kamada N, Okamoto S, Hisamatsu T et al. Lamina propria c-kit⁺ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. *Gastroenterology*. 2007 Aug; 133(2):559-73.

Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol*. 2017 Jun;47(6):946-953. doi: 10.1002/eji.201646837.

De Nitto D, Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 triggers effector cell responses in the gut. *World J Gastroenterol*. 2010 Aug 7; 16(29):3638-41

Derby E, Reddy V, Kopp W, Nelson E, Baseler M, Sayers T, Malyguine A. Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett*. 2001 Aug 1;78(1):35-9.

Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Mulero J, Sánchez A, Queiro R, López-Larrea C. Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol*. 2015 May;180(2):201-6. doi: 10.1111/cei.12568.

Dons'koi BV, Chernyshov VP, Osypchuk DV. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*. 2011 Sep 30;372(1-2):187-95. doi: 10.1016/j.jim.2011.07.016.

El-Azhary RA. Azathioprine: current status and future considerations. *Int J Dermatol*. 2003 May;42(5):335-41

El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol*. 2013 Aug 15;191(4):1509-15. doi: 10.4049/jimmunol.1301071.

Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol*. 2011 Aug;32(8):364-72. doi: 10.1016/j.it.2011.06.001.

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol*. 2003 Mar;13(3):137-45.

Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 2002, 100: 1935-1947.

Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Panés J, Kaser A, Ferrante M et al., Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet*. 2017 Apr 29;389(10080):1699-1709. doi: 10.1016/S0140-6736(17)30570-6.

- Ferretti E, Pistoia V, Corcione A. Role of fractalkine/CX3CL1 and its receptor in the pathogenesis of inflammatory and malignant diseases with emphasis on B cell malignancies. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:480941. doi: 10.1155/2014/480941.
- Freud AG, Caligiuri, MA. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* 2006, 214: 56–72.
- Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology.* 2014 Apr;141(4):483-9. doi: 10.1111/imm.12224.
- Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1790(6):431-44. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.007.
- Giacomelli R, Passacantando A, Frieri G, Parzanese I, D'Alò S, Vernia P et al., Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol.* 1999 Jan;115(1):72-7.
- Ghannad MS, Hajilooi M, Solgi G. HLA-KIR interactions and immunity to viral infections. *Res Mol Med.* 2014; 2(1): 1-20.
- Hou Y, Zhang C, Xu D, Sun H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2015 May;180(2):250-4. doi: 10.1111/cei.12582.
- Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *J Leukoc Biol.* 2008 Jul;84(1):1-26. doi: 10.1189/jlb.0907650.
- Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol.* 2014 Apr 22;5:184. doi: 10.3389/fimmu.2014.00184. eCollection 2014.
- Johansson S, Hall H, Berg L, Höglund P. NK cells in autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;298:259-77.
- Jurickova I, Collins MH, Chalk C, Seese A, Bezold R, Lake K, von Allmen D, Frischer JS, Falcone RA, Trapnell BC, Denson LA. Paediatric Crohn disease patients with stricturing behaviour exhibit ileal granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) autoantibody production and reduced neutrophil bacterial killing and GM-CSF bioactivity. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):455-65. doi: 10.1111/cei.12076.
- Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. *Gut Liver.* 2017 Jul 15;11(4):455-463. doi: 10.5009/gnl16308.
- Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol. Rev.* 2006, 214: 186-201.

Kobayashi T, Okamoto S, Iwakami Y, Nakazawa A, Hisamatsu T, Chinen H, Kamada N, Imai T, Goto H, Hibi T. Exclusive increase of CX3CR1+CD28-CD4+ T cells in inflammatory bowel disease and their recruitment as intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis*. 2007 Jul;13(7):837-46.

Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*. 2014 Mar;92(3):221-9. doi: 10.1038/icb.2013.98.

Lanier LL. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998, 16: 359-393.

La Scaleia R, Stoppacciaro A, Oliva S, Morrone S, Di Nardo G, Santoni A, Cucchiara S, Palmieri G. NKG2D/Ligand dysregulation and functional alteration of innate immunity cell populations in pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Oct;18(10):1910-22. doi: 10.1002/ibd.22899.

Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z, Kan Q, Liu Z, Liu Y. IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2009 Aug;15(8):1133-44. doi: 10.1002/ibd.20923.

Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2011 Apr;89(4):597-606. doi: 10.1189/jlb.0810456.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*, 1975, 45: 321-34.

Melgar S, Hammarström S, Oberg A, Danielsson A, Hammarström ML. Cytolytic capabilities of lamina propria and intraepithelial lymphocytes in normal and chronically inflamed human intestine. *Scand J Immunol*. 2004 Jul-Aug;60(1-2):167-77

Michaels MA, Jendrek ST, Korf T, Nitzsche T, Teegen B, Komorowski L, Derer S, Schröder T, Baer F, Lehnert H, Büning J, Fellerman K, Sina C. Pancreatic Autoantibodies Against CUZD1 and GP2 Are Associated with Distinct Clinical Phenotypes of Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2015 Dec;21(12):2864-72. doi: 10.1097/MIB.0000000000000564.

Mitsuyama K, Niwa M, Takedatsu H, Yamasaki H, Kuwaki K, Yoshioka S, Yamauchi R, Fukunaga S, Torimura T. Antibody markers in the diagnosis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 21;22(3):1304-10. doi: 10.3748/wjg.v22.i3.1304.

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2014 May;14(5):329-42. doi: 10.1038/nri3661.

Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inogés S, Melero I, Berraondo P. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol.* 2017 Apr;95(4):347-355. doi: 10.1038/icb.2017.6.

Oliveira LM, Portela P, Merzoni J, Lindenau JD, Dias FS, Beppler J, Graebin P, Alho CS, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F, Jobim LF, Jobim M, Roesler R. Reduced frequency of two activating KIR genes in patients with sepsis. *Hum Immunol.* 2017 Apr;78(4):363-369. doi: 10.1016/j.humimm.2017.02.005.

Ong S, Rose NR, Čiháková D. Natural killer cells in inflammatory heart disease. *Clin Immunol.* 2017 Feb;175:26-33. doi: 10.1016/j.clim.2016.11.010.

Orandi AB, Vogel TP, Keppel MP, Utterson EC, Cooper MA. Azathioprine-Associated Complete NK Cell Deficiency. *J Clin Immunol.* 2017 Jun 22. doi: 10.1007/s10875-017-0414-6

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar;5(3):201-14.

Peng H, Tian Z. NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014 Oct;47(2):119-27. doi: 10.1007/s12016-013-8400-0.

Perricone R, Perricone C, De Carolis C, Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev.* 2008 May;7(5):384-90. doi: 10.1016/j.autrev.2008.03.002.

Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* 2011 Dec;46(4):216-28. doi: 10.5045/kjh.2011.46.4.216.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990 Dec 15;76(12):2421-38.

Rölle A, Brodin P. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends Immunol.* 2016 Mar;37(3):233-243. doi: 10.1016/j.it.2016.01.005

Sans M, Danese S, de la Motte C, de Souza HS, Rivera-Reyes BM, West GA, Phillips M, Katz JA, Fiocchi C. Enhanced recruitment of CX3CR1+ T cells by mucosal endothelial cell-derived fractalkine in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2007 Jan;132(1):139-53.

Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol.* 2016 Jun 14;7:235. doi: 10.3389/fimmu.2016.00235. eCollection 2016.

Sipeki N, Davida L, Palyu E, Altorjay I, Harsfalvi J, Szalmas PA, Szabo Z, Veres G, Shums Z, Norman GL, Lakatos PL, Papp M. Prevalence, significance and predictive value of antiphospholipid antibodies in Crohn's disease. *World J Gastroenterol.* 2015 Jun 14;21(22):6952-64. doi: 10.3748/wjg.v21.i22.6952.

Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011 Jan;33(1):115-26. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04499.x

Tajik N, Shahsavari F, Poormoghim H, Radjabzadeh MF, Mousavi T, Jalali A. KIR3DL1+HLA-B Bw4Ile80 and KIR2DS1+HLA-C2 combinations are both associated with ankylosing spondylitis in the Iranian population. *Int J Immunogenet.* 2011 Oct; 38(5):403-9. doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01024.x.

Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J, Matuzaki Y, Suzuki S, Sugita A, Koganei K, Hisamatsu T, Kanai T, Hibi T. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.* 2010 Sep;139(3):882-92, 892.e1-3. doi: 10.1053/j.gastro.2010.05.040.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni R. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today,* 1994, 15: 479-483.

Thomas R, Yang X. NK-DC Crosstalk in Immunity to Microbial Infection. *J Immunol Res.* 2016; 2016: 6374379. doi: 10.1155/2016/6374379.

Torres AR, Westover JB, Gibbons C, Johnson RC, Ward DC. Activating killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their cognate HLA ligands are significantly increased in autism. *Brain Behav Immun.* 2012 Oct;26(7):1122-7. doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.014.

Van Ierssel AJ, Mieremet-Ooms MA, Van der Zon JM, Van Hogezaand RA, Griffioen G, Lamers CB, Verspaget HW. Suppression of intestinal mucosal natural killer cells by corticosteroids. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997 Apr;11(2):347-53.

Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology.* 2008; 213(3-4):271-83. doi: 10.1016/j.imbio.2007.10.012.

Yadav PK, Chen C, Liu Z. Potential Role of NK Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 2011; 2011: Article ID 348530; doi:10.1155/2011/348530.

Zundler S, Becker E, Weidinger C, Siegmund B. Anti-Adhesion Therapies in Inflammatory Bowel Disease-Molecular and Clinical Aspects. *Front Immunol.* 2017 Jul 28;8:891. doi: 10.3389/fimmu.2017.00891.

Table 1. Demographic and clinical parameters of CD patients

Parameter	Patients	Controls
No	20	20
Age	6-17	6-17
Sex ^a	15:11	14:12
Ethnicity	French Caucasian	French Caucasians
Disease activity	9 newly diagnosed	-
	6 relapsed	-
	5 in remission	-
Drugs	14 none	-
	6 under treatment	-

Sex^a indicates male: female ratio. Newly diagnosed had not received any treatment. Treatment for the patients in relapses included prednisone, azathioprine, prednisone, Anakrina and Natalizumab in different combinations. The patients in remission were currently receiving TNF- α blocking antibodies (infliximab or adalimumab), prednisone or azathioprine.

Table 2. List of antibodies used in this study

Target	Antibody	Vendor	Cat #	Conjugated with
CD3	SK7	eBioscience	46-0036-42	PerCp-eFluor 710
CD14	HCD14	Biolegend	325619	APC Cy-7
CD19	HIB19	Biolegend	302217	APC Cy-7
CD16	CB16	eBioscience	17-0168-41	APC
CD56	HD56	Biolegend	381310	APC
CD16	3G8	B&D	564829	Brilliant UV395
CD56	TULY56	eBioscience	48-0566-42	Efluor 450
2DL1	HP-3E4	B&D	556062	FITC
2DL1/2DS1	HP-MA4	Biolegend	339505	PE
2DL2/2DL3	DX27	Biolegend	312605	FITC
2DL3	180701	R&D	FAB2014F	PE/FITC
2DS3	-	LSBIO	LS-C165532	Unconjugated
2DL2/2DL3/2DS2	GL183	BC	IM2278U	PE
2DL4 (CD158d)	mAB33/(33)	Biolegend	347006	PE
2DS4 (CD158i)	JJC11.6	MB	130-092-680	PE
2DL5 (CD158f)	UP-R	Biolegend	341303	PE
3DL1	DX9	B&D	312706	FITC
3DL1 /3DS1	Z27	BC	IM3292	PE

3DL2 (CD158k)	539304	R&D	FAB2878P	PE
NKG2A	131411	R&D	FAB1059	PE
NKG2C	134591	R&D	FAB138P	PE
NKp46	9E2	Biologend	331907	PE
NKp44	P44-8.1	B&D	558563	PE
CD69	FN50	eBioscience	11-0699-42	FITC
VLA-4 (I α 4/CD49d)	9F10	eBioscience	12-0499-42	PE
I β 7	FIB27	Biologend	121005	PE
CD103 (I α E)	BecACT8	Biologend	350206	PE
IL-23R	218213	R&D	FAB14001P	PE
CD57	HCD57	Biologend	322306	FITC
NKG2D	1D11	Biologend	320805	PE
CXC3R1	2A9-1	eBioscience	12-6099-42	PE

B&D: Becton & Dickinson, LSBIO: Life Span Biotechnology, MB: Miltenyi Biotec.

Table 3. Antibody combinations used to determine expression of KIRs

KIR	Antibody 1	Antibody
2DS1/S3/S5	(FITC)-HP-3E4 (2DL1)	(PE)-HP-MA4 (2DL1/2DS//S3/S5)
2DS2	(FITC)-DX27 (2DL2/3)	(PE)-GL183 (2DL2/3/2DS2)
2DL2	(FITC)-180701 (2DL3)	(PE)-GL183 (2DL2/3/2DS2)
3DS1	(FITC)-DX9 (3DL1)	(PE)-Z27 (3DL1/3DS1)

Figure Legends

Figure 1. NK cell subsets in the peripheral blood of CD patients and healthy controls.

- A. Strategy for gating NK cells and their subsets. A. Lymphocytes were gated based upon FSC-A and SSC-A, doublets were eliminated by FSC-H and SSC-W, dead cells were eliminated using Aqua Blue and FSC-A, doublets were again eliminated using FSC-H and SSC-W, CD56⁺CD19⁻CD14⁻ cells were selected and final CD3⁻ cells were selected as NK cells.
- B. CD3⁻CD19⁻CD14⁻CD56⁺ cells were further divided based upon the expression of CD56 and CD16. The left and right panels show dot plots of NK cell subsets from a typical healthy control and a CD patient, respectively. 1: CD56^{bright}CD16⁻, 2: CD56^{bright}CD16⁺, 3: CD56^{dim}CD16⁻, 4: CD56^{dim}CD16^{dim}, 5: CD56^{dim}CD16⁺ and 6: CD56⁻CD16⁺.
- C. Percentages and absolute numbers of total NK cells and NK cell subsets in the peripheral blood of CD patients vis-a-vis healthy control subjects are shown. Percentages of NK cells are of total lymphocytes and of each subset is of NK cells. The Figure shows medians and interquartile ranges. P values are shown where differences were significant.

Figure 2. Expression of activating KIR on NK cells in CD patients and healthy controls.

Fifty ul blood samples were used and stained for CD3, CD14, CD19 and activating KIR (PE or FITC-conjugated) as described in Material & Methods' section. CD3⁻CD14⁻CD19⁻ NK cells were gated as shown in Figure 1 (panel A) and used to determine the expression of activating KIR. The Figure shows mean fluorescence intensities (MFI) and absolute numbers of NK cells expressing the receptor (medians and interquartile ranges). P values are shown where differences were significant.

Figure 3. Expression of inhibitory KIR on NK cells in CD patients and healthy controls.

The cells were stained for NK cell discrimination as described in legend for Figure 2, stained for antibodies specific for inhibitory KIR as described in the Materials & Methods' section. The figure shows mean fluorescence intensities (MFI) and numbers of NK cells expressing the KIRs in CD patients and control subjects. Each box and whisker plot indicates median, upper and lower values, interquartile range and p-values.

Figure 4. Expression of non-KIR markers on NK cells in CD patients and healthy controls. Fifty ul of peripheral blood was stained with antibodies for gating CD3⁻CD14⁻CD19⁻ NK cells and marker-specific antibodies as indicated in Table 2. The Figure shows MFI and numbers of NK cells expressing the indicated marker in CD patients and

healthy controls. Each box and whisker plot indicates median, inter-quartiles and p-values.

Figure 5. Expression of integrins on NK cells in CD patients and healthy controls.

Fifty ul aliquots of peripheral blood was stained with antibodies for gating CD3-CD14-CD19- NK cells and integrin-specific antibodies as indicated in Table 2. The Figure shows MFI and numbers of NK cells expressing the integrin. Each box and whisker plot indicates median, inter-quartiles and p-values for CD patients and control donors.

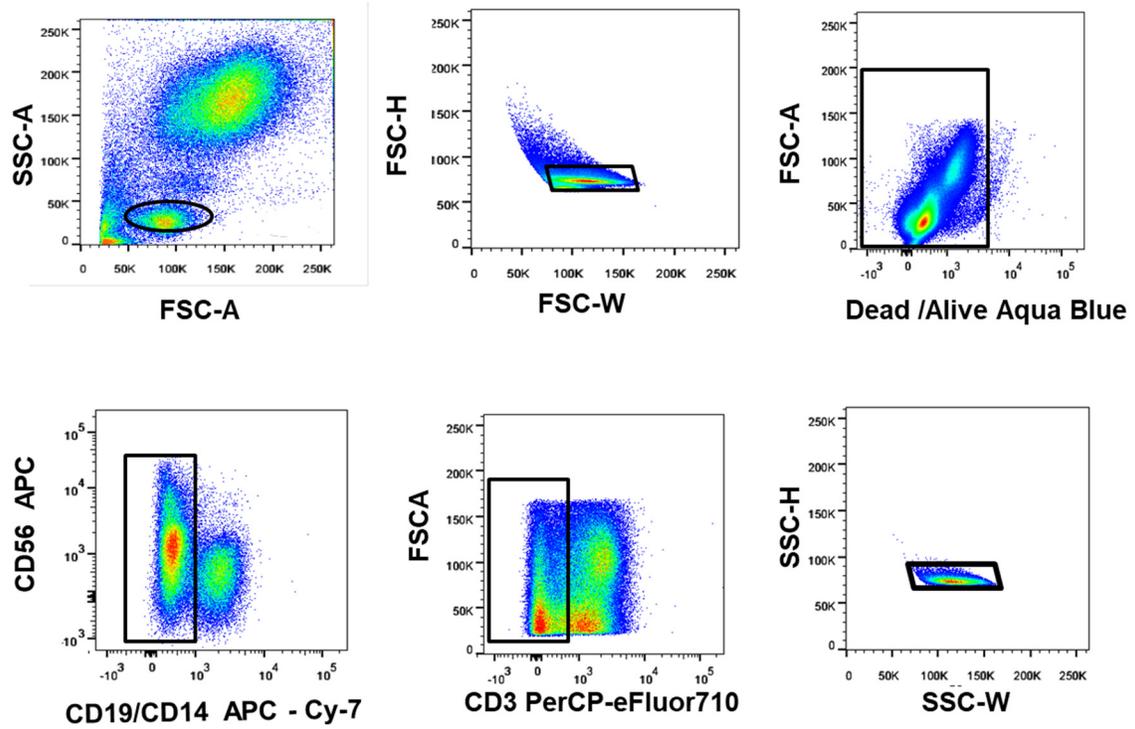
Figure 6. Expression of NKp46, NKp44 and CX3CR1 on NK cells in CD patients and healthy controls. Peripheral blood samples from CD patients and health controls were stained for gating NK cells as described in the legend to Figure 1. The samples were additionally stained for antibodies specific for NKp46, NKp44 and CXCR3. The Figure shows MFI and numbers of NK cells expressing the markers. The box and whisker plots indicate median, inter-quartiles and p-values for CD patients and healthy controls.

Figure 7. Expression of CD107a on NK cells with and without stimulation with K562 in CD patients and healthy controls. For this assay, 100 ul of the peripheral blood from each donor was incubated with and without 1×10^5 K562 cells at 37°C in the presence of Golgi Stop (BD Bioscience). After one hour's incubation, the cells were stained on ice with PerCp efluor 710-conjugated anti-human CD3, PE-Cy7-conjugated anti-human CD56, PE-Cy7-conjugated anti-human CD16 and FITC-conjugated anti-CD107a (all from eBioscience). RBCs were lysed and the expression of CD107a was determined on CD3-CD56+ NK cells on LSRII Fortessa and analysed by FACSDiva. A. The Figure depicts gating strategy. Lymphocytes were gated from their forward and side scatters (R1). Then CD56 and/or CD16-positive and CD3-NK cells were gated (R2). The expression of CD107a was determined on R2 gated cells. R2 in upper panel shows cells without incubation with K562 and R2 in the lower panel shows cells incubated with K562. The histograms show MFI and cell numbers expressing CD107a in a typical patient (case) and a typical control individual (Control) with (on the right) and without (on the left) incubation with K562 cells. B. The Figure depicts medians and interquartile ranges. And compares MFI of CD107a expression (left panel) on NK cells and the numbers of CD107a-positive cells (right panel) between patients and controls. Note significant increases in the expression in the patients' blood compared with that of the control subjects both constitutively (without incubation with K562 cells) and after their stimulation with K562 cells.

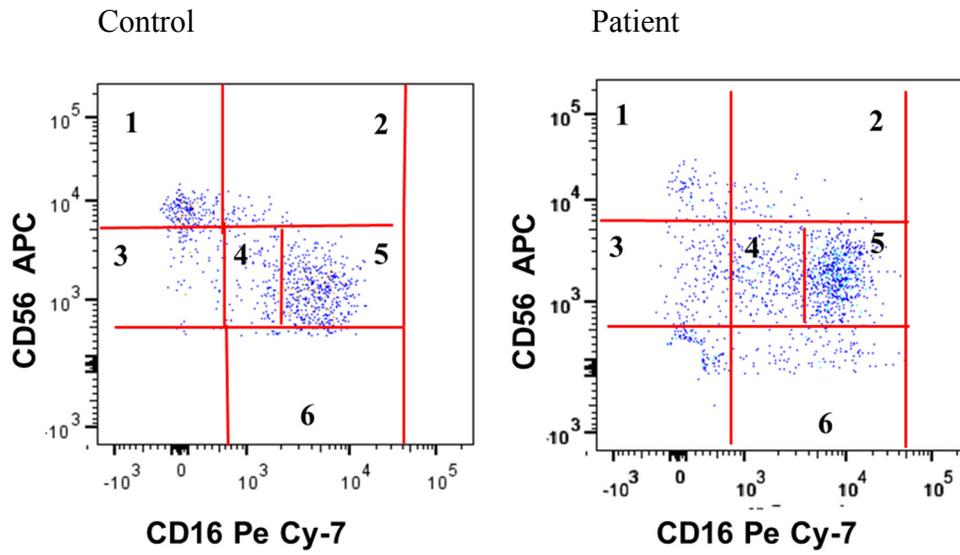
Figure 8. Cytotoxic potential of NK cells.

A. Cytotoxic potential of NK cells. A flow cytometry-based microcytotoxicity assay was used to determine cytotoxic potential of NK cells. Upper panels show K562 cells: right panel (K562 cells alone), middle panel (K562 incubated with blood cells from a healthy control/control) and left panel (K562 incubated with blood cells from a CD patient/case). Lower panels show gating of live K562 cells (PKH67+7ADD-) target cells. Left, middle and right panels show target cells incubated with no effector cells, effector cells from a healthy control subject and effector cells from a CD patient, respectively. The live target cell counts were used for calculating % cytotoxicity. B. One hundred ul of the peripheral blood from each donor was incubated at 37°C with PKH-67-labelled K562 target cells for one hour. The effector to target ratio was approximately 20:1. After the incubation, live cells were counted and % cytotoxicity determined as described in the Materials & Methods. The Figure shows media and interquartile ranges of % cytotoxicity from 20 CD patients and the same number of healthy control subjects. The medians between the two groups different significantly ($p < 0.01$ indicated by three stars).

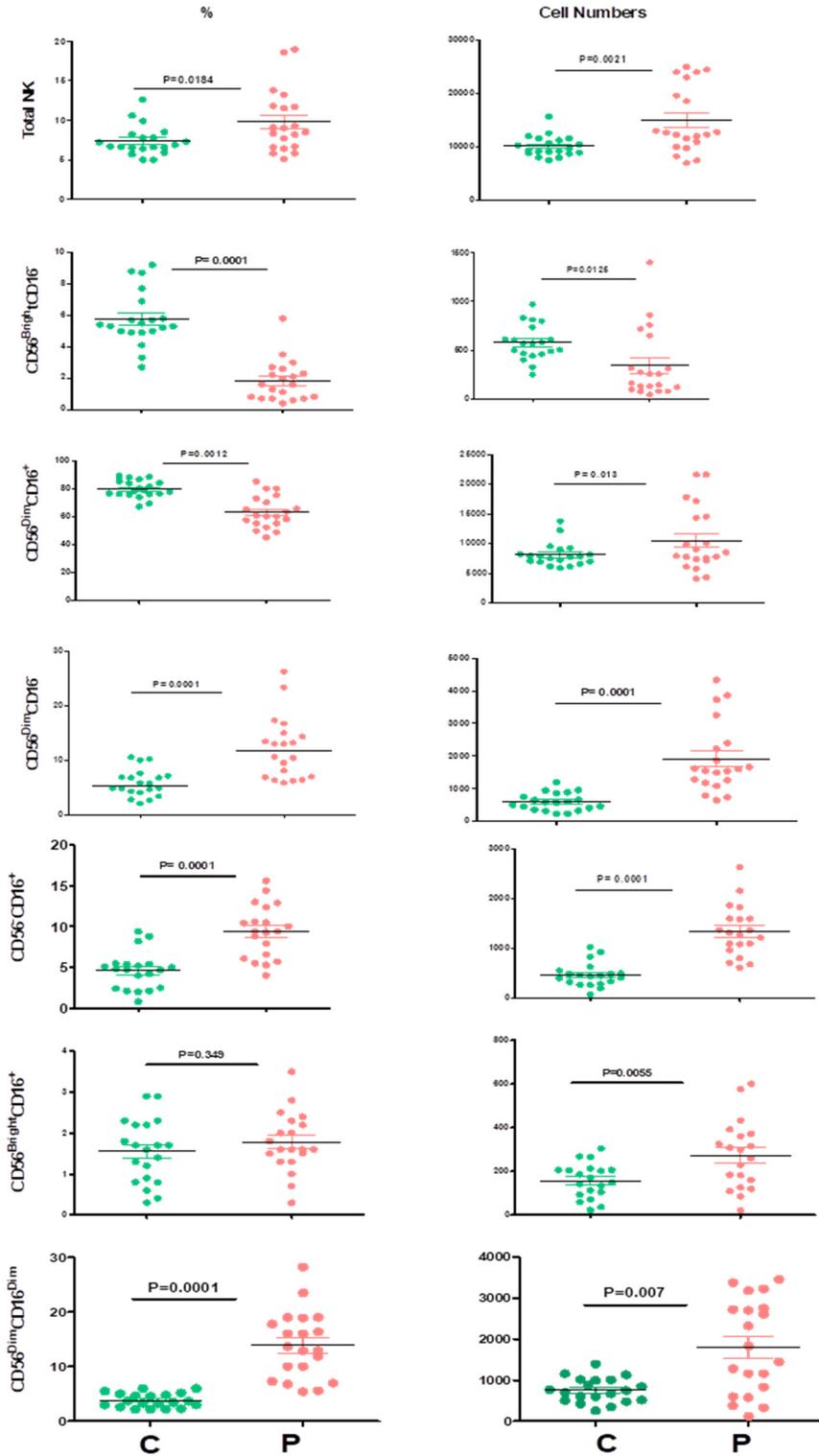
Figure 1.



A. Strategy for gating CD3-CD14-CD19- lymphocytes



B. Strategy for gating NK cell subsets



C. Percentages and numbers of NK cells

Figure 2. Expression of activating KIR on NK cells in CD patients and healthy controls.

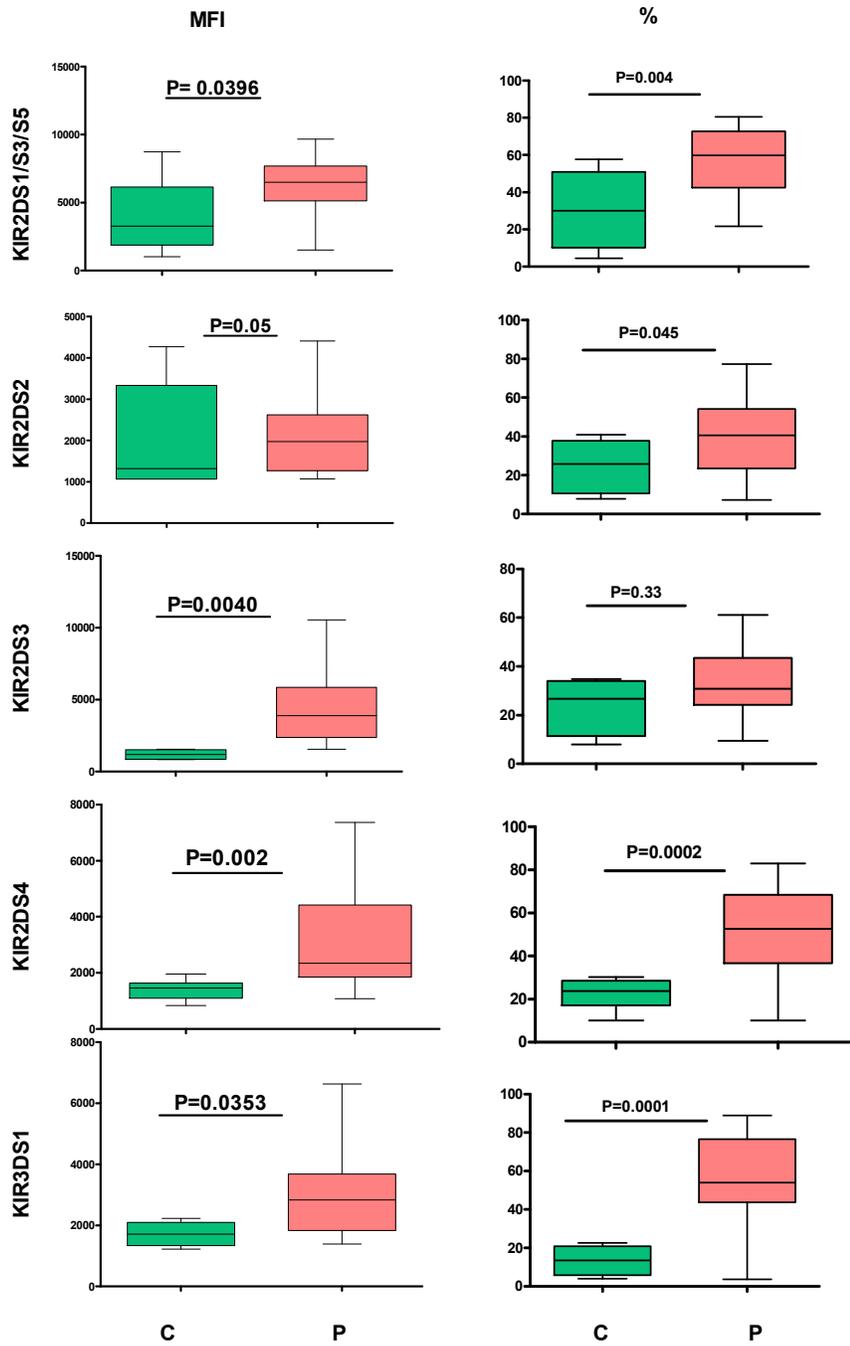


Figure 3. Expression of Inhibitory KIR on NK cells in CD patients and healthy controls.

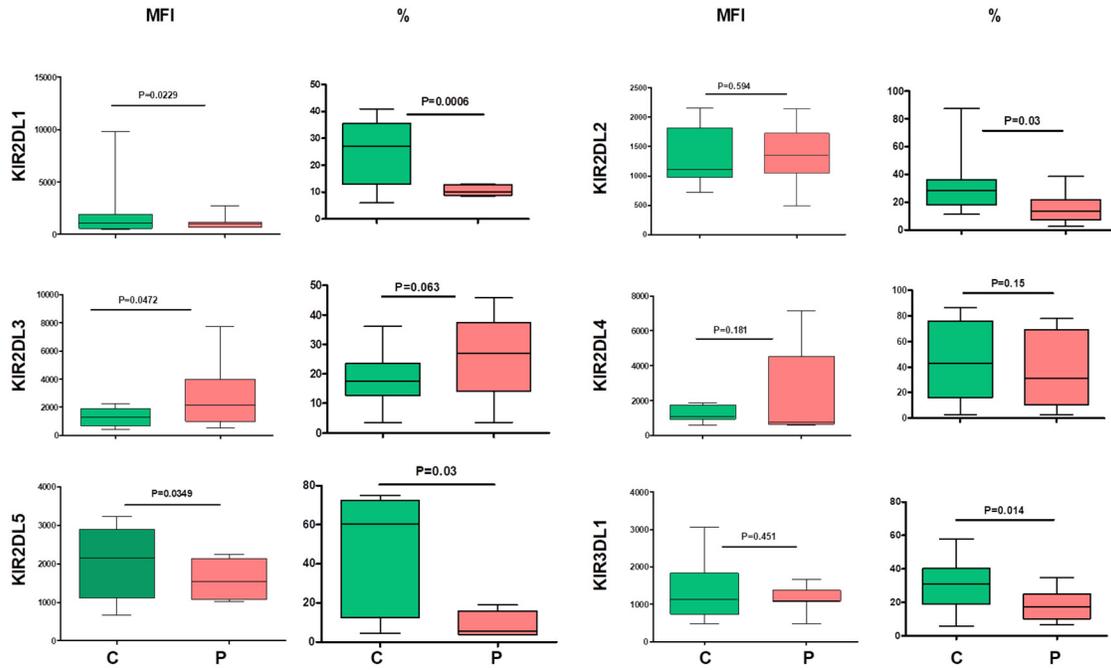


Figure 4. . Expression of non-KIR markers on NK cells in CD patients and healthy controls

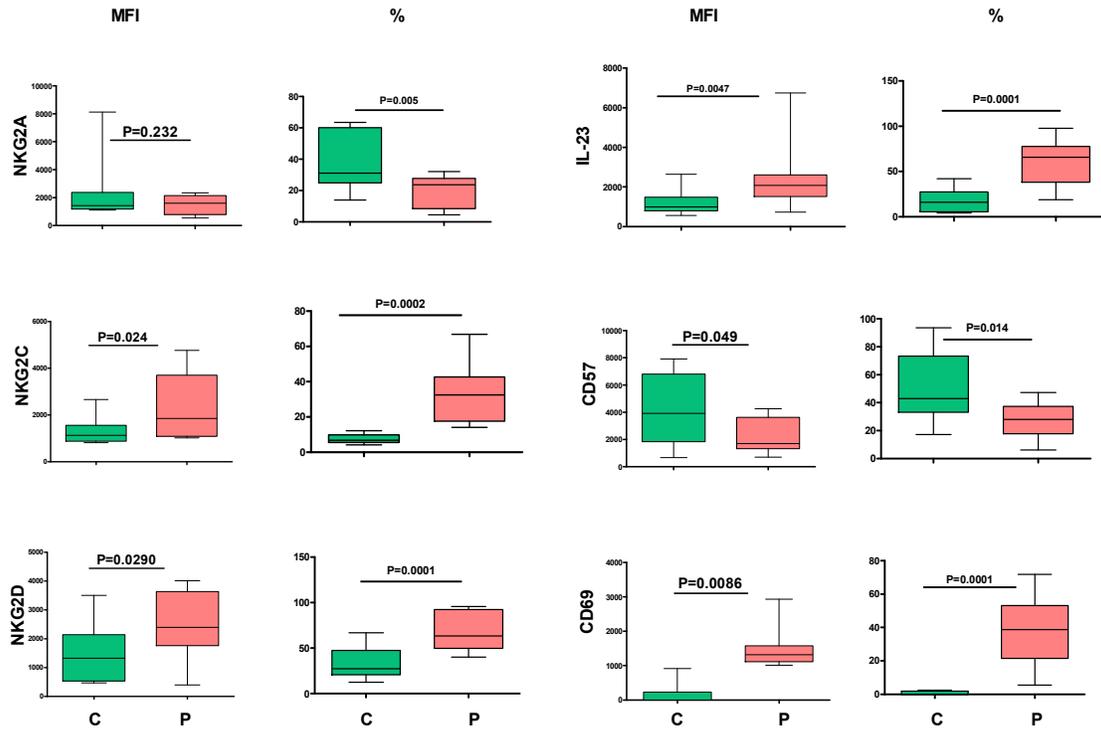


Figure 5. Expression of integrins on NK cells in CD patients and healthy controls.

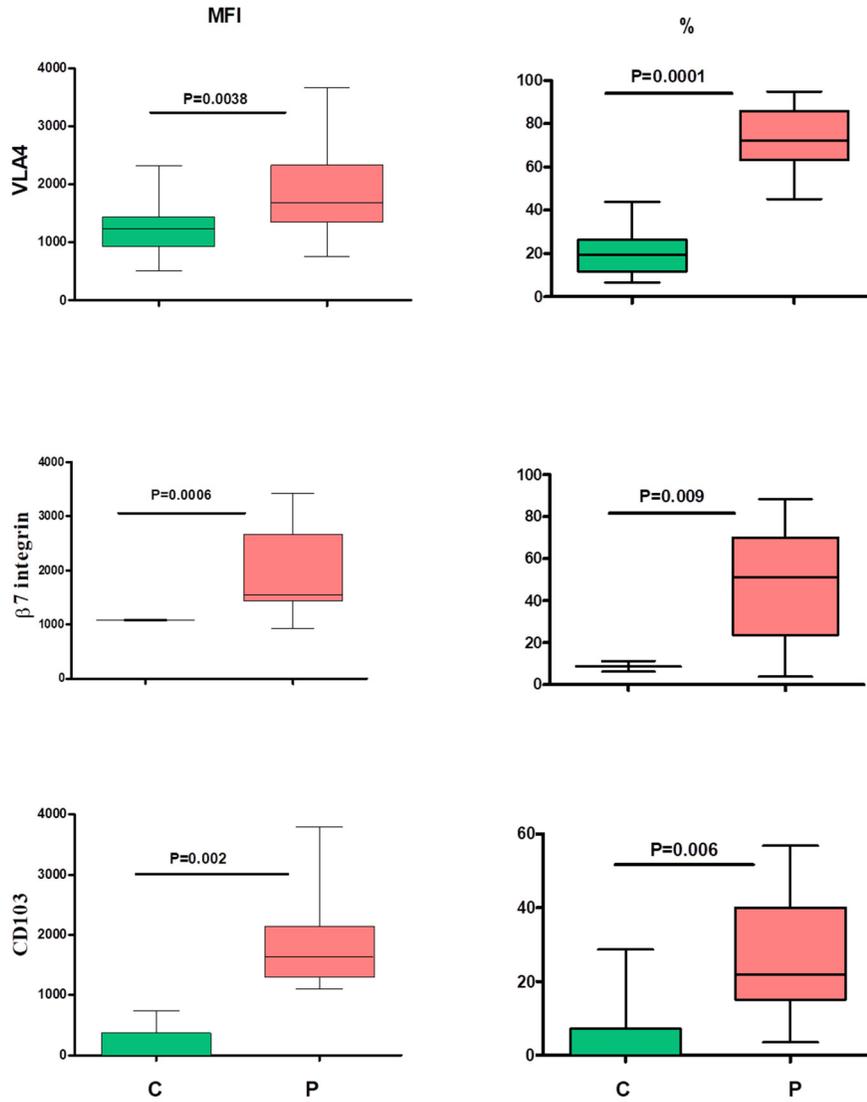


Figure 6. Expression of NKp46, NKp44 and CX3CR1 on NK cells in CD patients and healthy controls.

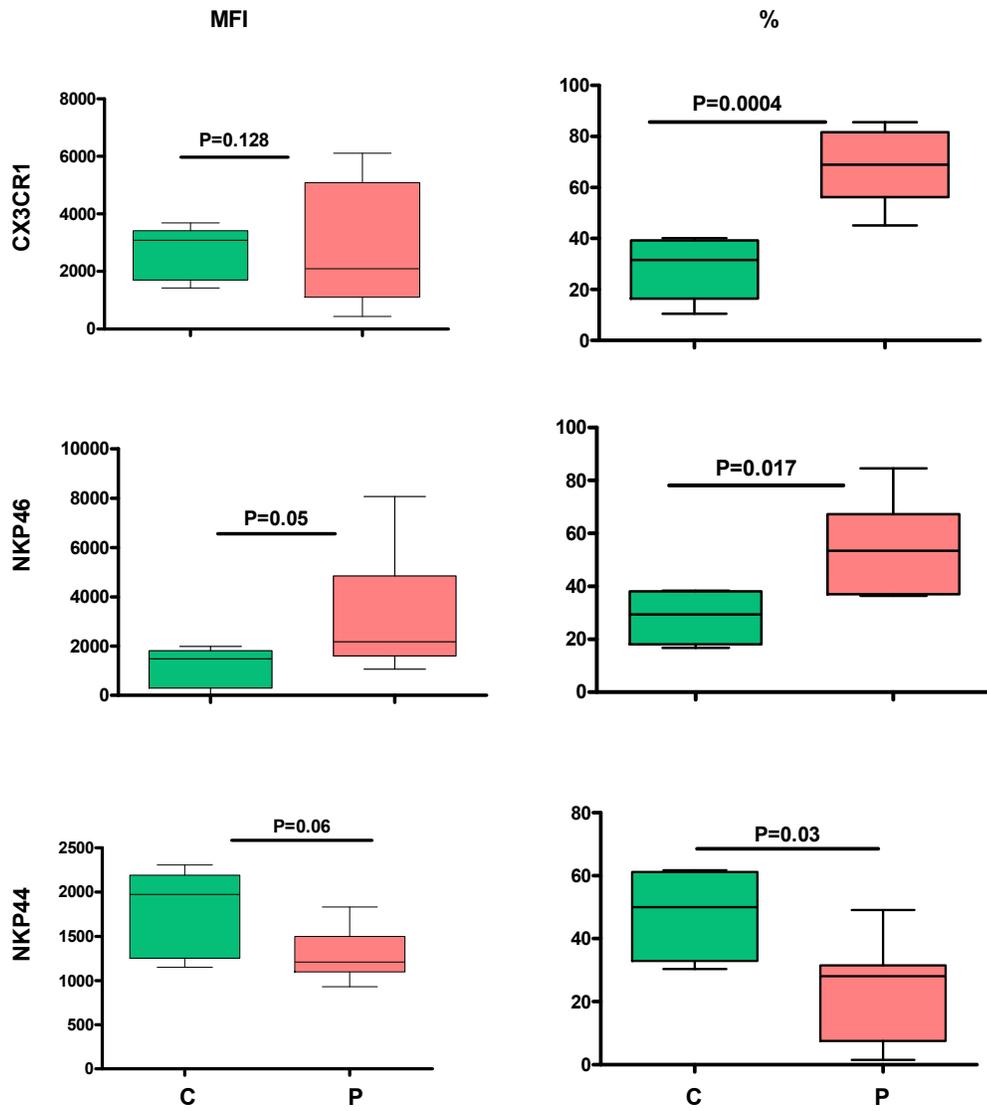
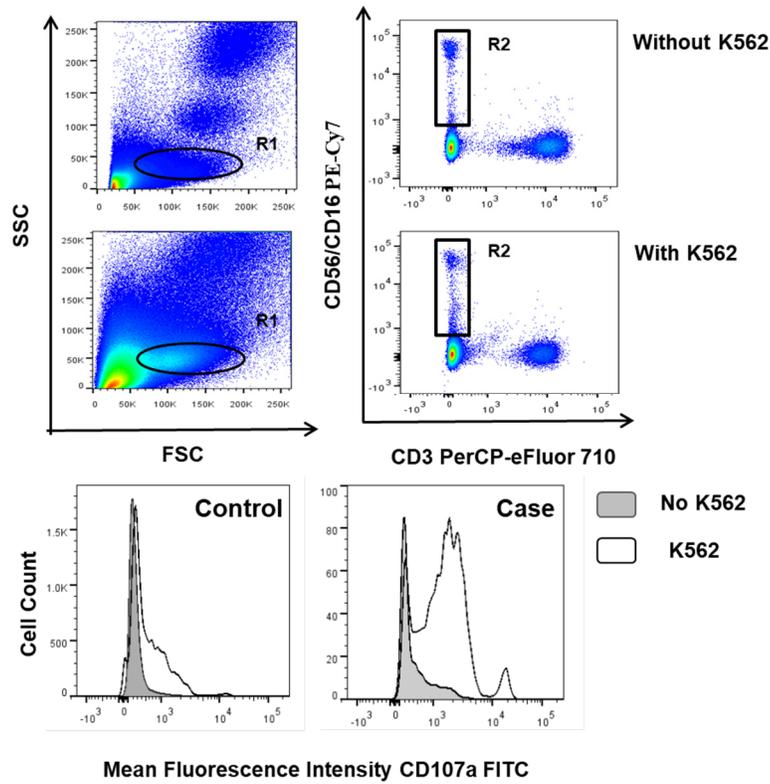
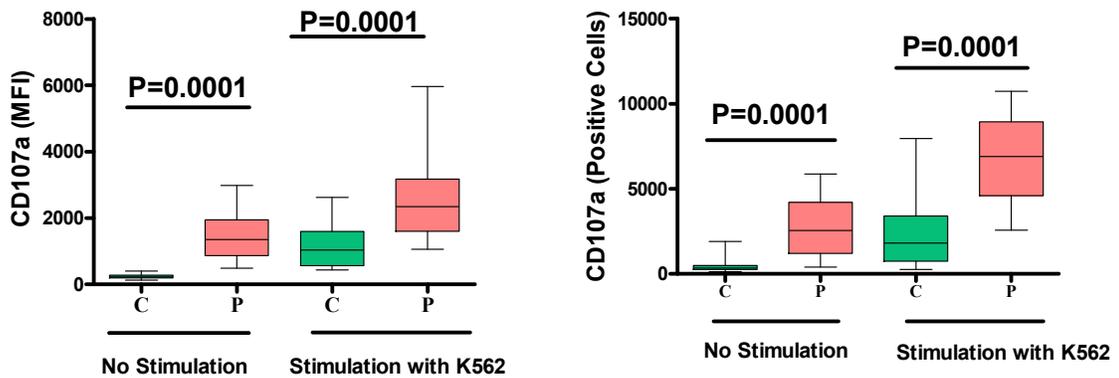


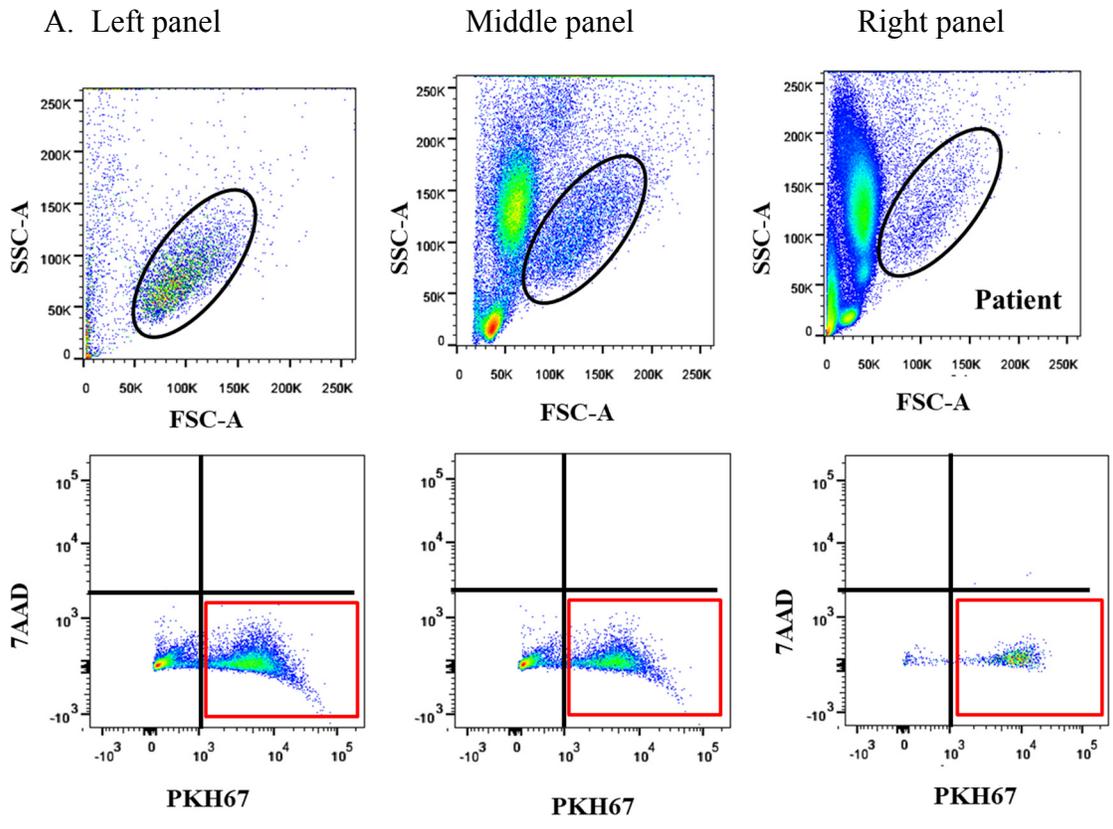
Figure 7. Expression of CD107a on NK cells with and without stimulation with K562 in CD patients and healthy controls.

A.



B.





B.

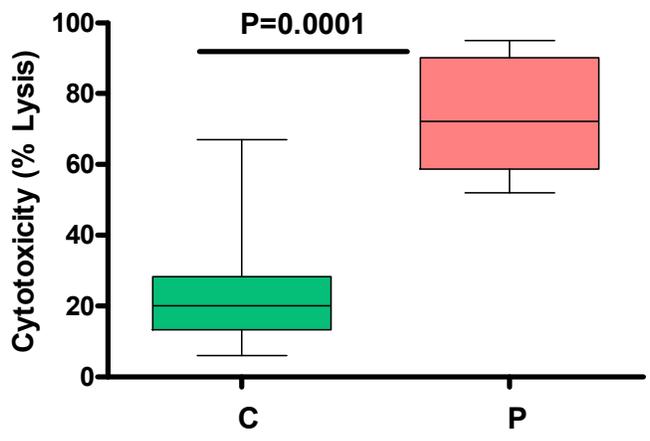


Figure 8. Cytotoxic potential of NK cells.

DISCUSSION

Dans ce projet de recherche, nous avons voulu étudier les associations potentielles des gènes KIRs activateurs avec la MC chez l'homme. Nos résultats (présentés ici dans l'article 1) révèlent des associations significatives de l'ensemble de ces gènes avec la maladie. L'héritage de ces gènes augmente le risque de développer la maladie chez les enfants aussi bien que chez les adultes. Il faut noter que la maladie présente de nombreuses similitudes et différences entre les enfants et les adultes (Sauer & Kugathasan 2010) qui peuvent résulter, au moins en partie, des différences dans la maturation de leur système immunitaire. Le système immunitaire chez les enfants est relativement immature et moins développé comparé à ceux des adultes. Il est également moins susceptible de devenir suractivé et autoagressif. Ceci est particulièrement vrai pour les cellules NK (Solano et al. 2014). Ces différences dans le système immunitaires se reflètent dans la gravité des maladies inflammatoires chroniques. Ce dernier devient plus mature et ceci en corrélation avec la croissance d'un enfant.

Il est intéressant de noter que l'ampleur des associations indiquées ici (évaluées par leurs valeurs de p) pour la plupart de ces gènes est comparable à des gènes (p. ex., NOD2 et IL23R) dont leurs associations avec la maladie a été précédemment signalée et qui étaient les gènes les plus fortement associés avec la MC (Ogura et al. 2001 ; Duerr et al. 2006). Les gènes KIRs n'ont pas été extrêmement étudiés dans le contexte de la MII. Il n'y a que quelques études qui ont investigués les associations entre les gènes KIRs et la susceptibilité / résistance de développer la MII. La première de ces études a rapporté une association significative de KIR2DS2 avec la CU chez les adultes caucasiens (Jones et al. 2006). Cette étude ne comprenait aucun patient atteint de la MC. Une étude ultérieure n'a pas révélé d'association entre aucun gène KIR inhibiteur ou activateur et la MC (Hollenbach et al. 2009). Bien que cette étude ait utilisé un grand nombre d'échantillons provenant d'une population mixte nord-américaine, l'étude a utilisé une méthode basée sur " le MALDI-TOF " (« Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight ») pour détecter les fréquences de ces gènes. Il convient de noter que de telles approches génétiques à haut débit pourraient se révéler moins utiles dans la détection des associations entre les KIRs et la maladie, en raison de la présence de centaines de variants alléliques de ces gènes KIR chez l'homme. En outre, le locus KIR

n'a pas été bien séquencé, assemblé chez l'homme. Une des meilleures approches pour étudier les associations des gènes KIRs avec la MC ou toutes autres maladies est celle des gènes candidats. Une autre étude menée par Wilson et al. (2010) sur une cohorte des caucasiens au Brésil composée de 137 patients souffrant de la MC et 250 individus en bonne santé et sans aucun lien de parenté a révélé des résultats significatifs de quelques interactions entre les gènes KIRs et leurs ligands HLA. Les auteurs ont suggéré que le déséquilibre entre les gènes KIR activateurs et inhibiteurs hérités peut être responsable du développement de cette maladie. Des conclusions similaires ont été proposées lors d'une étude récente (Díaz-Peña et al. 2016).

La discordance dans les résultats entre les différentes études rapportées ci-dessus peut être due à des différences dans les méthodes utilisées. Par exemple, l'utilisation des méthodes automatisées et multiplex le "MALDI-TOF", le "PCR" avec des amorces spécifiques et la sélection de différentes amorces spécifiques aux gènes peuvent affecter ces résultats. En outre, les différences dans la sélection des patients et les critères de la maladie dans les études peuvent également contribuer à la discordance observée. Les différences pourraient également résulter de l'hétérogénéité présente dans les populations. Par conséquent, la stratification de la population dans les cohortes étudiées est très importante pour faire des comparaisons valides (Behrens et al. 2011). Puisque les gènes KIR ont co-évolué avec les gènes HLA en réponse à la pression sélective de l'aptitude reproductive, des agents pathogènes, des maladies auto-immunes et du cancer (Manser et al. 2015 ; Parham et al. 2012), différentes populations ethniquement et géographiquement séparées ont différents répertoires et fréquences de gènes KIRs. Par exemple, les Japonais sont connus pour avoir une prépondérance des haplotypes A, l'inverse est vrai pour les Autochtones australiens alors que les caucasiens possèdent des proportions presque égales des haplotypes A et B (Yawata et al. 2002 ; Parham et al. 2012). De telles variations dans les fréquences de deux haplotypes des KIR chez différentes populations peuvent affecter les fréquences normales des gènes KIRs dans ces populations. Par conséquent, différents gènes KIR ont un impact à différents degrés sur différentes populations quant à leur résistance/susceptibilité de développer différentes maladies.

Dans notre étude, nous avons noté de très fortes associations entre des gènes KIR activateurs et la susceptibilité de développer la MC. De telles associations n'ont pas été

démontrées auparavant dans les études de GWAS (« genome-wide association studies »). Nous pensons que la raison en est l'extrême homologie dans les différents gènes et allèles des KIR qui limite l'utilisation des technologies à haut débit pour capturer adéquatement les variations dans ces gènes. Pour appuyer toutes ces observations, même dans le projet du génome 1000 (voir www.1000genomes.org), les technologies de séquençage à haut débit utilisées ont été incapables de capturer la région et l'annoter et l'assembler complètement. Alors, plusieurs séquences nulles (séquences incomplètes) des gènes KIRs ont été rapportées. Nous croyons donc que pour de telles régions, qui possèdent une forte homologie entre les gènes et les allèles qu'il héberge, les méthodes manuelles basées sur la " PCR " (comme celle que nous avons utilisée) sont très informatives.

Il a été bien documenté que les KIR inhibiteurs se lient aux antigènes du CMH de classe I. Chaque KIR reconnaît un épitope présent sur une sous-population des antigènes du CMH de classe I. Ces interactions entre les KIR inhibiteurs et leurs ligands HLA apparentés constituent la base de la tolérance des cellules NK envers le soi (Nash et al. 2014). Depuis longtemps, on sait que les cellules NK ne tuent pas les cellules autologues qui expriment les antigènes du CMH de classe I. Contrairement au KIR inhibiteur, les ligands spécifiques pour les KIR activateurs demeurent inconnus. Bien que quelques études ont démontré que ces récepteurs se lient à certains antigènes du CMH de classe I, ils le font toutefois avec une très faible affinité (Katz et al. 2001 ; Saunders et al. 2015). Leurs ligands sont inconnus et ne s'expriment pas sur les cellules saines et normales. Ils peuvent être exprimés sur les cellules qui ont une transformation maligne, avec des infections microbiennes, avec le stress ou dans des conditions inflammatoires. Alternativement, ils peuvent également reconnaître une molécule du CMH de classe I qui pourrait former un complexe avec un peptide exogène et non de soi (Saunders et al. 2015). Aussi il a été démontré que KIR2DS4, un KIR activateur, se lie à un ligand non-CMH et qui est exprimé par les cellules primaires du mélanome humain (Katz et al. 2004). Cependant, ce ligand n'a pas pu être identifié. Bien que, dans le passé, plusieurs études épidémiologiques aient suggéré que KIR3DS1 relie les allotypes HLA-Bw4* (avec une isoleucine à la position 80), malgré tous les grands efforts, aucun laboratoire n'a réussi à démontrer la liaison entre ce KIR activateur et des allotypes du HLA-Bw4* (O'Connor & McVicar 2013). Il a été récemment démontré que ce KIR se lie à des conformations ouvertes

de HLA-F, une molécule non classique de CMH classe I (Garcia-Beltran et al. 2016). Nos résultats suggèrent que les cellules épithéliales intestinales (CEI) chez les patients atteints de la MC sont très susceptibles d'exprimer des Ligands pour les KIRs activateurs. Il est probable que ces cellules peuvent les exprimer en raison de leur exposition à des cytokines pro-inflammatoires, des agents pathogènes ou des métabolites dérivés du microbiote intestinal. Il a été démontrée que l'expression des ligands pour les différents récepteurs activateurs des cellules NK est plus élevée sur les cellules épithéliales intestinales chez les patients atteints de la MC (Yadav et al. 2011 ; Vadstrup et al. 2017). Nos résultats suggèrent que cela peut être vrai dans le cas des ligands pour les KIR activateurs.

On remarque une augmentation des concentrations de plusieurs cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires dans la circulation et les intestins chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Neurath et al. 2014). Plusieurs agents pathogènes tels que *Mycobacterium johnei*, *Clostridium difficile* et d'autres sont considérés comme des agents responsables de la maladie. Dans tous ces cas, les CEI peuvent exprimer des ligands pour les KIRs activateurs et deviennent plus susceptibles à la mort médiée par les cellules NK. Étant donné que les gènes KIRs activateurs ont été associée à une susceptibilité /ou résistance à plusieurs maladies humaines (Łuszczek et al. 2004 ; Almate et al. 2011 ; Rajalingam 2011 ; Ivarsson et al. 2014), la découverte de ces ligands devrait être un domaine de recherche extrêmement prioritaire.

Les résultats de cette étude suggèrent que les KIRs activateurs peuvent servir comme nouvelles cibles moléculaires pour développer de nouvelle thérapie pour la maladie de Crohn. Comme ces récepteurs sont exprimés principalement à la surface des cellules, ils sont donc plus accessibles à des anticorps ou à des peptides autres que des protéines ciblées qui sont exprimés à l'intérieur des cellules, par exemple NOD2. Bloquer les interactions entre les KIRs activateurs et de leurs Ligands peut arrêter/retarder la pathogenèse de la maladie et réduire sa sévérité. Il y a deux possibilités : 1) des anticorps monoclonaux qui visent les KIRs activateurs pourraient être développés et utilisés et 2) des protéines recombinantes comprenant des régions extracellulaires des récepteurs activateurs fusionnés avec des régions Fc d'immunoglobuline comme suggéré par Czaja et al. (2014) pourraient être utilisés. La découverte des ligands pour ces récepteurs fournira des options supplémentaires.

Les gènes KIRs sont exprimés principalement à la surface des cellules NK et certaines populations des lymphocytes T (p. ex. cellules T stimulées par un antigène spécifique) (Mingari et al. 2000 ; Arlettaz et al. 2004). Cependant, dans certaines conditions pathologiques, ces derniers peuvent être exprimés par les lymphocytes T CD4⁺ (Van Bijnen et al. 2011). La démonstration d'une association significative entre les gènes KIRs activateurs et la maladie de Crohn, suggère fortement le rôle que les cellules NK jouent dans le développement de cette maladie. L'expression de ces récepteurs peut rendre les cellules NK plus agressive contre les cellules autologues. Alors, les cellules NK peuvent promouvoir l'inflammation par la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Elles peuvent également promouvoir la destruction tissulaire, en favorisant indirectement l'activité des lymphocytes T effectrices en éliminant les cellules T régulatrices (Tregs). Cependant, elles pourraient aussi promouvoir l'immunosuppression en tuant les lymphocytes T CD4⁺ et CTL (Popko et al. 2015). Cette dernière fonction empêcherait l'auto-immunité en maîtrisant une réponse immunitaire agressive contre les agents pathogènes. Pour ces raisons, il n'est pas surprenant qu'un rôle à double tranchant des cellules NK ait été proposé, à la fois protecteur et pathogénique, dans le développement des maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires chroniques chez les humains (Moretta & Moretta 2004 ; Johansson et al. 2005 ; Conigliaro et al. 2011 ; Poggi & Zocchi 2014). Dans le cas de la MC, il a été suggéré que les cellules NK jouent un rôle pathologique (Yao et al. 2011). Nos résultats supportent fortement ce rôle.

Une augmentation de la fréquence des gènes KIRs activateurs suggèrent également que les cellules NK chez les patients atteints de la MC peuvent exprimer ces récepteurs plus fréquemment. En raison de leur plus faible seuil d'activation, elles peuvent également être activées et plus cytotoxiques tout en les comparant aux cellules provenant des individus témoins en bonne santé. Pour étudier ces suggestions, nous avons comparé l'expression des KIR, de différents récepteurs non-KIR, des marqueurs d'activations et des intégrines sur les cellules NK du sang périphérique provenant des patients atteints de la MC et des individus témoins sains de même âges. Nous avons également effectué des études *in vitro* pour déterminer le potentiel cytotoxique et un historique des événements récents de dégranulation des cellules NK du sang périphérique provenant des patients et des sujets témoins sains. Nos

résultats démontrent une plus forte expression des récepteurs KIR activateurs sur les cellules NK des patients. De plus, ces cellules qui les expriment sont plus nombreuses comparé aux cellules provenant des témoins sains. Le nombre croissant des cellules NK exprimant les KIRs activateurs peut résulter simplement d'une augmentation de la fréquence des gènes KIR activateurs chez les patients atteints de cette maladie. L'expression à des niveaux plus élevés peut être le résultat des effets causés par une augmentation des concentrations de plusieurs cytokines pro-inflammatoires observées chez ces patients (Neurath, 2014). Il est remarquable, que plusieurs cytokines, telles que l'IL-2 et l'IL-15 augmentent l'expression des gènes KIR sur les cellules NK humaines (Sivori et al. 2003 ; de Rham et al. 2007). Bien que les facteurs qui induisent l'expression des KIR sur des cellules humaines ne soient pas bien connus, et il n'est pas compris comment les cytokines inflammatoires augmentent l'expression des KIRs activateurs et n'exercent pas le même effet sur l'expression des KIRs inhibiteurs. Il est bien connu que tous les gènes KIR qui sont hérités par un individu ne sont pas exprimés par chaque cellule NK chez cet individu. Leur expression est déterminée par des promoteurs doubles et bidirectionnels qui s'activent aléatoirement. Alors, ces gènes sont exprimés sur les cellules NK pendant leur développement de manière aléatoire et stochastique, de telle sorte que chaque cellule NK exprime seulement un sous-ensemble (en moyenne 1-3) des gènes KIR hérités (Yawata et al. 2008). Il est probable que les gènes KIR activateurs compétitionnent avec les inhibiteurs pour leur expression sur les cellules NK. D'autres études sont nécessaires pour en apprendre davantage sur l'aspect d'expression des gènes KIR chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

Il a été bien documenté que les fréquences élevées des gènes KIR activateurs et des gènes KIR inhibiteurs, qui codent pour des récepteurs avec une faible affinité pour leurs ligands apparentés de CMH classe I (p. ex. KIR2DL3), ont été associées à plusieurs maladies inflammatoires auto-immunes et des maladies chroniques inflammatoires humaines telles que l'arthrite psoriasique, la septicémie, la spondylarthrite ankylosante, le lupus érythémateux systémique, le T1D et l'autisme et *cetera*. Cependant, un tel schéma héréditaire protège contre les infections virales et les tumeurs malignes (Almalte et al. 2011 ; Tajik et al. 2011 ; Torres et al. 2012 ; Díaz-Peña et al. 2015 ; Hou et al. 2015 ; Oliveira et al, 2017 ; revu dans Rajalingam 2011 ; Ivarsson et al. 2014). Des profils héréditaires similaires des gènes KIR ont été

observés par certains chercheurs, mais non pas par d'autres, chez des patients atteints de la MII (revu dans Yadav et al. 2011). Les personnes qui héritent un nombre élevés de gènes KIRs activateurs et / ou des gènes KIR moins inhibiteurs, leurs cellules NK ont un seuil d'activation relativement plus fort et peuvent être activées par différents stimuli environnementaux tels que les infections microbiennes, les radiations, le stress et / ou certaines diètes. De telles cellules NK activées peuvent tuer des cellules autologues stressées (par exemple, CEI dans le cas des patients atteints de la MC), produisent plus de cytokines pro-inflammatoires et contribuent donc à la pathogenèse de la maladie. Ainsi, les cellules NK des patients atteints de cette maladie sont plus susceptibles d'être dans un état plus actif.

En ce qui concerne leur activation, nous avons constaté que les cellules NK du sang périphérique des patients atteints de la MC exprimaient le CD69 plus fréquemment que les celles des témoins sains. Le CD69 est une lectine de type C et s'exprime sous forme d'un homodimère lié par une liaison disulfure (s-s) à la surface des cellules. Il est exprimé à un stade très précoce sur les cellules NK et d'autres lymphocytes lors de leur activation par différents stimuli (Testi et al. 1994). Il est aussi l'un des tous premiers marqueurs exprimés sur les cellules NK lorsqu'elles sont stimulées par les cellules K562. Son expression corrèle avec celle du CD107a (un marqueur de dégranulation et de cytotoxicité des cellules NK) (Dons'koi et al. 2011). Le CD69 inhibe le fonctionnement du récepteur de sphingosine 1 phosphate (S1P) du type 1 (S1P1). Par conséquent, la sortie des lymphocytes du thymus, des ganglions lymphatiques et des tissus inflammés est inhibée. Le ligand spécifique pour CD69 est la galectine-1. Lors de l'interaction avec son ligand, CD69 induit la sécrétion des cytokines des cellules NK telles que l'IFN- γ (Cibrián & Sánchez-Madrid 2017). Une forte expression de CD69 sur les cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de la MC démontre qu'elles sont dans un état plus actif et sont plus susceptibles d'être retenus dans l'intestin enflammé et dans les structures lymphoïdes du tube digestif. Si les cellules NK existent à l'état semi-actif, cela signifie qu'elles n'ont pas besoin d'une activation préalable pour tuer les cellules cibles. Cependant, elles pourraient être dans un état plus actif et pourraient exprimer des niveaux plus élevés des médiateurs cytotoxiques et plusieurs récepteurs activateurs afin de reconnaître formellement les cellules cibles.

Nous avons, également, étudié l'expression de plusieurs récepteurs non KIR sur les cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de la MC. Conformément aux résultats concernant l'expression des KIR activateurs et inhibiteurs, nous avons trouvé une augmentation de l'expression des récepteurs activateurs non-KIR, NKG2C et NKG2D, mais une diminution de l'expression de NKG2A. NKG2C est un récepteur activateur appartenant à la famille NKG2 / CD94 (Lanier 1998 ; Long 1999 ; Iannello et al. 2008). Il reconnaît HLA-E, qui est une molécule peu polymorphique, et de HLA de classe I non classique. Il est à noter que les cellules NK (et T) qui expriment NKG2C se développent souvent chez les personnes infectées par le HCMV, même qu'aucun ligand spécifique pour ce récepteur, n'ait encore été reconnu (Rolle & Brodin 2016). La production des cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-15, IL-12 et IL-18, et les KIR activateurs jouent un rôle dans cette expansion. L'expression de NKG2C est également considérée comme un biomarqueur pour les cellules NK de type mémoire. Les interactions entre HLA-E, dont l'expression augmente à la surface des cellules infectés par le HCMV, et le NKG2C provoquent une expansion des cellules NKG2C⁺ chez les individus infectés par le HCMV. Les cellules NK qui sont NKG2C⁺ secrètent un taux plus élevé d'IFN- γ et de TNF- α comparé aux cellules NK NKG2C⁻. Il est à noter que ces cytokines sont impliquées dans la pathogenèse de cette maladie (Neurath et al. 2014). Nous ne savons pas si les patients à cette étude sont infectés par le HCMV. Il est tout à fait possible qu'un plus grand nombre de patients atteints de la MC puissent être infectés par ce virus comparé à des donneurs sains, ce qui entraînerait une expression plus élevée de ce récepteur sur leurs cellules NK. Par ailleurs, les cellules NK qui sont NKG2C⁺ peuvent simplement proliférer chez ces patients. Il serait souhaitable de savoir si les cellules NK qui sont NKG2C⁺ peuvent également proliférer chez les patients atteints de la MC, et qui ne sont pas infectés par le HCMV. Enfin Il serait également intéressant de savoir si ces cellules NK et/ou cellules T NKG2C⁺ contribuent à la pathogenèse de cette maladie

Le NKG2A est un récepteur inhibiteur de la famille de NKG2/CD94 et qui, comme NKG2C, se lie à HLA-E (Braud et al. 1998). Nous avons également observé une expression plus élevée de ce récepteur sur les cellules NK chez les patients atteints de la MC comparativement aux cellules provenant des témoins sains. Toutefois, on n'a pas observé aucune augmentation du nombre de cellules NK exprimant ce récepteur chez les patients

atteints de la MC. Ceci pourrait être causé par une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-21 observée chez les patients atteints de la MC. Cette cytokine induit une maturation fonctionnelle dans les cellules NK en induisant l'expression de NKG2C sur les cellules NK immatures (Brady et al. 2004 ; Liu et al. 2009). Les interactions entre NKG2A et HLA-E auraient pu empêcher la prolifération des cellules NK positives à NKG2A en raison de sa nature inhibitrice.

Le NKG2D est un récepteur activateur atypique appartenant à la famille NKG2/CD94 (Jelenčić et al. 2017). Il est atypique de plusieurs façons : il n'est pas exprimé en hétérodimère avec le CD94, contrairement aux autres membres de la famille. Au lieu de cela, il est exprimé comme homotetramère sur les cellules NK et CTL chez les humains. Ce récepteur ne se lie pas non plus à HLA-E. Il se lie plutôt à ce qu'on appelle ligands induits par le stress tels que MICA, MICB et ULBP-1-6 (El-Gazzar et al. 2013 ; Chen & Gyllensten 2014 ; Lanier 2015). Normalement, les cellules saines présentes dans le corps expriment rarement ces ligands. Cependant, ces ligands du NKG2D (NKG2DL) sont exprimés lorsqu'elles deviennent transformées, stressées ou subissent des dommages dans l'ADN. Les cellules du corps qui expriment NKG2DL, deviennent des cibles pour les cellules NK. Il a été démontré que les cellules épithéliales intestinales provenant des patients atteints de la MC expriment des niveaux plus élevés de ces ligands, aussi bien que le NKG2D sur leurs cellules, et ces cellules peuvent être ciblées dans cette maladie (La Scaleia et al. 2012). Il a été démontré que, puisque le CTL exprime le NKG2D, alors ces cellules activées sont capables de médier les activités fonctionnelles des cellules innées comme les cellules NK (Maccalli et al. 2009), et peuvent être impliquées dans la pathogenèse de la MC. Nos résultats sont conformes à ces observations antérieures. Il serait pertinent de mentionner ici que cibler les interactions entre NKG2D et NKG2DL avec un anticorps thérapeutique monoclonal présente un avantage clinique pour les patients atteints de la MC (Allez et al. 2016).

Le système IL23/IL-23R a été impliqué dans la pathogenèse de la maladie de Crohn. IL-23 est un hétérodimère formé de deux sous-unités p40 et p19 et elle partage la sous-unité p40 avec IL-12. Cette cytokine favorise l'activation et la maturation des cellules NK et la différenciation des cellules T en TH17. La contribution du système l'IL-23/IL-23R dans le développement de la maladie est appuyée par le fait que la perte de fonction des variants du

gène de l'IL-23R protège les humains contre la maladie (Sivanesan et al. 2016). Nos résultats démontrent une augmentation de l'expression de ce récepteur sur les cellules NK et sont conformes aux résultats rapportés précédemment par Liu et al. (2011). Les chercheurs ont également découvert une augmentation de l'expression de cette cytokine dans la circulation et le colon enflammé des patients atteints de la MC. Il faut noter que durant un récent essai clinique, le Risankizumab (un anticorps thérapeutique monoclonal), qui cible la sous-unité p19 de l'IL-23, s'est révélé cliniquement efficace contre la MC active (Feagan et al. 2017).

Le niveau d'expression de différentes intégrines telles que CD103 ($\alpha E\beta 7$), VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$) et $\beta 7$ est plus élevés sur les cellules NK du sang périphérique provenant des patients atteints de la MC par rapport à leur expression sur les cellules NK provenant des contrôles sains. Ces intégrines jouent un rôle important dans l'extravasation et l'hébergement des cellules NK (et d'autres lymphocytes) dans l'intestin et dans d'autres tissus (Peng & Tian 2014). Chaque intégrine est un hétérodimère formé de deux sous-unités (α et β). Le CD103, un hétérodimère de l' $\alpha E\beta 7$ et également connu sous le nom de « mucosal lymphocyte antigen-1 », joue un rôle important dans la migration et la rétention des lymphocytes dans l'intestin (Gahmberg et al. 2009). Il se lie à l'E-cadhérine qui est exprimée sur la surface basolatérale des cellules épithéliales intestinales. L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est un autre « gut-homing receptor » qui se lie à « Mucosal addressin cellular adhesion molecule-1 » (MadCAM-1), une molécule d'adhésion vasculaire qui dirige l'extravasation des lymphocytes vers la lamina propre intestinale. L'Etrolizumab est un anticorps thérapeutique monoclonal spécifique au $\beta 7$ qui inhibe le trafic de lymphocytes dans l'intestin en bloquant à la fois $\alpha 4\beta 7$ et CD103 ($\alpha E\beta 7$), car tous les deux contiennent des sous-unités $\beta 7$ dans leurs hétérodimères. Un autre anticorps thérapeutique monoclonal, le Vedolizumab, cible l'hétérodimère $\alpha 4\beta 7$ dans son ensemble, mais il est plus spécifique pour cet intégrine. Ces deux anticorps sont approuvés pour le traitement des patients atteints de la MII (Katsanos et Papadakis, 2017). L'intégrine VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$; CD49d-CD29) se lie à la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire («Vascular cell adhesion molecule-1 ou VCAM-1») qui est exprimée sur les cellules endothéliales vasculaires activées présente dans les tissus enflammés. Elle joue un rôle dans l'extravasation des lymphocytes dans les tissus. Un anticorps monoclonal thérapeutique humanisé, le Natalizumab, qui est approuvé pour le traitement des patients atteints de la MC, bloque cette

intégrine en ciblant sa sous-unité $\alpha 4$. Cependant, il bloque également l'extravasation des lymphocytes dans le cerveau via des cellules endothéliales vasculaires de la barrière hémato-encéphalique. Son utilisation dans le traitement de la MC et d'autres maladies inflammatoires se manifeste par le développement de la « Leucoencéphalopathie Multifocale Progressive » (PML : Zundler et al. 2017). Nos résultats suggèrent une augmentation de l'expression des intégrines sur les cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de la MC. Alors, cette expression est donc susceptible de favoriser la migration des cellules vers des sites enflammés dans l'intestin.

Nous avons déterminé des événements récents de la dégranulation et la cytotoxicité des cellules NK du sang périphérique. À cette fin, nous avons évalué de façon constitutive l'expression de CD107a à la surface des cellules NK dans le sang et aussi après leur stimulation "*in vitro*" avec des cellules K562, qui sont sensibles aux cellules NK, et les stimulent. Une forte expression de CD107a sur les cellules NK a été observée chez les patients atteints de la MC comparé aux cellules NK des témoins sains. L'augmentation de l'expression de cette molécule a également été détectée sur les cellules NK provenant des patients atteints de cette maladie et stimulées par les cellules K562 en comparaison aux cellules NK stimulées de manière similaire provenant des témoins sains. Le CD107a s'appelle également LAMP-1 (« Lysosome-associated membrane protein ») ou la protéine membranaire associée au lysosome). Elle est exprimée sur les membranes internes des lysosomes et des granules cytotoxiques dans les cellules NK et les CTL (Eskelinen et al. 2003). Lorsque ces cellules cytotoxiques subissent une dégranulation (en déclenchant la mise à mort des cellules cibles ou au moment de la sécrétion des cytokines), le CD107a est transféré vers la membrane cellulaire et reste là pendant quelques heures. Ainsi, le niveau d'expression de CD107a à la surface d'une cellule NK révèle le degré de la dégranulation et de la cytotoxicité (Alter et al. 2004). Une augmentation significative de l'expression de CD107a sur les cellules NK du sang périphérique provenant des patients atteints de la MC comparée aux contrôles sains suggère que les cellules de ces patients étaient plus actives que les témoins sains, quant à leur cytotoxicité et la sécrétion des cytokines. En outre, l'expression de CD107a sur les cellules NK stimulées par les K562 est en corrélation avec le potentiel cytotoxique des cellules NK. Comme mentionné ci-dessus, l'expression du CD107a corrèle aussi avec l'état d'activation (le

niveau d'expression de CD69) des cellules NK (Dons'koi et al. 2011). Également, une augmentation significative de l'expression de CD107a sur les cellules NK des patients atteints de la MC stimulées par les K562 comparé aux contrôles sains, a été bien identifiée. Cette observation suggère que les cellules des patients sont plus cytotoxiques. Ces résultats ont été confirmés dans les tests directs de cytotoxicité, dans lesquels le sang périphérique des patients a démontré une augmentation significative de la cytotoxicité contre les cellules K562 comparé au sang provenant des témoins sains. À notre connaissance, aucune étude n'a examiné jusqu'à présent l'expression de CD107a sur les cellules NK (ou la cytotoxicité) chez les patients atteints de la MC. Mise ensemble, nos données sur les cellules NK du sang périphérique suggèrent que ces cellules sont fortement activées et plus cytotoxiques chez les patients comparées aux cellules provenant de témoins sains. Cependant, une étude antérieure a rapporté que les cellules NK du sang périphérique des patients de la MC présentent une cytotoxicité inférieure à la normale en raison de la présence d'un facteur inhibiteur dans la circulation (Giacomelli et al. 1999). Cependant, le facteur n'a pas été identifié. Néanmoins, les mêmes auteurs, ont démontré que les cellules NK isolées provenant des patients n'avaient aucune défaillance dans leur cytotoxicité et avaient une cytotoxicité équivalente à celle des cellules NK provenant des sujets témoins sains (Giacomelli et al. 1999). Dernièrement, il a été démontré que les cellules NK isolées du sang périphérique des patients atteints de la MC étaient légèrement plus cytotoxiques lorsqu'elles étaient testées à l'état frais. Cependant, elles étaient beaucoup plus cytotoxiques après leur stimulation *in vitro* par IL-21 en les comparant à des cellules témoins traitées de la même manière (Liu et al. 2009). Il convient de noter que les concentrations de cette cytokine (IL-21) sont significativement plus élevées dans l'intestin et la circulation chez les patients atteints de cette maladie (De Nitto et al. 2010). La concentration accrue de cette cytokine et de plusieurs autres cytokines pro-inflammatoires observées dans la circulation ainsi que dans l'intestin des patients atteints de la MC (Neurath et al. 2014) est fortement susceptible d'augmenter le potentiel cytotoxique des cellules NK chez ces patients. Nos résultats sont donc conformes à ces observations. Notre étude a une limitation importante. Toutes nos expériences ont été effectuées sur des cellules provenant du sang périphérique et non sur des cellules mononucléaires isolées des tissus intestinaux. Il reste à voir si les cellules NK provenant des tissus intestinaux chez les patients atteints de la MC sont aussi activées et plus cytotoxiques comparées à leur homologues chez les individus en bonne santé.

Il est à noter que les cellules NK qui résident, et/ou s'infiltrant dans les tissus intestinaux (et d'autres) sont CD56^{high}CD16^{-/low} (Melgar et al. 2004 ; Chinen et al. 2007). Ces cellules sécrètent une concentration plus élevée des cytokines mais sont moins cytotoxiques par rapport au sous-ensemble CD56^{dim}CD16⁺ qui est la population prédominante (90%) du sang périphérique. Cependant, les cellules de la première sous-population (CD56^{high}CD16^{-/low}) deviennent aussi cytotoxiques que les celles des sous populations antérieures (CD56^{dim}CD16⁺) une fois qu'elles sont stimulées par des cytokines telles que IL-2 et IL-15 (Wilk et al. 2008). Étant donné que des niveaux accrus de plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont été décrits dans la circulation aussi bien que dans la lamina propria de l'intestin chez les patients atteints de la MC (Neurath 2014), il est très probable que les cellules NK présent dans l'intestin de ces patients acquièrent également un potentiel cytotoxique sous l'influence de ces cytokines. Cette notion est soutenue par deux études, qui ont démontré une augmentation du nombre des cellules NK avec des niveaux plus élevés de perforine dans les intestins enflammés des patients atteints de la MC, bien que les résultats sur leur potentiel cytotoxique étaient contradictoires (Melgar et al. 2004 ; Chinen et al. 2007). Malheureusement, plusieurs facteurs pourraient avoir confondu et affecté les résultats de ces études. Ces facteurs incluent la variabilité de l'activité de la maladie chez les patients, qu'ils aient une maladie active ou qu'ils soient en rémission, et leurs programmes de traitement. Plusieurs médicaments qui sont prescrits pour ces patients, tels que l'azathioprine, les corticostéroïdes et les différents produits biologiques affectent négativement le nombre et les fonctions des cellules NK présentes dans le corps (Van Ierssel et al. 1997 ; Orandi et al. 2017). En particulier, l'azathioprine induit l'apoptose dans les cellules NK immatures, inhibe la prolifération des cellules NK CD16⁺ et réduit leur potentiel cytotoxique (El-Azhary 2003 ; Steel et al. 2011). Par exemple, il a été démontré qu'il y a une augmentation du nombre des cellules NK CD16⁺ dans la lamina propria (LP) et le colon chez les patients atteints de la maladie de Crohn et elles sont très cytotoxiques. Cependant, lors de leur traitement par l'azathioprine, on remarque une diminution de leur nombres et leurs potentiels cytotoxiques (El-Azhary 2003 ; Steel et al. 2011 ; Orandi et al. 2017). Il est à noter qu'aucun des patients étudiés par Melgar et al. (2004) a démontré une cytotoxicité des cellules NK provenant de la LP et du colon, car tous étaient traités par de l'azathioprine et/ou la prednisolone. A propos des participants de notre étude, la

plupart d'entre eux étaient récemment diagnostiqués pour la MC ou étaient en rémission et ne recevaient que des anticorps anti-TNF α (tableau 1 de l'article 2 de la recherche).

En générale, nos résultats suggèrent que les fréquences des gènes KIR activateurs sont significativement plus élevées chez les patients atteints de la maladie de Crohn et leur risque pour la maladie est en corrélation positive avec le nombre de ces gènes hérités. Nos résultats montrent également une augmentation de l'expression de ces récepteurs sur les cellules NK du sang périphérique provenant de ces patients comparé aux cellules NK des témoins sains. En outre, nous démontrons également une augmentation de l'expression de plusieurs récepteurs activateurs non KIR et de « gut-homing intégrins » sur ces cellules provenant de ces patients atteints de la MC. Les cellules des patients atteints de la MC présentent également une augmentation du potentiel de cytotoxicité et de dégranulation comparé aux cellules provenant des témoins sains. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du statut d'activation et des activités cytotoxiques des cellules NK du sang périphérique provenant des patients qui ont la MC contribue à l'immunopathogénèse de cette maladie inflammatoire chronique. En plus de causer une destruction tissulaire par leur activité cytotoxique, les cellules NK peuvent également contribuer à la maladie de plusieurs autres manières. Elles peuvent produire une quantité accrue de cytokines pro-inflammatoires (telles que l'IFN- γ et le TNF- α et *cetera*), des chimiokines (telles que CCR2 et RANTES et *cetera*) et contribuer à l'inflammation intestinale. Comme discuté ci-dessus, elles peuvent également tuer les cellules Tregs et augmenter l'auto-agression par les cellules T et d'autres cellules immunitaires. Le blocage d'un ou plusieurs récepteurs activateurs des cellules NK peut atténuer la progression de la maladie comme il a été démontré dans l'inflammation cardiaque (Ong et al. 2017). Cependant, d'autres études sont nécessaires pour tester la pertinence d'une telle approche chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

CONCLUSION

Les conclusions tirées de la présente étude sont les suivantes :

Les gènes KIR activateurs sont associés de façon très significative au développement de la maladie de Crohn chez les Caucasiens canadiens, chez les enfants aussi bien que chez les adultes. Le nombre de ces gènes hérités est positivement corrèle avec le risque de développer cette maladie. Les cellules NK provenant du sang périphérique expriment des niveaux plus élevés de KIR activateur, ainsi qu'un plus grand nombre de cellules NK exprimant ces récepteurs chez les patients atteints de cette maladie comparé aux sujets sains. Les cellules expriment aussi un niveau plus élevé de certains marqueurs d'activation (CD69), des récepteurs activateurs non KIR (NKG2C et NKG2D) et « gut-homing » intégrines (CD103 et $\alpha4\beta7$). Le potentiel de cytotoxicité de ces cellules NK démontre une augmentation chez les patients.

Comme conclusion générale de cette étude, les cellules NK jouent un rôle crucial dans l'immunopathogénèse de la maladie de Crohn. Les résultats des associations entre les gènes KIR activateurs et la maladie sont significatives et en accord avec plusieurs autres études qui ont démontré que le répertoire des gènes KIR activateurs et/ou moins-inhibiteurs favorise un contrôle moins inhibiteur sur les cellules NK, est fortement relié à plusieurs maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques chez l'homme (Parham 2005 ; Lehuen et al. 2010 ; Rajalingam 2011 ; Ghannad et al. 2014). Une approche similaire plus élaboré devrait être utilisée pour étudier la fréquence des gènes inhibiteurs et les gènes qui codent pour leurs ligands du CMH de classe I (Lanier 1998 ; Ghannad et al. 2014). On pourrait aussi étudier les associations potentielles des variantes alléliques des gènes KIR avec cette maladie. Étant donné l'existence d'un grand nombre de telles variantes pour chaque gène KIR (en particulier pour les inhibiteurs, <https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>), il serait extraordinaire de relever le défi de collecter et de travailler avec des cohortes suffisamment larges qui permettraient d'obtenir des résultats avec plus de puissance. Étant donné que les fréquences de différents gènes KIR

varient d'une population humaine à l'autre, il est impératif que de telles études soient reproduites dans d'autres populations humaines de différentes ethnicités. Ces résultats suggèrent qu'on pourrait se servir des KIR activateurs comme nouvelles cibles moléculaires pour le développement des médicaments et guérir la maladie de Crohn. À cet égard, un ou plusieurs de ces récepteurs pourraient être ciblés. Cela pourrait être réalisé en utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques aux récepteurs, les régions extracellulaires solubles des récepteurs et/ou des peptides mimétiques de ces régions. En effet, des études expérimentales ont déjà montré que le blocage des KIR inhibiteurs favorise la regression de certains cancers établis (Binyamin et al. 2008 ; Benson et al. 2011). Malheureusement, des études axées sur les KIR ne pourraient pas être réalisées dans des modèles d'animaux tels que les souris, car cette espèce ne possède pas, dans son génome, des gènes KIR fonctionnels (Long et al. 1997). Cependant, des souris transgéniques qui expriment certains KIR humains et les gènes HLA ont été développés et pourraient être utiles pour de telles études avec certaines améliorations supplémentaires (van Bergen et al. 2013). Par exemple, des souris transgéniques qui expriment un KIR particulier devraient également être transgéniques pour le gène qui code pour son ligand. Malheureusement, les ligands pour la plupart des KIR activateurs ne sont pas connus. De telles études concernant les gènes KIR activateurs devraient attendre jusqu'à ce que leurs Ligands soient connus

Dans la présente étude, nous avons également montré que les cellules NK provenant des patients atteints de la MC sont plus activées. Ceci, est dû à l'expression d'un marqueur d'activation précoce, le CD69 (Testi et al. 1994 ; Dons'koi et al. 2011). De plus, les cellules des patients atteints de la MC expriment plusieurs autres récepteurs activateurs non-KIR tels que NKG2D et NKG2C à des niveaux significativement plus élevés que ceux des cellules de témoins sains. Il est à noter que NKG2D cible les protéines induites par le 'stress' comme MIC-A, MIC-B and ULBP1-6 (El-Gazzar et al. 2013). Normalement, ces ligands pour le NKG2D (NKG2DL) ne sont pas exprimés sur les cellules normales, mais ils le sont lors d'une infection microbienne, de dommage à l'ADN et de stress inflammatoires et *cetera*. Le point pertinent ici : les cellules épithéliales intestinales (CEI) dans l'intestin des patients atteints de la MC expriment des NKG2DL (La Scaleia et al. 2012). Les cellules NK présentes dans le lamina propria de l'intestin (et d'autres lymphocytes tels que les lymphocytes intra-intestinaux)

qui expriment probablement NKG2D ciblent et tuent les CEI chez les patients de la MC. Il est bien connu que les gènes MIC-A et MIC-B sont hautement polymorphiques (Chen & Gyllensten 2014 ; Lanier 2015). Ce polymorphisme pourrait également affecter la susceptibilité de l'hôte à la cytotoxicité de cellules NK via NKG2D. Les prochaines études devraient aborder cette question. Le récepteur activateur, NKG2C est exprimé à des niveaux plus élevés sur les cellules NK chez les patients atteints de la MC et pourrait également être impliqué dans la mort des CEI chez ces patients. Ce récepteur activateur reconnaît le HLA-E, un antigène du CMH de classe I non classique qui présente peu de polymorphisme (Kraemer et al. 2014). Il serait désirable d'étudier l'expression de ce Ligand pour NKG2C sur les CEI dans l'intestin des patients atteints de la maladie. Les interactions NKG2C / HLA-E pourraient être une autre cible pour soulager l'inflammation dans cette maladie.

L'expression plus élevée de CD103 et $\alpha 4\beta 7$, deux molécules d'intégrine qui favorisent « l'homing » des lymphocytes à l'intestin (Gahmberg et al. 2009 ; Peng & Tian 2014), suggèrent que les cellules NK du sang périphérique chez les patients atteints de la MC ont préférentiellement extravasé et résident dans les intestins. Ces molécules sont déjà ciblées chez des patients atteints de la maladie avec des anticorps monoclonaux spécifiques.

L'augmentation du potentiel cytotoxique des cellules NK chez les patients atteints de la MC suggère que les cellules NK peuvent contribuer à l'immunopathogenèse de la maladie en tuant les CEI. Pour confirmer cela, des études expérimentales devraient être effectuées chez des souris avec une délétion spécifique du gène perforine dans les cellules NK. Cependant, les cellules NK pourraient également contribuer à l'inflammation en sécrétant plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α , et *cetera*. (Wilk et al. 2008). Des études ultérieures devraient investiguer la capacité de sécrétions des cytokines par les cellules NK chez ces patients versus les témoins sains.

Enfin, nous avons effectué des études fonctionnelles concernant les cellules NK présentes dans le sang périphérique. Bien que ces cellules NK extravasent et migrent vers l'intestin, leurs caractéristiques fonctionnelles peuvent changer dans le microenvironnement intestinal. Des études futures devraient être effectuées sur les cellules NK qui résident dans l'intestin des patients pour confirmer ces résultats.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham C, Cho J. Inflammatory bowel disease. *New Engl J Med.* 2009; 361:2066-2078.

Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, Hang T, Galannie J, Landers CJ et al. Mutations in NOD 2 are associated with fibrostenotic disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 679-88.

Ahlfors H, Morrison PJ, Duarte JH, Li Y, Biro J, Tolaini M et al. IL-22 fate reporter reveals origin and control of IL-22 production in homeostasis and infection. *J Immunol.* 2014 Nov1; 193(9):4602-13. doi:10.40/jimmunol.1401244

Ahmad A, Menezes J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J.* 1996 Feb; 10(2): 258-66.

Al-Hawary M, Zimmermann EM. A new look at Crohn's disease: novel imaging techniques. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012 Jul; 28(4): 334-40. doi:10.097/MOG.0b13e3283540705

Allez M, Skolnick BE, Wisniewska-Jarosinska M, Petryka R, Overgaard RV. Anti-NKG2D monoclonal antibody (NNC0142-0002) in active Crohn's disease: a randomised controlled trial. *Gut* 2016 Aug 3. Pii: gutjnl-2016-311824. Doi: 10.1136/gutjnl-2016-311824

Almalte Z, Samarani S, Iannello A, Debbeche O, Duval M, Infante-Rivard C et al. Novel associations between activating killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and childhood leukemia. *Blood.* 2011 Aug 4; 118(5):1323-8. Doi: 10.1182/blood-2010-10-313791.

Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 2004, 294: 15-22.

Alves de Medeiros AK, Lodewick E, Bogaert DJA, Haerynck F, Van Daele S, Lambrecht B, et al. Chronic and invasive fungal infections in a family with CARD9 deficiency. *J Clin Immunol* 2016; 36: 204-209.

Ananthkrishnan A. Environmental triggers for inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2013; 15:302. Doi: 10.1007/s11894-012-0302-4.

Ananthakrishnan A. Epidemiology and risk factors for IBD. *Gastroenterol Hepatol.* 2015, 12: 205-217.

Andrews DM, Smyth MJ. A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny. *Immunol Cell Biol.* 2010 Feb; 88(2):107-16. Doi: 10.1038/icb.2009.94

Arlettaz L, Degermann S, De Rham C, Roosnek E, Huard B. Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. *Eur J Immunol.* 2004 Dec; 34(12):3413-22.

Barber DF, Faure M, Long EO. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol.* 2004 Sep 15 ; 173(6):3653-9.

Barral M, Dohan A, Allez M, Boudiaf M, Camus M, Laurent V, et al. Gastrointestinal cancers in inflammatory bowel disease: An update with emphasis on imaging findings. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2015, 97:30-46; doi : 10.1016/j.critrevonc.2015.08.005.

Baumgart DC et Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012; 380 (9853):1590-1605.

Beattie R, Croft N, Fell J, Afzal N, Heuschkel R. Inflammatory bowel disease. *Arch Dis Child.* 2006; 91(5):426-32. doi:10.1136/adc.2005.080481

Behrens G, Winkler TW, Gorski M, Leitzmann MF, Heid IM. To stratify or not to stratify: power considerations for population-based genome-wide association studies of quantitative traits. *Genet Epidemiol.* 2011; 35(8):867-79. Doi: 10.1002/gepi.20637.

Benchimol E, Fortinsky K, Gozdyra P, Van Den Heuvel M, Van Limbergen J, Griffiths A. Epidemiology of pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review of international trends. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17:423-439.

Benson DM Jr, Bakan CE, Zhang S, Collins SM, Liang J, Srivastava S et al. IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect. *Blood.* 2011; 118(24):6387-91. Doi: 10.1182/blood-2011-06-360255

Bernstein CN, Wajda A, Svenson LW, Mackenzie A, Jackson M, Fedorak R, et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1559-68.

Best WR, Becketl JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology*. 1976 Mar; 70(3):439-44.

Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol*. 2008 May 1; 180(9):6392-401.

Bousvaros A, Sylvester F, Kugathasan S, Szigethy E, Fiocchi C, Colletti R, et al. Challenges in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12:885-913.

Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol*. 2004 Feb 15;172(4):2048-58.

Brandsma AM, Jacobino SR, Meyer S, ten Broeke T, Leusen JH. Fc receptor inside-out signaling and possible impact on antibody therapy. *Immunol Rev*. 2015 Nov; 268(1): 74-87. Doi: 10.1111/imr.12332.

Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, Ogg GS et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 1998 Feb 19; 391(6669):795-9.

Brown D, Trowsdale J, Allen R. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens*. 2004 Sep; 64(3):215-25

Brusilovsky M, Cordoba M, Rosental B, Hershkovitz O, Andrade MD, Pecherskaya A et al. Genome-wide siRNA screen reveals a new cellular partner of NK cell receptor KIR2DL4: heparan sulfate directly modulates KIR2DL4-mediated responses. *J Immunol*. 2013 Nov 15; 191(10):5256-67. Doi: 10.4049/jimmunol.1302079.

Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*. 2008; 40(1):18-34. Doi: 10.1007/s12026-007-0060-9.

Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol.* 2013; 29: 357-362.

Capone M, Bryant JM, Sutkowski N, Haque A. Fc Receptor-Like Proteins in Pathophysiology of B-cell Disorder. *J Clin Cell Immunol.* 2016 Jun; 7(3). pii: 427.

Cătană CS, Neagoie IB, Cozma V, Magdaş C, Tăbăran F, Dumitraşcu DL. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2015, 21: 5823-5830.

Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JK et al. A human natural killer subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457:722-5.

Cella M, Longo A, Ferrara GB, Strominger JL, Colonna M. NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med.* 1994 Oct 1 ; 180(4): 1235-42.

Chacon O, Bermudez LE, Barletta RG. Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu Rev Microbiol.* 2004; 58:329–63.

Chazara O, Xiong S, Moffett A. Maternal KIR and fetal HLA-C: a fine balance. *J Leukoc Biol.* 2011 Oct; 90(4):703-16. Doi: 10.1189/jlb.0511227.

Chen D, Gyllenstein U. MICA polymorphism: biology and importance in cancer. *Carcinogenesis.* 2014 Dec; 35(12):2633-42. Doi: 10.1093/carcin/bgu215

Chinen H, Matsuoka K, Sato T, Kamada N, Okamoto S, Hisamatsu T et al. Lamina propria c-kit⁺ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. *Gastroenterology.* 2007 Aug; 133(2):559-73.

Chiriac MT, Mahapatro M, Neurath MF, Becker C. The Microbiome in Visceral Medicine: Inflammatory Bowel Disease, Obesity and Beyond. *Visc Med.* 2017 May; 33(2):153-162. Doi: 10.1159/000470892.

Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017 Jun; 47(6):946-953. Doi: 10.1002/eji.201646837.

Conigliaro P, Scrivo R, Valesini G, Perricone R. Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies. *Autoimmun Rev.* 2011; 10, 577-81.

Cornick S, Tawiah A, Chadee K. Roles and regulation of the mucus barrier in the gut. *Tissue Barriers.* 2015 Apr 3; 3(1-2):e982426. Doi: 10.4161/21688370.2014.982426. eCollection 2015.

Cornish J, Tan E, Simillis C, Clark SK, Teare J, Tekkis PP. The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2008. 103:2394-2400.

Corridoni D, Arseneau KO, Cominelli F. Inflammatory bowel disease. *Immunol Lett.* 2014; 161(2):231-5. Doi: 10.1016/j.imlet.2014.04.004.

Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* May; 140(6):1785-94. Doi: 10.1053/j.gastro.2011.01.055.

Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest.* 2013; 123:700-11.

Czaja K, Borer AS, Schmied L, Terszowski G, Stern M, Gonzalez A. A comprehensive analysis of the binding of anti-KIR antibodies to activating KIRs. *Genes & Immunity* 2014; 16, 33-37.

De Cruz P, Kamm M, Prideaux L, Allen P, Moore G. Mucosal healing in Crohn's disease: a systematic review. *Inflamm Bowel Dis.* 2013; 19:429-444.

De Nitto D, Sarra M, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-21 triggers effector cell responses in the gut. *World J Gastroenterol.* 2010 Aug 7; 16(29):3638-41.

de Rham C, Ferrari-Lacraz S, Jendly S, Schneiter G, Dayer JM, Villard J. The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9(6):R125.

Di Sabatino A, Rovedatti L, Vidali F, Macdonald T, Corazza G. Recent advances in understanding Crohn's disease. *Intern Emerg Med.* 2013; 8:101-113.

Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Mulero J, Sánchez A, Queiro R, López-Larrea C. Activating killer immunoglobulin-like receptors genes are associated with increased susceptibility to ankylosing spondylitis. *Clin Exp Immunol*. 2015 May; 180(2):201-6. doi: 10.1111/cei.12568.

Díaz-Peña R, Vidal-Castiñeira JR, Moro-García MA, Alonso-Arias R, Castro-Santos P. Significant association of the KIR2DL3/HLA-C1 genotype with susceptibility to Crohn's disease. *Hum Immunol*. 2016 Jan; 77(1):104-9. doi: 10.1016/j.humimm.2015.10.020.

Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, Duhaimé A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF-alpha and IL-1 beta mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci*. 1997 Jul; 42(7):1557-66.

Dons'koi BV, Chernyshov VP, Osypchuk DV. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J Immunol Methods*. 2011 Sep 30; 372(1-2):187-95. Doi: 10.1016/j.jim.2011.07.016.

Dougall WC, Kurtulus S, Smyth MJ, Anderson AC. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2017 Mar; 276(1):112-120. Doi: 10.1111/imr.12518.

Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ et al. A genome-wide association study identifies IL-23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314: 1461-3.

Economou M, Pappas G. New global map of Crohn's disease: Genetic, environmental, and socioeconomic correlations. *Inflamm Bowel Dis*. 2008 May; 14(5):709-20.

El-Azhary RA. Azathioprine: current status and future considerations. *Int J Dermatol*. 2003 May; 42(5):335-41

El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol*. 2013 Aug 15; 191(4):1509-15. Doi: 10.4049/jimmunol.1301071.

Elliott JM, Yokoyama WM. Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32 (8):364-72. Doi: 10.1016/j.it.2011.06.001.

Eskelinen EL, Tanaka Y, Saftig P. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 2003 Mar;13 (3):137-45.

Eszter-Müller K, Laszlo-Lakatos P, Papp M, Veres G. Incidence and Paris classification of pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Res Pract.* 2014; 2014:904307. doi: 10.1155/2014/904307.

Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA. Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood.* 2002, 100: 1935-1947.

Feagan BG, Sandborn WJ, D'Haens G, Panés J, Kaser A, Ferrante M et al., Induction therapy with the selective interleukin-23 inhibitor risankizumab in patients with moderate-to-severe Crohn's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet.* 2017 Apr 29; 389(10080):1699-1709. Doi: 10.1016/S0140-6736(17)30570-6.

Fedorak RN, Wong K, Bridges R. Canadian Digestive Health Foundation Public Impact Series. Inflammatory bowel disease in Canada: Incidence, prevalence, and direct and indirect economic impact. *Can J Gastroenterol.* 2010 Nov; 24(11):651-5

Feller M, Huwiler K, Stephan R, Altpeter E, Shang A, Furrer H, et al. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007, 7:607-613.

Fina D, Pallone F. What is the role of cytokines and chemokines in IBD? *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Oct; 14 Suppl 2:S117-8. Doi: 10.1002/ibd.20677.

Fiocchi, C. Susceptibility genes and overall pathogenesis of inflammatory bowel disease: where do we stand? 2009. *Dig Dis.* 27:226-235.

Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2012, 5: 354-366.

Fraquelli M, Sarno A, Girelli C, Laudi C, Buscarini E, Villa C et al. Reproducibility of bowel ultrasonography in the evaluation of Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2008 Nov; 40(11):860-6. Doi: 10.1016/j.dld.2008.04.006.

Franke A, McGovern D, Barrett JE. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet.* 2010; 42:1118-1125.

Fraschilla I, Pillai S. Viewing Siglecs through the lens of tumor immunology. *Immunol Rev.* 2017 Mar; 276(1):178-191. Doi: 10.1111/imr.12526

Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol. Rev.* 2006, 214: 56–72.

Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology.* 2014 Apr ; 141(4) :483-9. Doi : 10.1111/imm.12224.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, et al. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol.* 1996; 157:1261-1270.

Gahmberg CG, Fagerholm SC, Nurmi SM, Chavakis T, Marchesan S, Grönholm M. Regulation of integrin activity and signalling. *Biochim Biophys Acta* 2009 Jun; 1790(6):431-44. Doi: 10.1016/j.bbagen.2009.03.007.

Garcia-Beltran WF, Hölzemer A, Martrus G, Chung AW, Pacheco Y, Simoneau CR et al. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol.* 2016 Sep; 17(9):1067-74. Doi:10.1038/ni.3513.

Geboes K, Colombel JF, Greenstein A, Jewell DP, Sandborn WJ, Vatn MH et al. Pathology Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Diseases. Indeterminate colitis: a review of the concept--what's in a name? *Inflamm Bowel Dis.* 2008 Jun;14(6):850-7. Doi: 10.1002/ibd.20361.

Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun Rev.* 2014 Jan;13(1):3-10. doi: 10.1016/j.autrev.2013.06.004

Ghannad MS, Hajilooi M, Solgi G. HLA-KIR interactions and immunity to viral infections. *Res Mol Med.* 2014; 2(1): 1-20.

Giacomelli R, Passacantando A, Frieri G, Parzanese I, D'Alò S, Vernia P et al. Circulating soluble factor-inhibiting natural killer (NK) activity of fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from inflammatory bowel disease (IBD) patients. *Clin Exp Immunol.* 1999 Jan;115(1):72-77.

Halme L, Paavola-Sakki P, Turunen UE. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:3668-3672.

Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K et al. A genome wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn's disease in ATG-16L1. *Nat. Genetics* 2007; 39:207-11.

Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 2009 Jan 15; 122(Pt 2):159-63. Doi: 10.1242/jcs.018093.

Hiby SE, Reagan L, Lo W, Farrell L, Carrington M, Moffett A. Association of maternal killer-cell immunoglobulin-like receptors and parental HLA-C genotypes with recurrent miscarriage. *Hum. Reproduction* 2008; 23:972-6.

Hollenbach JA, Ladner MB, Saetern K, Taylor KD, Mei L, Haritunians T et al. Susceptibility to Crohn's disease is mediated by KIR2DL2/KIR2DL3 heterozygosity and the HLA-C ligand. *Immunogenetics.* 2009 Oct; 61(10):663-71. Doi: 10.1007/s00251-009-0396-5.

Hou Y, Zhang C, Xu D, Sun H. Association of killer cell immunoglobulin-like receptor and human leucocyte antigen-Cw gene combinations with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2015 May; 180(2):250-4. Doi: 10.1111/cei.12582.

Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev.* 2002 Dec; 190:40-52.

Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet*. 2003 Dec 13; 362(9400):2012-5.

Huppertz-Hauss G, Hoivik ML, Langholz E, Odes S, Smastuen M, Stockbrugger R et al. Health related quality of life in inflammatory bowel disease in a European-wide population- based cohort 10 years after diagnosis. *Inflamm Bowel Dis*. 2014; 21:337-44.

Iannello A, Debbeche O, Samarani S, Ahmad A. Antiviral NK cell responses in HIV infection: I. NK cell receptor genes as determinants of HIV resistance and progression to AIDS. *J Leukoc Biol*. 2008 Jul; 84(1):1-26. Doi: 10.1189/jlb.0907650

Ivarsson MA, Michaëlsson J, Fauriat C. Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol*. 2014 Apr 22; 5:184. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00184. eCollection 2014.

Jamil KM, Khakoo SI. KIR/HLA interactions and pathogen immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:298348. Doi: 10.1155/2011/298348.

Jan-Irvine E, Farrokhyar F, Swarbrick E. A critical review of epidemiological studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2001; 36: 2-15.

Jelenčić V, Lenartić M, Wensveen FM, Polić B. NKG2D: A versatile player in the immune system. *Immunol Lett*. 2017 Apr 13. pii: S0165-2478(17)30117-7. Doi: 10.1016/j.imlet.2017.04.006.

Jensen MD, Brodersen JB, Kjeldsen J. Capsule endoscopy for the diagnosis and follow up of Crohn's disease: a comprehensive review of current status. *Ann Gastroenterol*. 2017; 30(2):168-178. Doi: 10.20524/aog.2016.0119.

Johansson S, Berg L, Hall H, Hoglund P. NK cells: Elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol*. 2005; 26:613-8.

Jones DC, Edgar RS, Ahmad T, Cummings JRF, Jewell DP, Trowsdale J, Young NT. Killer Ig-like receptor (KIR) genotype and HLA ligand combinations in Ulcerative Colitis susceptibility. *Genes & Immunity* 2006; 7: 576-82

Jostins L, Ripke S, Weersma R, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbes interactions have shaped the genetics architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2012; 491:119-124.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg R. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol*. 2010; 28:573-621.

Katsanos KH, Papadakis KA. Inflammatory Bowel Disease: Updates on Molecular Targets for Biologics. *Gut Liver*. 2017 Jul 15 ; 11(4) :455-463. Doi : 10.5009/gnl16308.

Katz G, Gazit R, Arnon TI, et al. MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J. Immunol*. 2004; 173:1819-25.

Katz G, Markel G, Mizrahi S, Arnon TI, Mandelboim O. Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short-tail number 4. *J. Immunol*. 2001; 166:7260-7.

Khakoo SI, Carrington M. KIR and disease: a model system or system of models? *Immunol. Rev*. 2006; 214: 186-201.

Kim ER, Chang DK. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the risk, pathogenesis, prevention and diagnosis. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 7; 20 (29):9872-81. Doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9872.

Kirkham CL, Carlyle JR. Complexity and Diversity of the NKR-P1: Clr (Klrb1:Clec2) Recognition Systems. *Front Immunol*. 2014 Jun 2; 5:214. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00214. eCollection 2014

Kraemer T, Blasczyk R, Bade-Doeding C. HLA-E: a novel player for histocompatibility. *J Immunol Res*. 2014; 2014:352160. Doi: 10.1155/2014/352160.

Laan M, Lötval J, Chung K, Lindén A. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol*. 2001; 133:200-206.

Laass MW, Roggenbuck D, Conrad K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. *Autoimmun Rev*. 2014 Apr-May; 13(4-5):467-71. Doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.029.

Lahad A, Weiss B. Current therapy of pediatric Crohn's disease. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2015 May 15; 6(2):33-42. Doi: 10.4291/wjgp.v6.i2.33.

Lakatos P. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis.* 2009, 27:215-225.

Lanier LL. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 1998; 16: 359-393.

Lanier LL. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 225–274.

Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res.* 2015 Jun ; 3(6) :575-82. Doi : 10.1158/2326-6066.CIR-15-0098.

La Scaleia R, Stoppacciaro A, Oliva S, Morrone S, Di Nardo G, Santoni A et al. NKG2D/Ligand dysregulation and functional alteration of innate immunity cell populations in pediatric IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Oct; 18(10):1910-22. Doi: 10.1002/ibd.22899.

Lee D, Albenberg L, Compher C, Baldassano R, Piccoli D, Lewis JD et al. Diet in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2015 May; 148(6):1087-106. Doi: 10.1053/j.gastro.2015.01.007.

Lees CW, Barrett JC, Parkes M, Satsangi J. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut.* 2011 Dec; 60(12):1739-53. Doi: 10.1136/gut.2009.199679.

Lehuen A, Diana J, Zacccone P, Cooke A. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nat Rev Immunol.* 2010 Jul; 10(7):501-13. Doi: 10.1038/nri2787.

Le Page ME, Goodridge JP, John E, Christiansen FT, Witt CS. Killer Ig-like receptor 2DL4 does not mediate NK cell IFN- γ responses to soluble HLA-G preparations. *J Immunol.* 2014 Jan 15; 192(2):732-40. Doi: 10.4049/jimmunol.1301748.

Levine A, Griffiths A, Markowitz J, Wilson DC, Turner D, Russell RK et al. Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jun; 17(6):1314-21. Doi: 10.1002/ibd.21493.

Ley R, Peterson D, Gordon J. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124:837–48.

Limketkai BN, Bechtold ML, Nguyen DL. Vitamin D and the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Curr Gastroenterol Rep.* 2016 Oct; 18(10):52. Doi: 10.1007/s11894-016-0526-9.

Liu X, Wu Y, Li F, Zhang D. Dietary fiber intake reduces risk of inflammatory bowel disease: result from a meta-analysis. *Nutr Res.* 2015 Sep; 35(9):753-8. Doi: 10.1016/j.nutres.2015.05.021

Liu Z, Yadav PK, Xu X, Su J, Chen C, Tang M, Lin H, Yu J, Qian J, Yang PC, Wang X. The increased expression of IL-23 in inflammatory bowel disease promotes intraepithelial and lamina propria lymphocyte inflammatory responses and cytotoxicity. *J Leukoc Biol.* 2011 Apr; 89(4):597-606. Doi: 10.1189/jlb.0810456

Liu Z, Yang L, Cui Y, Wang X, Guo C, Huang Z et al. IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Aug; 15(8):1133-44. Doi: 10.1002/ibd.20923.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology.* 2004 May; 126(6):1504-17.

Loftus EV Jr. Update on the Incidence and Prevalence of Inflammatory Bowel Disease in the United States. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2016 Nov; 12(11):704-707.

Long EO, Burshtyn DN, Clark WP, Peruzzi M, Rajagopalan S, Rojo S et al. Killer cell inhibitory receptors: diversity, specificity, and function. *Immunol Rev.* 1997 Feb; 155:135-44.

Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 1999, 17: 875–904.

Louis E, Van Kemseke C, Reenaers C. Necessity of phenotypic classification of inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2011 Apr; 25 Suppl 1:S2-7. Doi: 10.1016/S1521-6918(11)70003-8.

Lowe AM, Roy PO, B-Poulin M, Michel P, Bitton A, St-Onge L et al. Epidemiology of Crohn's disease in Québec, Canada. *Inflamm Bowel Dis.* 2009 Mar; 15(3):429-35. Doi: 10.1002/ibd.20756.

Löwenberg M, D'Haens G. Next-Generation Therapeutics for IBD. *Curr Gastroenterol Rep.* 2015 Jun; 17(6):21. Doi: 10.1007/s11894-015-0444-2.

Łuszczek W, Mańczak M, Cisko M, Nockowski P, Wiśniewski A, Jasek M, Kuśnierczyk P. Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris. *Hum Immunol.* 2004 Jul; 65(7):758-66.

Maccalli C, Scaramuzza S, Parmiani G. TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. *Cancer Immunol Immunother.* 2009 May; 58(5):801-8. Doi: 10.1007/s00262-008-0635-x.

Macdonald T, Monteleone G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science.* 2005; 307:1920-1925.

MacFarlane AW 4th, Campbell KS. Signal transduction in natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 298:23-57

Malmborg P, Bahmanyar S, Grahnquist L, Hildebrand H, Montgomery S. Cesarean section and the risk of pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012 Apr; 18(4):703-8. Doi: 10.1002/ibd.21741.

Manser AR, Weinhold S, Uhrberg M. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol Rev.* 2015 Sep; 267(1):178-96. Doi: 10.1111/imr.12316.

Marsland BJ Regulating inflammation with microbial metabolites. *Nat Med.* 2016 Jun 7; 22(6):581-3. Doi: 10.1038/nm.4117

McCarroll SA, Huett A, Kuballa P, Chilewski SD, Landry A, Goyette P et al. Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease. *Nat. Genetics* 2008; 40:1107-12.

Melgar S, Hammarström S, Oberg A, Danielsson A, Hammarström ML. Cytolytic capabilities of lamina propria and intraepithelial lymphocytes in normal and chronically inflamed human intestine. *Scand J Immunol.* 2004 Jul-Aug; 60(1-2):167-77

Middleton D, Gonzelez F. The extensive polymorphism of KIR genes. *Immunology.* 2010 Jan; 129(1):8-19. Doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03208.x.

Middleton D, Gonzalez A, Gilmore PM. Studies on the expression of the deleted KIR2DS4*003 gene product and distribution of KIR2DS4 deleted and non-deleted version in different populations. *Human Immunol.* 2007; 68:128-34.

Mikhailov TA, Furner SE. Breastfeeding and genetic factors in the etiology of IBD in children. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:270–9.

Mingari MC, Ponte M, Vitale C, Bellomo R, Moretta L. Expression of HLA class I-specific inhibitory receptors in human cytolytic T lymphocytes: a regulated mechanism that controls T-cell activation and function. *Hum Immunol.* 2000 Jan; 61(1):44-50.

Mjösberg J, Spits H. Human innate lymphoid cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Nov; 138(5):1265-1276. Doi: 10.1016/j.jaci.2016.09.009.

Moffett A, Hiby SE, Sharkey AM. The role of the maternal immune system in the regulation of human birthweight. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 Mar 5; 370(1663):20140071. Doi: 10.1098/rstb.2014.0071.

Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* 2012; 142: 46–54.

Moretta A, Biassoni R, Bottino C, Mingari MC, Moretta L. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today.* 2000 May; 21(5):228-34.

Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J.* 2004; 23, 255-259.

Morrison G, Headon B, Gibson P. Update in inflammatory bowel disease. *Aust Fam Physician* 2009; 38:956-961.

Mottawea W, Chiang CK, Mühlbauer M, Starr AE, Butcher J, Abujamel T et al. Altered intestinal microbiota-host mitochondria crosstalk in new onset Crohn's disease. *Nat Commun.* 2016 Nov 23; 7: 13419. Doi: 10.1038/ncomms13419

Müller-Durovic B, Lanna A, Covre LP, Mills RS, Henson SM, Akbar AN. Killer Cell Lectin-like Receptor G1 Inhibits NK Cell Function through Activation of Adenosine 5'-

Monophosphate-Activated Protein Kinase. *J Immunol.* 2016 Oct 1; 197(7):2891-2899. Doi: 10.4049/jimmunol.1600590.

Nash WT, Teoh J, Wei H, Gamache A, Brown MG. Know Thyself: NK-Cell Inhibitory Receptors Prompt Self-Tolerance, Education, and Viral Control. *Front Immunol.* 2014 Apr 16; 5:175. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00175. eCollection 2014.

Neill DR, Flynn RJ. Origins and evolution of innate lymphoid cells: Wardens of barrier immunity. *Parasite Immunol.* 2017 Apr 19. Doi: 10.1111/pim.12436

Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol.* 2014 May; 14(5):329-42. Doi: 10.1038/nri3661.

Ng SC, Bernstein CN, Vatn MH, Lakatos PL, Loftus EV Jr, Tysk C et al. Epidemiology and Natural History Task Force of the International Organization of Inflammatory Bowel Disease (IOIBD). Geographical variability and environmental risk factors in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2013 Apr; 62(4):630-49. Doi: 10.1136/gutjnl-2012-303661.

Nielsen CM, White MJ, Goodier MR, Riley EM. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front Immunol.* 2013 Dec 9; 4:422. Doi: 10.3389/fimmu.2013.00422.

Nielsen OH, Vainer B, Rask-Madsen J. Review article: the treatment of inflammatory bowel disease with 6-mercaptopurine or azathioprine. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15: 1699-1708 [PMID: 11683683 DOI: 10.1046/j.1365-2036.2001.01102.]

Noomen C, Hommes D, Fidder H. Update on genetics in inflammatory disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2009; 23:233-243.

Obeidy P, Sharland AF. NKG2D and its ligands. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Dec; 41(12):2364-7. Doi: 10.1016/j.biocel.2009.07.005.

O'Connor GM, McVicar D. The yin-yang of KIR3DL1/S1: molecular mechanisms and cellular function. *Crit Rev Immunol.* 2013; 33(3):203-18

O'Connor GM, Vivian JP, Gostick E, Pymm P, Lafont BA, Price DA et al. Peptide-Dependent Recognition of HLA-B*57:01 by KIR3DS1. *J Virol.* 2015 May; 89(10):5213-21. Doi: 10.1128/JVI.03586-14.

Ogura Y, Bonen D, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 2001; 411:603-606.

O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells *Nat. Immunol.* 2006; 7: 507-516.

Oliveira SB, Monteiro IM. Diagnosis and management of inflammatory bowel disease in children. *BMJ.* 2017 May 31; 357: j2083. Doi: 10.1136/bmj.j2083.

Oliveira LM, Portela P, Merzoni J, Lindenau JD, Dias FS, Beppler J et al. Reduced frequency of two activating KIR genes in patients with sepsis. *Hum Immunol.* 2017 Apr; 78(4):363-369. Doi: 10.1016/j.humimm.2017.02.005.

Orandi AB, Vogel TP, Keppel MP, Utterson EC, Cooper MA. Azathioprine-Associated Complete NK Cell Deficiency. *J Clin Immunol.* 2017 Jun 22. Doi: 10.1007/s10875-017-0414-6

O'Shea NR, Smith AM. Matrix metalloproteases role in bowel inflammation and inflammatory bowel disease: an up to date review. *Inflamm Bowel Dis.* 2014 Dec ; 20(12) :2379-93. Doi : 10.1097/MIB.000000000000163.

O'Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. Natural Killer Cell Memory. *Immunity* 2015 Oct 20; 43(4):634-45. Doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.013

Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol.* 2005 Mar; 5(3):201-14.

Parham, P., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Guethlein, L.A. Human-specific evolution of killer cell immunoglobulin-like receptor recognition of major histocompatibility complex class I molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012; 367, 800-11.

Park YP, Choi SC, Kiesler P, Gil-Krzewska A, Borrego F, Weck J et al. Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the γ cytokines and TGF- β 1. *Blood*. 2011 Sep 15; 118(11):3019-27. Doi: 10.1182/blood-2011-04-346825.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA et al. Sequence variants in Autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat. Genetics* 2007; 39:830-2.

Pazina T, Shemesh A, Brusilovsky M, Porgador A, Campbell KS. Regulation of the Functions of Natural Cytotoxicity Receptors by Interactions with Diverse Ligands and Alterations in Splice Variant Expression. *Front Immunol*. 2017 Mar 30; 8:369. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00369. eCollection 2017.

Peng H, Tian Z. NK cell trafficking in health and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014 Oct; 47(2):119-27. Doi: 10.1007/s12016-013-8400-0.

Petrey AC, de la Motte CA. The extracellular matrix in IBD: a dynamic mediator of inflammation. *Curr Opin Gastroenterol*. 2017 Jul;33(4):234-238. doi: 10.1097/MOG.0000000000000368.

Poggi A, Zocchi MR. NK cell autoreactivity and autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2014 Feb 4; 5:27. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00027. eCollection 2014.

Popko K, Górska E. The role of natural killer cells in pathogenesis of autoimmune diseases. *Cent Eur J Immunol*. 2015; 40(4):470-6. Doi: 10.5114/ceji.2015.56971.

Prod'homme V, Griffin C, Aicheler RJ, Wang EC, McSharry BP, Rickards CR et al. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *J Immunol*. 2007 Apr 1; 178(7):4473-81.

Rabizadeh S, Dubinsky M. Update in pediatric inflammatory bowel disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 2013 Nov; 39(4):789-99. Doi: 10.1016/j.rdc.2013.03.010.

Radulovic K, Niess JH. CD69 is the crucial regulator of intestinal inflammation: a new target molecule for IBD treatment? *J Immunol Res.* 2015; 2015:497056. Doi: 10.1155/2015/497056.

Rahim MM, Makrigiannis AP. Ly49 receptors: evolution, genetic diversity, and impact on immunity. *Immunol Rev.* 2015 Sep; 267(1):137-47. Doi: 10.1111/imr.12318.

Rajagopalan S. HLA-G-mediated NK cell senescence promotes vascular remodeling: implications for reproduction. *Cell Mol Immunol.* 2014 Sep; 11(5):460-6. Doi: 10.1038/cmi.2014.53.

Rajagopalan S. Endosomal signaling and a novel pathway defined by the natural killer receptor KIR2DL4 (CD158d). *Traffic.* 2010 Nov; 11(11):1381-90. Doi: 10.1111/j.1600-0854.2010.01112.x.

Rajagopalan S, Fu J, Long EO. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J Immunol.* 2001 Aug 15; 167(4):1877-81.

Rajalingam R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* 2011 Dec; 46(4):216-28. Doi: 10.5045/kjh.2011.46.4.216.

Ravi A, Garg P, Sitaraman SV. Matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease: boon or a bane? *Inflamm Bowel Dis.* 2007 Jan; 13(1):97-107.

Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. 2009. *J Clin Invest.* 119: 2441-2450.

Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti-tumor necrosis- α therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology* 2008; 125:178-83.

Rieder F, Fiocchi C. Intestinal fibrosis in IBD--a dynamic, multifactorial process. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009 Apr; 6(4):228-35. Doi: 10.1038/nrgastro.2009.31.

Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990 Dec 15; 76(12):2421-38.

Rojo S, Wagtmann N, Long EO. Binding of a soluble p70 killer cell inhibitory receptor to HLA-B*5101: requirement for all three p70 immunoglobulin domains. *Eur J Immunol.* 1997 Feb; 27(2):568-71.

Rölle A, Brodin P. Immune Adaptation to Environmental Influence: The Case of NK Cells and HCMV. *Trends Immunol.* 2016 Mar ; 37(3):233-243. doi : 10.1016/j.it.2016.01.005.

Ruemmele FM, Prieur A, Talbotec C, et al. Development. Development of Crohn disease during anti-TNF-alpha therapy in a child with juvenile idiopathic arthritis. *J Pediatr Gastroenterol.* 2004; 39:203-206.

Saibeni S, Rondonotti E, Iozzelli A, Spina L, Tontini GE, Cavallaro F et al. Imaging of the small bowel in Crohn's disease: a review of old and new techniques. *World J Gastroenterol.* 2007 Jun 28; 13(24):3279-87.

Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut.* 2006 Jun; 55(6):749-53.

Sauer CG, Kugathasan S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. *Med Clin North Am.* 2010 Jan; 94(1):35-52. Doi: 10.1016/j.mcna.2009.10.002.

Saunders PM, Vivian JP, O'Connor GM, Sullivan LC, Pymm P, Rossjohn J et al. A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol Rev.* 2015 Sep; 267(1):148-66. Doi: 10.1111/imr.12319.

Schultz M, Butt AG. Is the north to south gradient in inflammatory bowel disease a global phenomenon? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012 Aug; 6(4):445-7. Doi: 10.1586/egh.12.31.

Schmechel S, Konrad A, Diegelmann J, Glas J, Wetzke M, Paschos E et al. Linking genetic susceptibility to Crohn's disease with Th17 cell function: IL-22 serum levels are increased in Crohn's disease and correlate with disease severity and IL-23R genotype status. *Inflam. Bowel Dis.* 2008; 14:204-12.

Selby W, Pavli P, Crotty B, Florin T, Radford-Smith G, Gibson P et al. Antibiotics in Crohn's Disease Study Group. Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2007 Jun; 132(7):2313-9. Epub 2007 Mar 21

Sivanesan D, Beauchamp C, Quinou C, Lee J, Lesage S, Chemtob S et al. IL23R (Interleukin 23 Receptor) Variants Protective against Inflammatory Bowel Diseases (IBD) Display Loss of Function due to Impaired Protein Stability and Intracellular Trafficking. *J Biol Chem*. 2016 Apr 15; 291(16):8673-85. Doi: 10.1074/jbc.M116.715870.

Sivori S, Cantoni C, Parolini S, Marcenaro E, Conte R, Moretta L et al. IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors. *Eur J Immunol*. 2003 Dec; 33(12):3439-47.

Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan RFA, Fear N, Price A, Carpenter L, et al. Incidence of Inflammatory bowel disease across Europe: Is there a difference between north and south? Results of the European collaborative study on inflammatory bowel disease (EC-IBD). *Gut*. 1996; 39: 690-7.

Son M, Porat A, He M, Suurmond J, Santiago-Schwarz F, Andersson U et al. C1q and HMGB1 reciprocally regulate human macrophage polarization. *Blood*. 2016 Nov 3; 128 (18): 2218-2228.

Steel AW, Mela CM, Lindsay JO, Gazzard BG, Goodier MR. Increased proportion of CD16 (+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Jan; 33(1):115-26. Doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04499.x.

Strober W, Kitani A, Fuss I. The molecular basis of NOD2 susceptibility mutation in Crohn's disease. *Mucosal Immunol*. 2008: Nov; 1 Suppl 1:S5-9. Doi: 10.1038/mi.2008.42.

Strober W, Fuss IJ. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2011 May; 140(6):1756-67. Doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.016.

Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, Shimomura Y, Andoh A, Bhan AK et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest*. 2008 Feb; 118(2):534-44. Doi: 10.1172/JCI33194.

Tajik N, Shahsavar F, Poormoghim H, Radjabzadeh MF, Mousavi T, Jalali A. KIR3DL1+HLA-B Bw4Ile80 and KIR2DS1+HLA-C2 combinations are both associated with ankylosing spondylitis in the Iranian population. *Int J Immunogenet*. 2011 Oct; 38(5):403-9. Doi: 10.1111/j.1744-313X.2011.01024.x.

Takayama T, Kamada N, Chinen H, Okamoto S, Kitazume MT, Chang J et al. Imbalance of NKp44(+)NKp46(-) and NKp44(-)NKp46(+) natural killer cells in the intestinal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010; 139(3):882-92.

Tateishi H, Mitsuyama K, Toyonaga A, Tomoyose M, Tanikawa K. Role of cytokines in experimental colitis: relation to intestinal permeability. *Digestion*. 1997; 58(3):271-81.

Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni R. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*, 1994; 15: 479-483.

Torres AR, Westover JB, Gibbons C, Johnson RC, Ward DC. Activating killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and their cognate HLA ligands are significantly increased in autism. *Brain Behav Immun*. 2012 Oct; 26(7):1122-7. Doi: 10.1016/j.bbi.2012.07.014.

Tu TC, Brown NK, Kim TJ, Wroblewska J, Yang X, Guo X et al. CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J Exp Med*. 2015 Mar 9; 212(3):415-29. Doi: 10.1084/jem.20131601

Turner D, Griffiths AM, Walters TD, Seah T, Markowitz J, Pfefferkorn M et al. Appraisal of the pediatric Crohn's disease activity index on four prospectively collected datasets: recommended cutoff values and clinimetric properties. *Am J Gastroenterol*. 2010 Sep; 105(9):2085-92. Doi: 10.1038/ajg.2010.143.

Turner D, Otley AR, Mack D, Hyams J, de Bruijne J, Uusoue K et al. Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology* 2007 Aug; 133(2): 423-32.

Ungar B, Kopylov U. Advances in the development of new biologics in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol.* 2016 Jul-Sep; 29(3):243-8. Doi: 10.20524/aog.2016.0027.

Uniken-Venema WT, Voskuil MD, Dijkstra G, Weersma RK, Festen EA. The genetic background of inflammatory bowel disease: from correlation to causality. *J Pathol.* 2017 Jan; 241(2):146-158. Doi: 10.1002/path.4817.

Valés-Gómez M, Reyburn HT, Erskine RA, Strominger J. Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 24; 95(24):14326-31.

van Bergen J, Thompson A, van Pel M, Retière C, Salvatori D, Raulet DH, Trowsdale J, Koning F. HLA reduces killer cell Ig-like receptor expression level and frequency in a humanized mouse model. *J Immunol.* 2013 Mar 15; 190(6):2880-5. Doi: 10.4049/jimmunol.1200650

van Bijnen ST, Withaar M, Preijers F, van der Meer A, de Witte T, Muus P et al. T cells expressing the activating NK-cell receptors KIR2DS4, NKG2C and NKG2D are elevated in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and cytotoxic toward hematopoietic progenitor cell lines. *Exp Hematol.* 2011 Jul; 39(7):751-62.e1-3. Doi: 10.1016/j.exphem.2011.04.003.

van der Heide, F, Dijkstra A, Weersma R, Albersnagel FA, van der Logt EM, Faber KN, et al. Effects of active and passive smoking on disease course of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009; 15:1199-1207.

van Driel BJ, Liao G, Engel P, Terhorst C. Responses to Microbial Challenges by SLAMF Receptors. *Front Immunol.* 2016 Jan 20 ; 7:4. Doi : 10.3389/fimmu.2016.00004. eCollection 2016.

van Ierssel AJ, Mieremet-Ooms MA, Van der Zon JM, et al. Suppression of intestinal mucosal natural killer cells by corticosteroids. *Aliment Pharmacol Therap.* 1997; 11:347-353.

Van Ierssel GJ, Van der Sluys Veer A, Verspaget HW, Griffioen G, Van Hogezaand RA, Lamers CB. Contribution of plasma cortisol to corticosteroid-suppressed peripheral blood natural killer cell activity in Crohn's disease. *Immunopharmacology* 1995a Feb; 29(1):11-7.

Van Ierssel AJ, Van der Sluys Veer A, Verspaget HW, Griffioen G, Van Hogezaand RA, Lamers CB. Budesonide and prednisolone suppress peripheral blood natural killer cells in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1995b Apr; 9(2):173-8.

Vatn MH & Sandvik AK. Inflammatory Bowel Disease. *Scand J Gastroenterol.* 2014; 50:6, 748-762

Vernier-Massouille G, Balde M, Salleron J, Turk D, Dupas JL, Mouterde O, et al. Natural history of pediatric Crohn's disease: A population based cohort study. *Gastroenterology* 2008; 135:1106-13.

Waddell LA, Rajić A, Stärk KD, McEWEN SA. The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: a systematic review and meta-analyses of the evidence. *Epidemiol Infect.* 2015 Nov; 143(15):3135-57. Doi: 10.1017/S095026881500076X.

Watzl C, Long EO. Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Curr Protoc Immunol.* 2010 Aug; Chapter 11: Unit 11.9B. Doi: 10.1002/0471142735.im1109bs90.

Wilk E, Kalippke K, Buyny S, Schmidt RE, Jacobs R. New aspects of NK cell subset identification and inference of NK cells' regulatory capacity by assessing functional and genomic profiles. *Immunobiology* 2008; 213(3-4):271-83. Doi: 10.1016/j.imbio. 2007.10.012.

Wilson TJ, Jobim M, Jobim LF, Portela P, Salim PH, Rosito MA et al. Study of killer immunoglobulin-like receptor genes and human leukocyte antigens class I ligands in a Caucasian Brazilian population with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Hum Immunol.* 2010 Mar; 71(3):293-7. Doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.006

Winter CC, Long EO. A single amino acid in the p58 killer cell inhibitory receptor controls the ability of natural killer cells to discriminate between the two groups of HLA-C allotypes. *J Immunol.* 1997 May 1; 158(9):4026-8.

Wu N, Veillette A. SLAM family receptors in normal immunity and immune pathologies. *Curr Opin Immunol.* 2016 Feb; 38:45-51. Doi: 10.1016/j.coi.2015.11.003

Xu X, Weiss ID, Zhang HH, Singh SP, Wynn TA, Wilson MS et al. Conventional NK cells can produce IL-22 and promote host defense in *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *J Immunol*. 2014 Feb 15; 192(4):1778-86. Doi: 10.4049/jimmunol.1300039.

Yadav PK, Chen C, Liu Z. Potential role of NK cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 348530. Doi: 10.1155/2011/348530.

Yawata M, Yawata N, Draghi M, Partheniou F, Little AM and Parham P. MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. *Blood* 2008; 112: 2369–2380.

Yawata M, Yawata N, McQueen KL, Cheng NW, Guethlein LA, Rajalingam R et al. Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 2002 Nov; 54(8):543-50.

Ziegler S, Weiss E, Schmitt AL, Schlegel J, Burgert A, Terpitz U et al. CD56 Is a Pathogen Recognition Receptor on Human Natural Killer Cells. *Sci Rep*. 2017 Jul 21; 7(1):6138. Doi: 10.1038/s41598-017-06238-4.

Zundler S, Becker E, Weidinger C, Siegmund B. Anti-Adhesion Therapies in Inflammatory Bowel Disease-Molecular and Clinical Aspects. *Front Immunol*. 2017 Jul 28; 8:891. Doi: 10.3389/fimmu.2017.00891.

Zundler S, Neurath MF. Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases: functional role of T cells and T cell homing. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 92):S19-2

