

Université de Montréal

***Identification et caractérisation moléculaire et fonctionnelle
des cellules tissulaires de l'immunité innée
chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales***

par

Laurence Chapuy

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Janvier 2019

© Laurence Chapuy, 2019

RESUME

Les maladies inflammatoires intestinales (MII), maladie de Crohn (MC) et colite ulcéreuse (CU), représentent un problème de santé publique majeur en raison de leur prévalence, de leur chronicité et de l'absence de traitement curatif disponible. La physiopathologie de ces maladies implique des facteurs de prédisposition génétique, des facteurs environnementaux et une réponse anormale du système immunitaire. De par leur position à l'interface entre les facteurs environnementaux, les cellules épithéliales et les cellules de l'immunité adaptative, les cellules de l'immunité innée (phagocytes monocucléés (MNPs) et granulocytes) sont des acteurs importants dans l'initiation et le maintien de l'inflammation intestinale. Largement étudiés chez la souris, leur investigation chez l'humain restait parcellaire, souvent contradictoire dans le colon et rarement étudiée dans le ganglion mésentérique (MLN).

Nous avons caractérisé par des méthodes de cytométrie de flux multi-couleurs, de cytométrie de masse (CyTOF) et de séquençage de l'ARN (total et à l'échelon de la cellule unique), les MNPs de la muqueuse colique et des ganglions mésentériques chez les patients atteints de MC et de CU. Nous avons également évalué la fonction des MNPs et des basophiles sur les réponses mémoires T CD4⁺ autologues tissulaires.

Notre travail a mis en évidence des similitudes et des différences entre la MC et la CU, dans la distribution des MNPs et le profil de la réponse mémoire T CD4⁺ dans le colon et le ganglion. La sous-population de MNPs HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁻ qualifiée de monocytes inflammatoires, et non les macrophages HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁺, s'accumule dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MC et de CU, et promeut les réponses mémoires de type Th17 et Th17/Th1 d'une manière dépendante de l'IL-1β. La

fréquence de cette population corrèle avec le score de sévérité endoscopique en MC. Cependant, la distribution des MNPs ganglionnaires diffère entre la MC et la CU. Nous montrons que, dans les ganglions des patients atteints de CU, les MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ sont enrichis en cellules CD163⁺, qui incluent principalement des cellules ‘monocyte-like’ HLA-DR^{dim} en plus de macrophages HLA-DR^{hi}. Parmi les cellules dendritiques (DCs) HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺, les DCs plasmocytoides prédominent dans les deux MII, avec une fréquence supérieure en MC qu’en CU.

Par ailleurs, l’IL-1 β dans la MC et l’IL-12 dans la CU favorisent un profil pathogénique dans les lymphocytes T CD4⁺ (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-6) de la muqueuse colique. Par sérendipité, nous avons aussi mis en évidence que l’IL-12 et les monocytes inflammatoires tissulaires induisent la production d’IL-8 par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires de la muqueuse intestinale et des MLNs dans la CU mais pas dans la MC.

Au cours de cette étude, nous avons également observé l’accumulation de basophiles, mais pas de mastocytes, dans la muqueuse colique et le MLN en MC et en CU, et montré qu’ils favorisaient également les réponses Th17 et Th17/Th1 et non Th1 dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant CCR7.

En conclusion, la caractérisation des MNPs de la muqueuse intestinale et des MLNs dans les maladies inflammatoires intestinales (MII) permet de mieux appréhender la physiopathologie de la maladie, dans l’espoir d’optimiser la stratification des MII et de permettre ainsi une prise en charge thérapeutique personnalisée.

ABSTRACT

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), two common forms of inflammatory bowel disease (IBD), represent a major public health problem because of their prevalence, chronicity and lack of available curative treatment. The pathophysiology of these diseases involves predisposing genetic factors, environmental triggers, and a dysfunctional immune response. Innate immune cells, including mononuclear phagocytes (MNPs) and granulocytes, are important players in the initiation and maintenance of intestinal inflammation due to their position at the interface between the external environment, epithelium and adaptive immune cells. Although widely studied in mice, their investigation in humans remains fragmentary, often with contradictory findings reported in the colon, and they are rarely studied in the mesenteric lymph nodes (MLNs).

MNPs from the colon and MLNs of patients with CD and UC were characterized by multi-color flow cytometry, mass cytometry (CyTOF) and RNA sequencing (bulk and single cell). The function of MNPs and basophils on autologous memory CD4⁺ T cell responses was also assessed.

The results presented here highlight similarities and differences in the distribution of MNPs between CD and UC, and the profile of memory CD4⁺ T cell response in colon and MLNs. HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs, defined as inflammatory monocytes, but not HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁺ macrophages, accumulated in the inflammatory mucosa of CD and UC patients, and promoted Th17 and Th17/Th1 memory responses in an IL-1β dependent manner. The frequency of this subpopulation correlated with endoscopic severity in CD. In contrast, the distribution of these two MNP populations in the MLNs differs between

CD and UC. HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺ MNPs were enriched in CD163⁺ cells that predominantly included HLA-DR^{dim} monocytes-like cells over HLA-DR^{hi} macrophages in UC patients only. Among HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁻CD64⁻ dendritic cells (DCs), plasmacytoid DCs predominated in both UC and CD, with higher frequency in CD versus UC.

IL-1β in CD and IL-12 in UC favor a pathogenic CD4⁺ T cell profile (IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-6 expression/production) in the colonic mucosa. It was also demonstrated that IL-12 and inflammatory tissue monocytes induced IL-8 production by memory CD4⁺ T cells in intestinal mucosa and MLNs of UC but not CD.

In this study, it was also observed that basophils and not mast cells accumulated, in the colonic mucosa and MLNs of CD and UC patients, and favored Th17 and Th17/Th1, but not Th1, responses in CCR7⁺ memory CD4⁺ T cells.

In conclusion, characterization of MNPs in the intestinal mucosa and MLNs of IBD patients contributes to a better understanding of IBD pathophysiology and opens avenues to optimize patient stratification, and thus, personalized treatment of IBD patients.

TABLE DES MATIERES

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tables	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xvi
Remerciements	xvii
Contribution des auteurs	xix
Introduction	1
A. Introduction générale	1
B. Aspects cliniques de la MC et de la CU	4
B.1. Épidémiologie	4
B.2. Présentation clinique	5
B.3. Traitement – concepts généraux	8
C. Pathogénèse comparée de la maladie de Crohn et de la colite ulcéreuse	11
C.1. Apport de la génétique	11
C.1.1. Génomique/épigénomique	11
C.1.2. Cas particulier des MII monogéniques	14
C.2. Implications de la barrière épithéliale	15
C.2.1. Anomalies de la barrière et maladie de Crohn	17
C.2.1.1. Anomalies des cellules de Paneth	17
C.2.1.2. Autres anomalies épithéliales	19
C.2.2. Anomalies de la barrière et colite ulcéreuse	20
C.2.3. Conclusion	21
C.3. Contribution de l'environnement et du microbiote	22
C.3.1. Rôle des facteurs environnementaux extrinsèques	22
C.3.2. Rôle du microbiote intestinal	24
C.3.2.1. Microbiote intestinal chez le sujet sain	24
C.3.2.2. Nature de la dysbiose chez les patients avec MC et CU	24
C.3.2.3. Dysbiose, cause ou conséquence en MC et CU ?	26
C.3.2.3.a. Cause	27
C.3.2.3.b. Conséquence	28
C.3.2.4. Conclusion	29
C.4. Réponse immunitaire	30
C.4.1. Rôle des cellules innées dans les MII	30
C.4.1.1. Phagocytes mononucléés (MNPs)	30
C.4.1.1.a. Nomenclature, classification, ontogénie des MNPs	30
C.4.1.1.a.i. Cellules dendritiques	31

C.4.1.1.a.I.ii. Macrophages, Monocytes	35
C.4.1.1.b. MNPs de la muqueuse intestinale	37
C.4.1.1.b.I. Homéostasie	37
C.4.1.1.b.I.i. Cellules dendritiques	37
C.4.1.1.b.I.ii. Macrophages - Monocytes	42
C.4.1.1.b.II. Inflammation	47
C.4.1.1.c. Phagocytes mononucléés des ganglions mésentériques	50
C.4.1.1.c.I. Anatomie	50
C.4.1.1.c.II. Homéostasie	52
C.4.1.1.c.II.i. Cellules dendritiques	52
C.4.1.1.c.II.ii. Macrophages – Monocytes	56
C.4.1.1.c.III. Inflammation	60
C.4.1.1.d. Questions restantes	62
C.4.1.2. Granulocytes - Mastocytes	64
C.4.1.2.a. Polynucléaires neutrophiles	64
C.4.1.2.c. Polynucléaires éosinophiles	68
C.4.1.2.d. Basophiles	70
C.4.1.2.e. Mastocytes	72
C.4.1.3. Cellules lymphoïdes innées	74
C.4.2. Rôle des cellules adaptatives dans les MII	76
C.4.2.1. Lymphocytes B, plasmocytes, anticorps	76
C.4.2.2. Lymphocytes T	77
C.4.2.2.a. Lymphocytes T mémoires	77
C.4.2.2.b. Lymphocytes T helper CD4 ⁺	80
C.4.2.2.b.I. Lymphocytes Th1	82
C.4.2.2.b.II. Lymphocytes Th2	83
C.4.2.2.b.III. Lymphocytes Th9	83
C.4.2.2.b.IV. Lymphocytes Th22	84
C.4.2.2.b.V. Lymphocytes T régulateurs	85
C.4.2.2.b.VI. Lymphocytes Th17	91
C.4.2.2.b.VI.i. Différentiation, Fonction des Th17 intestinaux	91
C.4.2.2.b.VI.iii. Plasticité des Lymphocytes Th17	96
C.4.2.2.b.VI.iv. Conclusion	104
C.4.2.2.c. Questions restantes	105
D. Objectifs de l'étude	106
Résultats	108
A. Two distinct colonic CD14⁺ subsets characterized by single cell RNA profiling in Crohn's disease	108
A.1. Abstract	108
A.2. Introduction	109
A.3. Results	114
A.3.1. HLADR ⁺ SIRPα ⁺ MNPs comprise two CD14 ⁺ CD64 ^{hi} subpopulations: accumulation of CD64 ^{hi} CD163 ^{dim} , but not CD64 ^{hi} CD163 ^{hi} cells, in inflamed colon of CD patients.	114

A.3.2.	Frequency of CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells correlates with disease severity in CD patients and is not modified by treatment history. _____	116
A.3.3.	CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells are the major contributors to IL-23 and IL-1β secretion but not TNF-α in inflamed CD colon. _____	117
A.3.4.	Colonic CD64 ^{hi} CD163 ⁻ (P3) cells skew autologous CD4 ⁺ T cells towards Th17/Th1 responses in CD patients. _____	118
A.3.5.	CD64 ^{hi} CD163 ⁻ (P3) cells promote colonic Th17 and Th17/Th1 responses in an IL-1β-dependent manner in CD patients. _____	120
A.3.6.	Unsupervised single cell RNA-sequencing (scRNAseq) independently segregates clusters enriched in P3 or P4 cells. _____	121
A.3.7.	TREM ⁺ CD209 ⁻ MERTK ⁻ (P3/b) cells promote colonic Th17 and Th17/Th1 responses in CD patients. _____	122
A.4.	Figures _____	124
A.5.	Discussion _____	139
A.6.	Materials and Methods _____	147
B.	IL-12 and mucosal CD14⁺ monocytes-like cells induce IL-8 in colonic memory CD14⁺ t cells of patients with Ulcerative colitis but not Crohn's disease _____	150
B.1.	Abstract _____	150
B.2.	Introduction _____	151
B.3.	Results _____	154
B.3.1.	IL-1β promotes Th17 and Th17/Th1 responses in CD4 ⁺ T cells isolated from inflamed colon of UC patients. _____	154
B.3.2.	HLA-DR ⁺ SIRPα ⁺ CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁻ cells selectively accumulate in inflamed UC mucosa. _____	154
B.3.3.	HLA-DR ⁺ SIRPα ⁺ CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁻ and CD163 ⁺ cells express IL-1β, IL-12, IL-23 but less IL-10 relative to CD163 ⁺ cells. _____	155
B.3.4.	Mucosal CD163 ⁻ but not CD163 ⁺ MNPs favor autologous Th17/Th1 and Th17/Th22 responses in an IL-1β-dependent manner in inflamed UC patients. _____	156
B.3.5.	IL-12 promotes an IL-8 pathogenic profile in mucosal CD4 ⁺ T cells in UC patients. _____	157
B.3.6.	IL-12 promotes Th8 and Th8/Th1 whereas IL-1β favors Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 responses in colon of UC patients. _____	158
B.3.7.	IL-12 promotes a Th8 pathogenic profile in effector memory Th17 cells in mesenteric lymph nodes in UC patients. _____	159
B.3.8.	Mucosal CD163 ⁻ , but not CD163 ⁺ , MNPs augment IL-8 expression in the colonic CD4 ⁺ T cells of UC but not CD patients. _____	159
B.3.9.	Unsupervised multi-color flow cytometry analysis reveals that CD163 ⁻ and CD163 ⁺ MNPs form distinct clusters related to monocyte-like and macrophage cell populations respectively. _____	160
B.4.	Figures _____	163
B.5.	Discussion _____	176
B.6.	Materials and Methods _____	182
C.	High dimensional phenotypic mapping and transcriptomic analysis of mononuclear phagocytes in mesenteric lymph nodes reveal differences between ulcerative colitis and Crohn's disease _____	187
C.1.	Abstract _____	187
C.2.	Introduction _____	189
C.3.	Results _____	192

C.3.1.	Distribution of CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ and CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ cells in MLNs was different between UC and CD patients _____	192
C.3.2.	CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ and CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ MNPs displayed morphology and function of macrophages and dendritic cells, respectively _____	193
C.3.3.	CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ cells favored plasticity of autologous Th17 T _{CM} towards Th1/Th17 or Th1* profile in MLNs _____	194
C.3.4.	Molecular signature of CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ and CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ cells in MLNs of CD and UC patients _____	195
C.3.5.	High dimensional single cell protein expression analysis of HLA-DR ⁺ SIRPα ⁺ MNPs revealed the heterogeneity of CD14 ⁻ CD64 ⁻ populations in MLNs of UC and CD _____	197
C.3.6.	High dimensional single cell protein expression analysis of HLA-DR ⁺ SIRPα ⁺ MNPs revealed the heterogeneity of CD14 ⁺ CD64 ⁺ populations in MLNs of UC and CD _____	199
C.4.	Figures _____	201
C.5.	Discussion _____	212
C.6.	Materials and Methods _____	217
D.	Basophils accumulate in Crohn's disease and Ulcerative Colitis and augment mesenteric lymph node T helper cell responses _____	225
D.1.	Abstract _____	225
D.2.	Introduction _____	226
D.3.	Results _____	228
D.3.1.	Basophils increase in blood and inflamed tissues of CD and UC patients. _____	228
D.3.2.	Basophils promote Th17 and Th17/Th1 responses by memory CD4 T cells from mesenteric lymph nodes of IBD patients. _____	229
D.3.3.	Basophils increase memory Th2 and Th9 responses but do not promote the emergence of IL-17 ⁺ IL-4 ⁺ or IL-17 ⁺ IL-9 ⁺ memory T cells. _____	230
D.3.4.	Basophils promote Th17 and Th17/Th1 responses by CCR7 ⁺ but not CCR7 ⁻ T _{EM} subpopulations _____	231
D.4.	Figures _____	232
D.5.	Discussion _____	236
D.6.	Materials and methods _____	239
	Discussion _____	242
A.	Nature et fonction des MNPs intestinaux dans la MC _____	243
B.	Similitudes et différences des cellules innées entre MC et CU _____	255
C.	Similitudes et différences du profil des lymphocytes T helper entre MC et CU _____	265
C.1.	Site de la plasticité des Th17 et Th17/Th1 : dans la muqueuse ou dans les MLNs ? _____	265
C.2.	Profil cytokinique et pathogénicité des lymphocytes Th17, Th17/Th1 et Th1 : différences entre MC et CU, ganglion mésentérique et muqueuse ? _____	268
D.	Contribution des cellules innées intestinales à la plasticité des lymphocytes T _____	276
E.	Implications cliniques et thérapeutiques _____	281
	Conclusion et Perspectives _____	287
	Références _____	290

Annexes	<i>i</i>
Annexe 1 : Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph nodes and colon of CD and UC patients	<i>i</i>
Annexe 2 : Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease	<i>xii</i>
Annexe 3 : Informations additionnelles: Two distinct colonic CD14⁺ subsets characterized by single cell RNA profiling in Crohn's disease (Results A)	<i>xxvi</i>
Annexe 4 : Informations additionnelles: A mucosal CD14⁺ monocyte-like subpopulation and IL-12 induce IL-8 in tissue Th17 in ulcerative colitis (Results B)	<i>xlvi</i>
Annexe 5 : Informations additionnelles: High dimensional phenotypic mapping and transcriptomic analysis of mononuclear phagocytes in mesenteric lymph nodes reveal differences between ulcerative colitis and crohn's disease (Results C)	<i>li</i>
Annexe 6 : Morphologie, clustering et fonction présentatrice d'antigène des MPNs CD14⁺CD64⁺CD163⁻ ganglionnaires	<i>lxxiv</i>
Annexe 7 : Transcriptome des lymphocytes ganglionnaires Th17 mémoires en MC et en CU	<i>lxxv</i>

LISTE DES TABLES

INTRODUCTION

Table 1 : Traitements biologiques approuvés dans les MII	9
--	---

ANNEXE 3

Table S1. SES-CD score.....	xxx
Table S2. FACS and cluster identities of 294 cells included in scRNAseq analysis.....	xxxix
Table S3. List of discriminating genes identified through scRNAseq analysis	xxxviii
Table S4. Clinical information	xlvi
Table S5. Flow-cytometry antibodies	xlvii

ANNEXE 4

Table 1. Patient's characteristics	xlvi
Table 2. Anti-human antibodies	xlix

ANNEXE 5

Table S1: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in UC – FDR<0.05	li
Table S2: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in CD – FDR<0.05	lvi
Table S3: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in UC – 0.05<FDR<0.1	lxiii
Table S4: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in CD – 0.05<FDR<0.1	lxvi
Table S5: Chi square test for distribution HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ subpopulations	lxx
Table S6: Clinical information	lxxi
Table S7 : Flow cytometry human antibodies	lxxii
Table S8 : CyTOF anti-human antibodies.....	lxxiii

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 : Localisation et aspects endoscopiques de la maladie de Crohn (à gauche) et de la colite ulcéreuse (à droite).....	6
Figure 2 : Étiologie plurifactorielle des MII.....	11
Figure 3 : Histologie de la muqueuse intestinale grêle et colique normale.....	16
Figure 4: Deux niveaux de nomenclature pour la classification des phagocytes mononucléés.....	31
Figure 5: a) cDC1 et cDC2 dans les muqueuses intestinales : classification chez la souris; classification et fonction chez l'humain.....	41
b) distribution des cDC1 et cDC2 dans les muqueuses intestinales chez l'humain.....	41
Figure 6: Macrophages intestinaux à l'homéostasie chez la souris et l'humain.....	46
Figure 7 : MNPs intestinaux au cours de l'inflammation chez la souris et l'humain.....	49
Figure 8 : Compartimentation du drainage lymphatique des MLNs chez la souris (a) et l'humain (b).....	51
Figure 9 : Classification et fonction des cDC1 et cDC2 dans les ganglions lymphatique grêles (sMLN) et coliques (cMLN) chez la souris.....	54
Figure 10 : cDC des ganglions lymphatiques mésentériques chez l'humain.....	55
Figure 11 : Macrophages des ganglions lymphatiques chez la souris et l'humain.....	59
Figure 12 : Phagocytes mononucléés des ganglions lymphatiques chez la souris (à gauche) et l'humain (à droite) au cours de l'inflammation.....	62
Figure 13: Differentiation des lymphocytes T helper CD4 ⁺	81

RÉSULTATS A

Figure A.4.1. Frequencies of CD14 ⁺ CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells increase in inflamed colon of CD patients.....	124
Figure A.4.2. Frequencies of CD14 ⁺ CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells correlate with disease severity.....	125
Figure A.4.3. CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells are the major contributors to IL-23 and IL-1 β secretion but not TNF- α in inflamed CD colon.....	126
Figure A.4.4. CD64 ^{hi} CD163 ⁻ (P3) cells shape autologous CD4 ⁺ T cells towards a Th17/Th1 profile.....	127
Figure A.4.5. CD64 ^{hi} CD163 ⁻ (P3) cells augment colonic Th17 and Th17/Th1 responses in an IL-1 β -dependent manner.....	128
Figure A.4.6. scRNAseq analysis of HLADR ⁺ SIRP α ⁺ MNPs in inflamed CD colon.....	129
Figure A.4.7. Gene expression of discriminating genes of cluster A, B and C.....	130
Figure A.4.8. Gene expression of selected discriminating genes of cluster E and F.....	131
Figure A.4.9. Functional validation of P3 and P4 cells using the newly identified phenotype by scRNA-seq.....	132
Figure A.4.S1. First steps of gating strategies for staining of HLADR ⁺ SIRP α ⁺ MNPs in inflamed CD colon.....	133
Figure A.4.S2. Phenotype of CD64 ^{-/dim} CD163 ^{-/dim} , CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} , CD64 ^{hi} CD163 ^{hi} cells in inflamed colon.....	133
Figure A.4.S3. The CD64 ^{hi} CD163 ^{-/dim} cells remained the predominant HLADR ⁺ SIRP α ⁺ MNPs in CD colon regardless demographics and clinical classification of CD patients.....	134
Figure A.4.S4. Cytokine expression in HLADR ⁺ SIRP α ⁺ MNPs subsets.....	135
Figure A.4.S5. Frequencies of monocyte-like CD14 ⁺ CD64 ^{hi} CD163 ⁻ cells augments relative to macrophage-like CD14 ⁺ CD64 ^{hi} CD163 ^{hi} cells in inflamed CD colon.....	136
Figure A.4.S6: P3 cells increase the frequencies of IL-6 ⁺ TNF- α ⁻ and IL-6 ⁺ TNF- α ⁺ CD4 ⁺ T mucosal T cells.....	136
Figure A.4.S7. CD14 expression at molecular and protein levels, and genes expression of ubiquitin-proteasome system.....	137
Figure A.4.S8. Quality filters and identification of outlier cells in scRNAseq data.....	138

RÉSULTATS B

Figure B.4.1. IL-1 β increases Th17 and Th17/Th1 responses in UC patients	163
Figure B.4.2. HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁻ MNP ^s accumulate in inflamed UC mucosa	164
Figure B.4.3. HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁻ MNP ^s produce IL-1 β , IL-12p40 and IL-23 but less IL-10 relative to CD163 ⁺ cells	165
Figure B.4.4. CD163 ⁻ but not CD163 ⁺ MNP ^s promote Th17, Th17/Th1 and Th17/Th22 responses in an IL-1 β -dependent manner in UC patients	166
Figure B.4.5. IL-1 β and IL-12 favor IL-8 expression in mucosal CD4 ⁺ T cells in UC patients.....	167
Figure B.4.6. IL-1 β favors Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 while IL-12 promotes Th8 and Th8/Th1 responses in UC patients.....	168
Figure B.4.7. IL-1 β and IL-12 favor IL-8 responses in Th17 cells isolated from mLN ^s of UC patients	169
Figure B.4.8. CD163 ⁻ MNP ^s increase IL-8 expression in colonic CD4 ⁺ T cells in UC but not CD patients	170
Figure B.4.9. Unsupervised analysis of the phenotype of HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ CD14 ⁺ CD64 ⁺ MNP ^s in inflamed UC mucosa	171
Figure B.4.S1. Gating strategy for sorting CD163 ⁻ and CD163 ⁺ MNP ^s and CD4 ⁺ T cells in inflamed UC mucosa	172
Figure B.4.S2. Phenotype of IL-8-expressing CD4 ⁺ T cells.....	172
Figure B.4.S3. IL-8 expression by colonic CD4 ⁺ CD25 ^{+/-} Foxp3 ^{+/-} T cells	173
Figure B.4.S4. IL-1 β and IL-12 promotes IL-8 expression irrespective of IL-22 expression.....	173
Figure B.4.S4. IL-1 β and IL-12 promotes IL-8 expression irrespective of IL-22 expression.....	173
Figure B.4.S5. CD163 ⁻ MNP ^s did not increase IL-8 expression by CD4 ⁺ T cells in the colon of CD patients.....	174
Figure B.4.S6. CD163 ⁻ MNP ^s increase IL-8 expression, irrespective of IL-22 expression, in UC colonic CD4 ⁺ T cells.....	175
Figure B.4.S7. Morphology of CD163 ⁻ and CD163 ⁺ cells	175

RÉSULTATS C

Figure C.4.1. Distribution of HLA-DR+SIRP α hi MNP ^s , CD14+CD64+CD163+ and CD14-CD64-CD163- cells in MLN ^s revealed differences between UC and CD patients.	201
Figure C.4.2. CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ and CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ MNP ^s displayed morphology and function of macrophages and dendritic cells respectively	202
Figure C.4.3. CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ MNP ^s regulated plasticity of autologous Th17 T _{CM} in MLN ^s	203
Figure C.4.4. Molecular signature of CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ and CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ cells in MLN ^s of UC and CD patients.....	204
Figure C.4.5. High dimensional single cell protein expression analysis of CD14 ⁻ CD64 ⁻ HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ MNP ^s in MLN ^s of UC and CD	205
Figure C.4.6. High dimensional single cell protein expression analysis of CD14 ⁺ CD64 ⁺ HLA-DR ⁺ SIRP α ⁺ MNP ^s in MLN ^s of UC and CD patients.....	206
Figure C.4.S1. Distribution of HLADR ⁺ SIRP α ^{low/hi} MNP ^s , CD14 ⁺ CD163 ⁻ and CD14 ⁻ CD163 ⁺ cells in MLN ^s of UC and CD patients.....	207
Figure C.4.S2. Ex vivo cytokine production and after in vitro stimulation by CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ and CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ MNP ^s from MLN ^s	208
Figure C.4.S3. IL-12 but not IL-1 β plus IL-23 induced plasticity of Th17 T _{CM} in MLN ^s	209
Figure C.4.S4. Violin plots of gene expression levels	210
Figure C.4.S5. Shared functional pathways with CD14 ⁻ CD64 ⁻ CD163 ⁻ and CD14 ⁺ CD64 ⁺ CD163 ⁺ MNP ^s	211

RÉSULTATS D

Figure D.4.1. Accumulation of basophils in the blood and inflamed mucosa of IBD patients.....	232
Figure D.4.2. Basophils increase IL-17 and IFN γ production by central memory (T _{CM}) and effector memory (T _{EM}) CD4 T cells from the mLN of IBD patients	233
Figure D.4.3. Basophils promote memory T _H 2 and T _H 9 memory CD4 T cells	234
Figure D.4.4. Basophils augment T _H 17, T _H 2 and T _H 9 responses in CCR7 ⁺ T _{EM} subpopulation.....	235

DISCUSSION

Figure 14 : MNPs intestinaux et ganglionnaires dans la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse	263
Figure 15 : Effets de l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-23 sur les réponses Th17, TH17/Th1 et Th1.....	275
Figure 16 : Effets de l'IL-1 β , l'IL-12, l'IL-23, des basophiles et des cellules CD64 ⁺ CD163 ⁻ sur les réponses Th17, TH17/Th1 et Th1	279
Figure 17 : Thérapies dans les MII	286

Les figures ont été reproduites selon les modalités d'autorisation requises, indiquées en légende.

Toutes les figures sans mention d'autorisation sont des figures originales.

LISTE DES ABREVIATIONS

AEIC : *Escherichia coli* adhérent invasif
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CU : colite ulcéreuse
DC : cellule dendritique
cDC : cellule dendritique conventionnelle
pDC : cellule dendritique plasmocytoïde
FMT : transplantation fécale microbienne
IL : interleukine
ILC : cellule lymphoïde innée
LPMC: cellules mononuclées de la lamina propria
LPS : lipopolysaccharide
mAb: anticorps monoclonal
MC : maladie de Crohn
M ϕ : macrophage
MDP : muramyl dipeptide
MII : maladies inflammatoires intestinales
MLN : ganglion lymphatique mésentérique
MNP : phagocytes mononucléés
NLR: NOD like recepteur
PGN: peptidoglycan
PMA: phorbol 12-myristate 13-acetate
SES-CD : simple endoscopic score-Crohn's disease
T_{CM} : lymphocyte T central mémoire
T_{EM} : lymphocyte T effecteur mémoire
Th : lymphocyte T helper
TLR: toll like recepteur
TPM: transcripts par million
scRNAseq : single cell RNA sequencing: séquençage de l'ARN à l'échelon d'une cellule

REMERCIEMENTS

Dre Marika Sarfati, c'est très chaleureusement que je vous remercie pour votre enseignement, votre support quotidien et votre disponibilité infallible. Ces années à vos côtés m'ont permis d'acquérir la démarche et la rigueur scientifique, une énorme somme de connaissance et le sens de l'argumentation scientifique. Ce fut aussi une école de persévérance et de résilience, des qualités finalement indispensables à tout chercheur. Merci encore de m'avoir permis de rencontrer la communauté scientifique internationale, de m'avoir initié à l'art de la collaboration scientifique et de m'avoir permis d'être continuellement exposée aux avancées technologiques au cours de ce doctorat. C'est grâce à vous que je prends maintenant mon envol, riche de ce savoir que j'ai acquis avec vous.

Un immense merci à toute l'équipe du laboratoire! Manu, pour ton humour, tes qualités scientifiques et techniques et ton bon sens, toujours au rendez-vous. Merci pour ton aide inestimable! Marwa, pour ta présence, dans les moments drôles et chantants comme dans les moments difficiles... Shunya, mon japonais modèle, nous avons tant ri! Heena, merci pour ton aide précieuse et ta patience. Amélie, merci pour ton aide dans le recrutement des patients. Merci à PO, Vinh et aussi à tous les collègues et amis du CRCHUM, venus de tous les horizons ; Shoma, Déborah, Mélanie, Aurélie, Gemma, Lia, Angus, Cayetana, François, Nora et les autres, ces années passées à vos côtés furent remplies de découvertes.

Je remercie tous les patients ayant accepté de participer à ce projet de recherche. Votre contribution à ce travail fut essentielle.

Je remercie tous les membres des services de gastroentérologie, de chirurgie digestive et de pathologie du CHUM dont la collaboration a été indispensable à l'aboutissement de ce projet. Mention spéciale au Dre Geneviève Soucy pour ton talent et ta motivation! Merci à Carole Bergeron pour ta bonne humeur et ton appui.

Un grand merci au Dre Colette Deslandres pour votre soutien tout au long de cette aventure !

Je remercie le fond Alexandre Lecavalier, les fonds de recherche en santé du Québec et les Instituts de Recherche en Santé du Canada pour le soutien financier.

Je remercie les Dr(e)s Elie Haddad, Naglaa Shoukry et Talat Bessissow d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Enfin, je ne pourrai jamais remercier assez ma famille pour sa patience et son soutien inconditionnel.

À mes parents, mes soeurs et frère, pour leur aide et leur soutien précieux depuis toujours.



À mes enfants, Louise, Paul et Agathe, mes plus fidèles supporters! Puissent les efforts et les sacrifices consentis au travail par votre maman, vous donner l'envie d'assouvir votre curiosité et le goût de l'effort pour y parvenir. Que la vie vous offre cette chance de travailler avec passion!

À Pierre, sans qui rien n'aurait été possible. Je te dédie ce travail. Merci... pour tout.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Article A : J'ai contribué à la conception des expériences, effectué les manipulations (extraction cellulaire, marquage en cytométrie de flux, analyses et interprétation des résultats, préparation des échantillons pour le séquençage de l'ARN), écrit le manuscrit, recueilli l'ensemble des informations cliniques.

Article B : J'ai contribué à la conception des expériences, effectué les manipulations (extraction cellulaire, marquage en cytométrie de flux, analyses et interprétation des résultats de cytométrie de flux conventionnelle et multicolore), écrit le manuscrit, recueilli l'ensemble des informations cliniques.

Article C : J'ai contribué à la conception des expériences, effectué les manipulations (extraction cellulaire, marquage en cytométrie de flux, analyses et interprétation des résultats de cytométrie de flux et cytométrie de masse), participer à la rédaction du manuscrit, recueilli l'ensemble des informations cliniques.

Article D : j'ai effectué une partie des manipulations (extraction cellulaire, marquage en cytométrie de flux, analyses et interprétation des résultats), écrit le manuscrit, recueilli l'ensemble des informations cliniques.

Article en annexe 1 : J'ai participé à la rédaction du manuscrit et recueilli l'ensemble des informations cliniques.

Article en annexe 2 : J'ai contribué à conception de l'étude et des expériences et à la conception du manuscrit.

Article en annexe 7 : J'ai contribué à la conception des expériences, effectué et analysé une partie des expériences en cytométrie de flux, préparé et participé à l'analyse et l'interprétation des échantillons obtenus par technologie nanostring.

‘Le plus noble prix de la science est le plaisir d'éclairer l'ignorance’

Charles-Irénée Castel de Saint-Pierre (1743)

INTRODUCTION

A. INTRODUCTION GENERALE

Les maladies inflammatoires intestinales (MII), comprenant la maladie de Crohn (MC) et la colite ulcéreuse (CU), sont des maladies fréquentes à travers le monde (Ng et al., 2018). Ce sont des maladies chroniques pour lesquelles il n'existe pas de traitement curatif. En 2012, approximativement 233 000 canadiens vivaient avec une MII (129 000 avec une MC et 104 000 avec une CU) soit une prévalence de 0,67%, représentant un fardeau économique majeur (2,9 milliards de dollars au Canada en 2012) (Rocchi et al., 2012). L'avancée des recherches et l'apparition de nouveaux traitements au cours des dernières années a permis l'amélioration de la prise en charge de ces patients. Cependant, la thérapie reste inefficace chez une partie d'entre eux, altérant leur qualité de vie en raison des symptômes et des complications engendrés par la maladie. Il reste donc indispensable de poursuivre les recherches afin de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques des MII. La théorie qui prévaut actuellement allègue une réponse anormale du système immunitaire à la flore commensale chez des sujets génétiquement prédisposés (de Souza and Fiocchi, 2016). Cette théorie a été abondamment étudiée chez la souris dans les très nombreux modèles murins d'inflammation intestinale. Ces modèles ont cependant leur limite puisqu'aucun ne reproduit fidèlement la complexité de la maladie observée chez l'humain, rendant fondamentale l'étude des MII chez les patients (Valatas et al., 2015). Chez l'humain, le rôle des facteurs génétiques et environnementaux extrinsèques et intrinsèques (microbiote) a été largement étudié (Kamada et al., 2013; Loddo and Romano, 2015). Par contre, lorsque nous avons initié ce travail en 2013, les données sur la réponse immunitaire muqueuse, et notamment sur les cellules de l'immunité innée, étaient rares. Toutefois ces données préliminaires plaident pour un rôle central, dans la pathogénèse de la maladie, de ces cellules

positionnées à l'interface entre l'environnement et la réponse adaptative. Le but de notre travail était donc de caractériser le phénotype, le profil moléculaire et la fonction des cellules de l'immunité innée (phagocytes mononucléés et granulocytes) dans la muqueuse intestinale et les ganglions mésentériques (MLNs) des patients atteints de MC et de CU.

Ces deux MII partagent de nombreuses similitudes mais représentent deux entités distinctes. A des fins de comparaison, nous avons donc restreint notre étude à des prélèvements coliques, localisation partagée par la CU et les MC iléo-coliques et coliques (excluant les MC iléales pures). Les données de la littérature sur les MNPs dans la muqueuse inflammatoire et les ganglions mésentériques étaient incomplètes, souvent contradictoires ou inexistantes lorsque nous avons débuté notre travail en 2013. Nos résultats de recherche apportent une meilleure compréhension des MNPs présents dans la muqueuse et les MLNs des patients atteints de MC et de CU, par la caractérisation extensive de leur phénotype, de leur signature moléculaire et de leur fonction sur les lymphocytes T mémoires présents dans la muqueuse intestinale et les ganglions mésentériques (Résultats, sections A, B et C). Notre étude a également décrit les interactions des basophiles avec les lymphocytes T mémoires (Résultats, section D). Nos données sur la rare sous-population de MNPs $\text{ClassII}^+\text{SIan}^+$ dans les MII (Annexe 1) et sur les neutrophiles (Annexe 2) dans la MC seront aussi abordées rapidement dans ce travail et présentées en annexe.

La première partie de l'introduction présente les généralités sur la maladie dans ses aspects cliniques et physiopathologiques en termes de génétique, d'anomalies épithéliales et de contribution des facteurs environnementaux. La seconde partie de l'introduction (et notamment celles sur les MNPs et les lymphocytes T) décrit de façon extensive la réponse immunitaire au cours des MII. Nous avons choisi de présenter une revue exhaustive des connaissances en 2018, intégrant notamment les concepts récents sur la plasticité des MNPs chez la souris et dans la

muqueuse humaine normale. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux patients atteints de MII et avons étudié les cellules de l'immunité innée sur une des plus larges cohortes de patients rapportée à ce jour. Notre travail montre, pour la première fois chez les patients atteints de MII, comment ces nouveaux concepts prennent place dans la physiopathologie de la maladie.

B. ASPECTS CLINIQUES DE LA MC ET DE LA CU

B.1. ÉPIDÉMIOLOGIE

Une méta-analyse récente, rassemblant 147 études d'incidence ou de prévalence des MII, confirme la forte prévalence et l'incidence croissante des MII à travers le monde (Ng et al., 2018). Depuis leur description respective en 1875 et 1932, l'incidence de la CU et la MC a rapidement augmenté au cours du XX^{ème} siècle dans les pays industrialisés. La plus haute prévalence est actuellement rapportée en Europe (CU : 505 pour 100 000 en Norvège; MC : 322 pour 100 000 en Allemagne) et en Amérique du Nord (CU : 286 pour 100 000 aux USA et 248 pour 100 000 au Canada; MC: 319 pour 100 000 au Canada). La prévalence des MII est donc supérieure à 0,3% en Amérique du Nord, en Océanie et dans de nombreux pays en Europe. Cependant, dans ces pays, l'incidence de la MC et de CU est maintenant stable voire décroissante. Par contre, depuis les années 1990, l'incidence augmente rapidement dans les pays nouvellement industrialisés en Afrique, en Asie et en Amérique du sud (Ng et al., 2018).

La CU affecte également les hommes et les femmes alors que le sex-ratio en MC est en faveur des femmes. Cependant, dans certaines régions de haute prévalence de MII, l'incidence de la MC chez les hommes est devenue équivalente à celle des femmes (Cosnes et al., 2011). Le pic de début de la maladie se situe entre 20 et 30 ans en MC et entre 30 et 40 ans en CU (Cosnes et al., 2011). Un autre pic vers 60-70 ans a aussi été rapporté. Enfin, les MII pédiatriques représentent 7 à 20% de tous les cas de MII selon les cohortes étudiées. Chez l'enfant, avant 14 ans, il y a une prédominance de MC chez le garçon et une prédominance de CU chez la fille (Cosnes et al., 2011).

B.2. PRESENTATION CLINIQUE

Les MII sont des maladies chroniques évoluant par poussées et rémissions, engendrant des douleurs abdominales, des diarrhées et des rectorragies. La MC peut affecter l'ensemble du tube digestif de la bouche à l'anus (Figure 1). Elle peut être iléale, iléocolique, colique, multi-étagée ou atteindre le tube digestif haut. Le colon est atteint chez 50 % des patients et, exclusivement, chez 10 à 20% d'entre eux (Cosnes et al., 2011). L'atteinte inflammatoire étant transmurale, la maladie peut se compliquer de fistules et de sténoses qui sont respectivement présentes chez 14% et 4,6% des patients au diagnostic (Thia et al., 2010). La CU n'affecte par contre que le gros intestin (Figure 1), débute dans le rectum (proctite ; 30 à 60% des patients) et peut s'étendre plus ou moins vers les segments coliques proximaux (colite gauche ; 16 à 45% des patients), pouvant se présenter comme une pancolite lorsqu'elle atteint l'ensemble du colon (15 à 35% des patients) (Ungaro et al., 2017). La CU progresse proximale chez 10 à 19% des patients après 5 ans et jusqu'à 28% des patients après 10 ans. Elle n'est pas pénétrante et il n'y a notamment pas d'atteinte anale qui fait alors évoquer une MC. Elle peut par contre se compliquer de dysmotilité colique, de dysfonction anorectale et de cancer colorectal en cas d'inflammation non contrôlée (Ungaro et al., 2017). Enfin, le diagnostic différentiel formel entre une MC et une CU est parfois impossible et la maladie est alors qualifiée de MII indéterminée.

La MC et la CU peuvent s'accompagner de manifestations extra-intestinales chez 25 à 40% des patients. Les plus fréquentes sont les atteintes articulaires (arthrites), cutanées (érythème noueux, pyoderma gangrenosum) et oculaires (uvéites, épisclérites). La cholangite sclérosante primitive survient chez 5% des patients atteints de CU et 2% des patients atteints de MC (Sairenji et al., 2017; Ungaro et al., 2017).

Le diagnostic des MII est basé sur des critères cliniques, biologiques (augmentation de la protéine C réactive, de la calprotectine fécale), endoscopiques et histologiques (Sairenji et al., 2017). En endoscopie, la MC se caractérise par des ulcérations segmentaires et focales du tube digestif alternant avec des zones de muqueuse saine. En CU, la muqueuse est érythémateuse, granuleuse et friable avec des érosions et des ulcérations. L'atteinte est continue et circonférentielle avec une démarcation claire entre la zone atteinte et la zone saine. Des scores de sévérité endoscopique ont été établis dans les deux maladies, les plus fréquemment utilisés étant le SES-CD ('simple endoscopic score in Cronh's disease') en MC et le score de Mayo endoscopique en CU (Sairenji et al., 2017) (Figure 1).

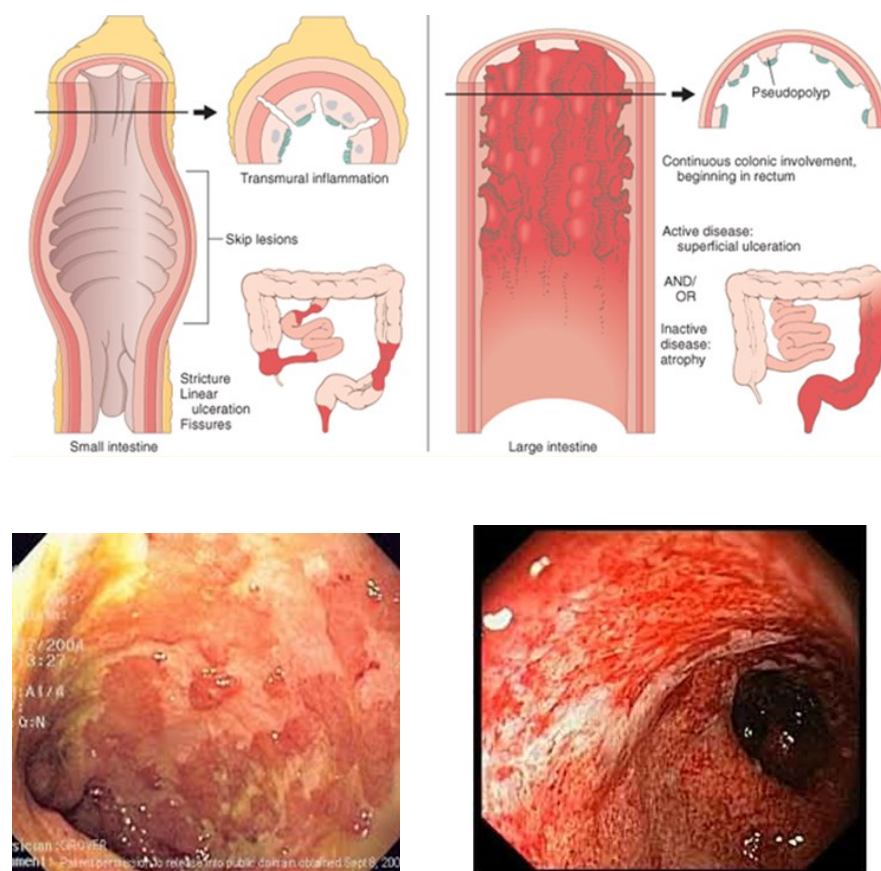


FIGURE 1 : LOCALISATION ET ASPECTS ENDOSCOPIQUES DE LA MALADIE DE CROHN (A GAUCHE) ET DE LA COLITE ULCEREUSE (A DROITE)
 2018 Anatomy Library: Anatomy and physiology of inflammatory bowel disease #692912 (Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International Public License)
 Photo endoscopie : image libre de droit (Creative commons CC BY-SA 3.0)

L'histologie de la CU montre une distorsion de l'architecture des cryptes, un infiltrat inflammatoire diffus et continu, limité à la muqueuse avec une plasmocytose basale, éventuellement associé à une cryptite (présence de neutrophiles à l'intérieur des cryptes épithéliales) ou des abcès cryptiques (présence de neutrophiles dans la lumière des cryptes), ainsi qu'une déplétion du mucus. En MC, une inflammation focale (augmentation variable de la cellularité au sein de la biopsie, non confinée à la zone superficielle) et une irrégularité cryptique focale sont caractéristiques dans le colon (Magro et al., 2013). Dans l'iléon, on peut en plus observer une irrégularité de l'architecture des villosités intestinales. La présence de granulomes non caséux (collection d'histiocytes épithéliodes) non pericryptiques est pathognomonique de la MC au sein des MII. Dans les spécimens chirurgicaux, des agrégats lymphoïdes transmuraux et des granulomes sont des caractéristiques typiques de la MC (Magro, 2013).

L'évaluation de la sévérité des MII a été récemment redéfinie en tenant compte 1) du fardeau inflammatoire, par la mesure objective de l'activité et de l'extension de la maladie ; 2) de la qualité de vie et de l'invalidité induite par la maladie ; 3) de l'évolution de la maladie, incluant le nombre de rechutes, les dommages structuraux et les manifestations extra-intestinales (Siegel et al., 2016). Ce concept est important car l'évaluation du fardeau global de la maladie conditionne les choix thérapeutiques proposés aux patients.

B.3. TRAITEMENT – CONCEPTS GENERAUX

Les MII sont pour l'instant incurables. Les buts du traitement visent à induire la rémission clinique et endoscopique et à la maintenir afin de minimiser les symptômes, d'améliorer la qualité de vie, mais surtout de prévenir la progression de la maladie et ses complications à moyen et long termes. Il a d'ailleurs été montré que l'obtention d'une rémission endoscopique (et pas seulement clinique) était associée à un meilleur pronostic à long terme (Shah et al., 2016). En effet, dans les deux maladies, l'échec du traitement médical ou l'apparition de complications (sténoses, abcès, fistules dans la MC et mégacolon toxique dans la CU) peuvent imposer un traitement chirurgical. Bien qu'en diminution, le risque de chirurgie demeurait de 15,6% après 15 ans d'évolution dans la CU et de 46,6% après 10 ans dans la MC, dans une étude parue en 2013 (Frolkis et al., 2013). Le choix du traitement médical dépend donc de la sévérité et de l'extension de la maladie. Les traitements actuellement disponibles et approuvés pour l'induction et le maintien de la rémission sont résumés dans la table 1 (Rawla et al., 2018).

Les CU légères à modérées sont traités par des 5-aminosalicylates (5-ASA). L'induction de la rémission dans les CU modérées à sévères nécessite un traitement par corticostéroïdes, et parfois par les inhibiteurs du TNF- α (infliximab, adalimumab, golimumab). L'anti-intégrine $\alpha 4\beta 7$ (vedolizumab) ou les inhibiteurs des jakus kinase 1 et 3 (tofacitinib) peuvent être également utilisés. Le maintien de la rémission peut être assuré par les 5-ASA chez les patients ayant des colites légères à modérées. Dans les colites modérées à sévères, les thiopurines (azathioprine, 6-mercaptopurine), les anti-TNF- α , le vedolizumab ou le tofacitinib peuvent être utilisés pour maintenir la rémission (Ungaro et al., 2017).

Dans la MC, le budésônide, un glucocorticoïde synthétique de faible absorption est recommandé en première ligne pour les maladies légères à modérées. Les antibiotiques sont utilisés chez les sujets ayant une maladie périanales ou un abcès. Dans les formes modérées à sévères, les corticostéroïdes sont utiles pour induire la rémission. Les anti-TNF- α (infliximab, adalimumab, certolizumab), l'anti-IL-12p40 (ustekinumab) et l'anti-intégrine α 4 β 7 (vedolizumab) peuvent être utilisés pour induire la rémission dans les formes sévères. Le maintien de la rémission est assuré par les thiopurines, le méthotrexate et/ou les agents biologiques (anti-TNF- α , anti-IL-12p40, anti-intégrine α 4 β 7) (Rawla et al., 2018; Sairenji et al., 2017).

Table 1 Summary of biologics and biosimilars approved for treatment in IBD

Name (innovator agent/ biosimilar)	Brand name (company)	IBD indication	Route of administration	Dosage regimen	
				Induction	Maintenance
Adalimumab (innovator)	Humira® (AbbVie)	UC and CD	SC	160 mg on day 1 and	40 mg every 4 weeks from day 29
Adalimumab-atto (biosimilar)	Amjevita™ (Amgen)			80 mg on day 15	
Adalimumab-adbm (biosimilar)	Cyltezo® (Boehringer Ingelheim)				
Certolizumab pegol (innovator)	Cimzia® (Union ChimiqueBelge)	CD	SC	400 mg at weeks 0, 2, and 4	200 mg 2-weekly/400 mg 4-weekly
Golimumab (innovator)	Simponi® (Janssen Biotech)	UC	SC	200 mg at week 0 and 100 mg at week 2	100 mg every 4 weeks
Infliximab (innovator)	Remicade® (Janssen Biotech)	UC and CD	IV	5 mg/kg IV at weeks 0, 2, and 6 (in CD alone	5 mg/kg every 8 weeks
Infliximab-dyyb (biosimilar)	Inflectra® (Celltrion)			10/kg may be given)	
Infliximab-qbtx (biosimilar)	Ixifi™ (Pfizer)				
Infliximab-abda (biosimilar)	Renflexis™ (Merck)				
Vedolizumab (innovator)	Entyvio® (Takeda Pharmaceuticals)	UC and CD	IV	300 mg at weeks 0, 2, and 6	300 mg every 8 weeks
Natalizumab (innovator)	Tysabri® (Biogen)	CD	IV infusion over 1 hour	300 mg every 4 weeks	
Ustekinumab (innovator)	Stelara® (Janssen Biotech)	CD	IV for induction SC for maintenance	≤55 kg =260 mg; 56–85 kg =390 mg; >85 kg =520 mg	90 mg every 8 weeks
Tofacitinib (innovator)	Xeljanz® (Pfizer)	UC	Per os	10 mg BID	5-10 mg twice a day

Abbreviations: CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; IV, intravenous; SC, subcutaneous; UC, ulcerative colitis.

Table 1 : Traitements biologiques approuvés dans les MII

Adaptée de Rawla P. J Inflamm Res. 2018 May

De nombreux autres médicaments sont en cours d'essais cliniques dans les MII (Coskun et al., 2017). Ces médicaments ayant pour cibles des voies immunologiques, ils seront abordés dans la partie discussion de ce travail à la lumière des informations sur la pathogénèse de la maladie décrites dans cette introduction et de nos résultats.

Enfin, d'autres stratégies thérapeutiques, telles que les modifications de la diète (Ruemmele, 2016) et la transplantation de microbiote fécal (Browne and Kelly, 2017) sont des stratégies émergentes dans les MII qui ne seront que rapidement abordés dans ce travail qui n'a pas étudié l'effet du microbiote sur la pathogénèse de la maladie.

C. PATHOGENESE COMPAREE DE LA MALADIE DE CROHN ET DE LA COLITE ULCEREUSE

Les MII résultent d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, microbiens et immunologiques qui rendent leur physiopathologie complexe et encore incomplètement expliquée.

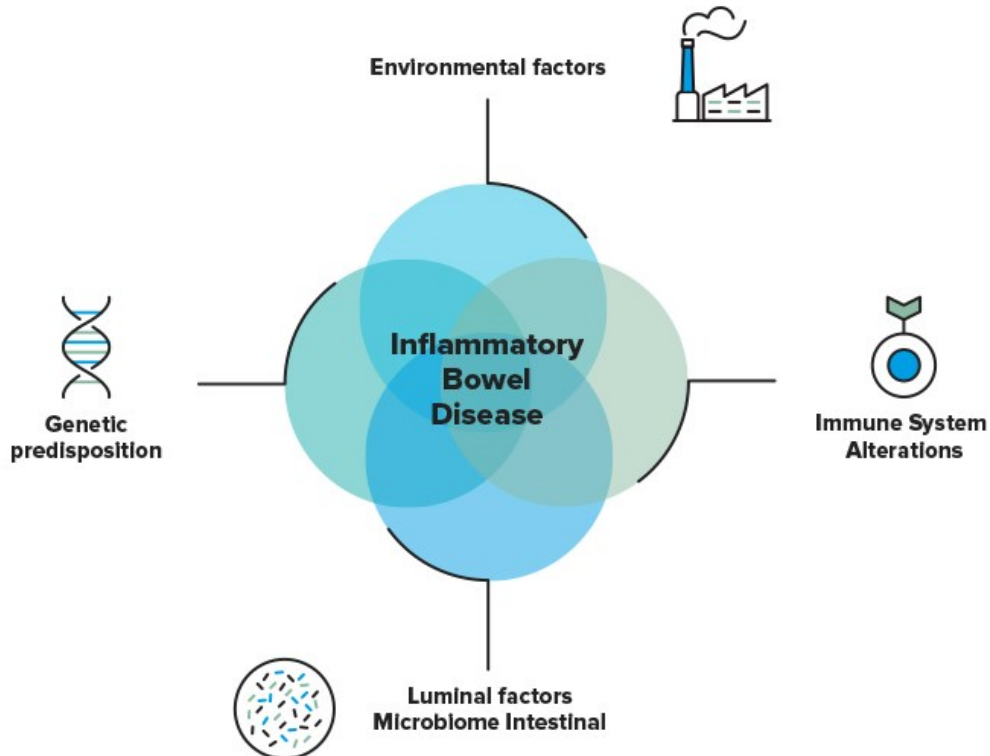


FIGURE 2 : ÉTIOLOGIE PLURIFACTORIELLE DES MII

Portal Clinic 2019 - Image libre de droit (Creative Commons license of Recognition - Non-Commercial - No derivative works (by-NC-nd))

C.1. APPORT DE LA GENETIQUE

C.1.1. GENOMIQUE/EPIGENOMIQUE

La contribution de la génétique dans la pathogénèse des MII est illustrée par les études épidémiologiques qui montrent que 8 à 14% des patients atteints de CU (Ungaro et al., 2017) et 15% des patients atteints de MC ont un membre de leur famille affecté par la maladie, alors que

la concordance est de 50% chez les jumeaux homozygotes et de moins de 10% chez les jumeaux dizygotes (Loddo and Romano, 2015). En outre, un enfant a un risque 26 fois plus élevé d'avoir une MC et 9 fois plus élevé d'avoir une CU si un membre de sa famille est atteint (Loddo and Romano, 2015). L'association entre des polymorphismes de certains gènes et le risque d'être atteint d'une MC ou d'une CU a été mise en évidence par de nombreuses études d'association pangénomique (GWAS : Genome Wide Association Studies) (Loddo and Romano, 2015). La plupart de ces polymorphismes de susceptibilité sont communs aux deux maladies ($n=110$), tandis qu'un petit nombre d'entre eux sont retrouvés spécifiquement chez les patients atteints de MC ($n=30$) ou de CU ($n=23$) (Jostins et al., 2012). Une étude trans-ethnique récente a retrouvé 38 autres loci, portant à plus de 200 les polymorphismes de susceptibilité aux MII (Liu et al., 2015). Cependant, ces polymorphismes combinés n'expliquent que 20 à 25% de tous les cas de MII et sont également retrouvés chez des patients sains (de Souza et al., 2017). Les études de corrélation génotype-phénotype ont montré l'association de polymorphismes de *NOD2* à la localisation iléale, d'*HLADR* à la localisation colique et de *MST1* (Macrophage stimulating 1) à l'âge précoce au diagnostic (Cleynen et al., 2016). Cependant, la plupart des polymorphismes n'induisent pas de phénotypes spécifiques et la majorité d'entre eux n'exercent finalement qu'un effet faible sur la maladie (de Souza et al., 2017). D'autre part, l'étude du génome des populations chinoises et japonaises démontre l'existence de polymorphismes de susceptibilité différents de ceux des populations d'ascendance juive et caucasienne, suggérant que les facteurs génétiques contribuent aux MII via des voies d'inflammation distinctes dans les populations asiatiques (de Souza and Fiocchi, 2016). Pour l'instant, il est donc encore difficile de comprendre la contribution d'un ou plusieurs polymorphismes combinés portés par le même patient dans l'induction ou la persistance de la maladie et d'utiliser isolément la génétique pour

distinguer une MC d'une CU. L'étude, dans une grande cohorte de patients, de la combinaison des polymorphismes génétiques présents chez les malades, montre que cette combinaison prédit la localisation de la maladie (MC iléale, MC iléo-colique, MC colique et CU) mais pas son évolution ni le devenir des patients, qui dépendraient majoritairement de facteurs environnementaux. Toutefois, certains polymorphismes géniques ont été plus particulièrement étudiés dans la MC (*NOD2*, *ATG16L1*, *ORMDL3*, *XBPI*, *AGR2*, *IL-23R*) ou la CU (*MUC2*, *HLA*) et seront rapportés ci-après en fonction de leur influence respective sur la fonction de la barrière épithéliale, de la composition du microbiote et de la nature de la réponse immunitaire.

Il faut toutefois noter que la majorité des polymorphismes associés aux MII résident dans des régions non-codantes du génome, régulatrices de l'expression génique. En particulier, les polymorphismes identifiés en MII sont très représentés dans les zones d'activateurs ('active enhancers') (McGovern et al., 2015). Certains locus de susceptibilité altèrent aussi des réseaux de gènes (de Souza et al., 2017). Tous ces gènes et ces réseaux sont donc affectés par des modifications épigénétiques qui surviennent avant les manifestations cliniques et tout le long de l'évolution de la maladie (Berg, 2016), et qui ont un impact sur la transition génotype/phénotype. Des études ont d'ailleurs rapportées des corrélations entre la méthylation de l'ADN ou la présence de microARN spécifiques avec l'état de la maladie en MC ou en CU (Nimmo et al., 2012; Polytarchou et al., 2015; Yi and Kim, 2015).

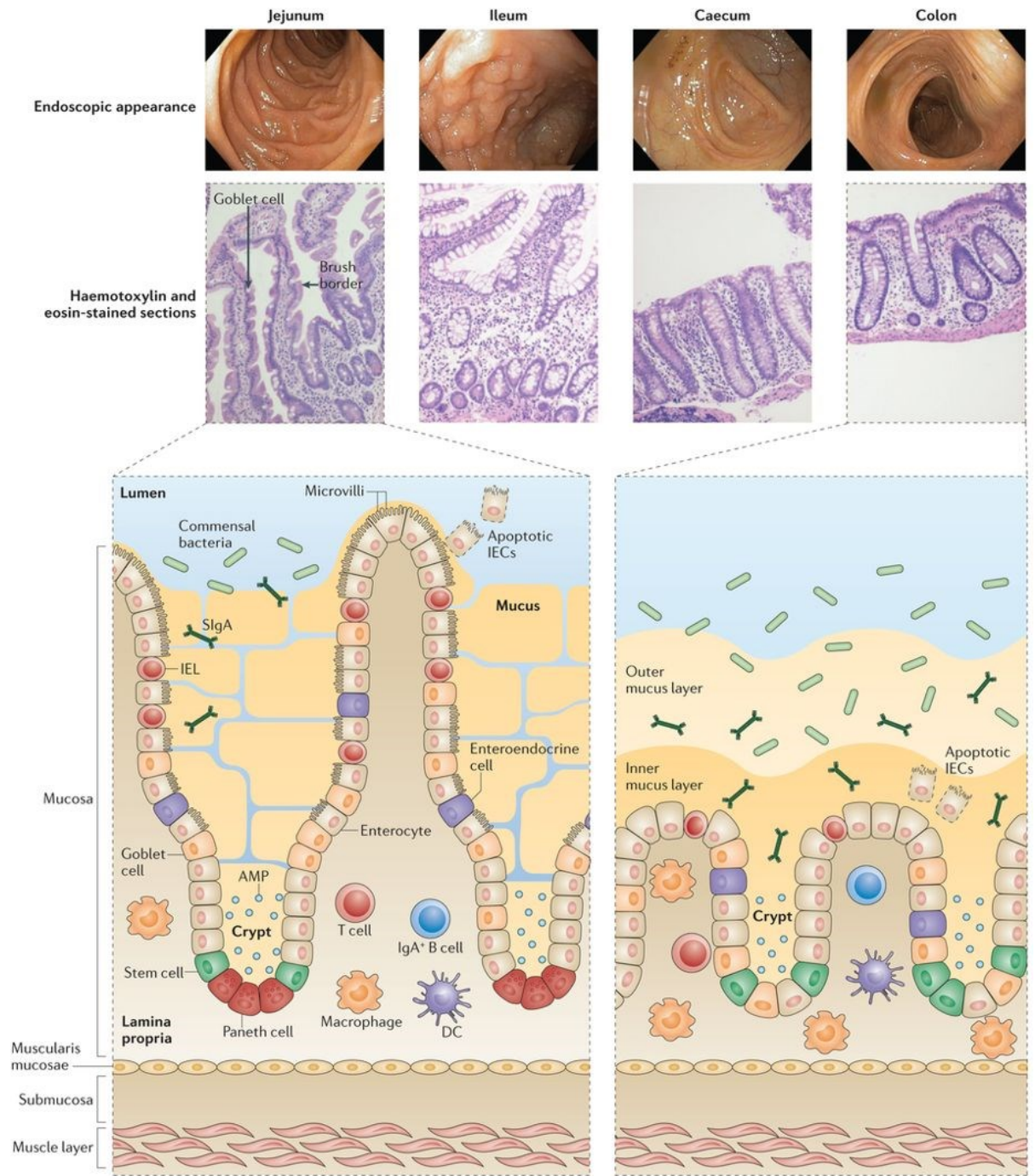
En conclusion, l'ensemble des facteurs génétiques ne participe que pour 30% de la causalité de la maladie et ne sont pas, pour la majorité, à eux seuls discriminant entre MC et CU.

C.1.2. CAS PARTICULIER DES MII MONOGENIQUES

Une population particulière de patients développe à un très jeune âge (avant 5 ans) des MII, regroupées sous le terme de VEO-IBD ('very early onset IBD'). Ces MII, en général sévères, ont la particularité d'être causées par des mutations monogéniques. Elles comprennent entre autres les déficits en IL-10/IL-10RA/IL10RB, la mutation de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), la granulomatose septique chronique, le syndrome de Wiskott-Aldrich, la glycogénose de type 1B, le déficit en TTC7A, le syndrome IPEX (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked) (Kelsen et al., 2015). Ces pathologies ne seront pas abordées dans ce travail qui n'a concerné que des patients adultes atteints de MII classiques. Cependant, les MII sont un spectre regroupant de multiples phénotypes et probablement de multiples immunophénotypes. Certaines maladies sont dominées par l'immunodéficience alors que chez d'autres l'hyperinflammation ou l'hyperimmunité domine (Peloquin et al., 2016). Une partie de ces pathologies ne sont d'ailleurs pas strictement monogéniques puisque seulement 30% des patients atteints de granulomatose septique chronique développe une atteinte digestive. Cette dernière implique donc la présence sous-jacente d'autres polymorphismes de susceptibilité aux MII et probablement des facteurs environnementaux (Uhlig and Powrie, 2018). La compréhension de la physiopathologie des VEO-IBD peut donc apporter des éclaircissements sur des mécanismes possiblement impliqués aussi dans les MII de l'adolescent et de l'adulte.

C.2. IMPLICATIONS DE LA BARRIERE EPITHELIALE

L'épithélium intestinal est constitué d'une monocouche cellulaire, reposant sur la lamina propria. Elle contient différents types de cellules: entérocytes, cellules à gobelet, cellules neuroendocrines et pour l'intestin grêle, cellules de Paneth et cellules M; toutes dérivant d'une cellule souche épithéliale intestinale commune. L'épithélium forme une barrière, assurée par des jonctions serrées entre les entérocytes. Il est renouvelé tous les 2 à 3 jours, la prolifération de cellules épithéliales depuis les cryptes, suivie de leur migration vers les villosités dans l'intestin grêle ou vers la surface dans le colon, étant contrebalancée par l'apoptose et la perte des entérocytes en surface. Il est recouvert par une couche de mucus dans l'iléon, deux couches dans le colon: une interne, dense, riche en peptides antibactériens, contenant une faible densité bactérienne; une externe, plus perméable, contenant des microbes. Ce mucus est essentiel afin de protéger l'épithélium du dense environnement bactérien qui l'entoure. Cependant, la relation entre le mucus et le microbiote est complexe et réciproque puisque certaines propriétés du mucus dépendent de la composition du microbiote (de Souza and Fiocchi, 2016; Mowat and Agace, 2014).



Nature Reviews | Immunology

FIGURE 3 : HISTOLOGIE DE LA MUQUEUSE INTESTINALE GRELE ET COLIQUE NORMALE

D'après Nat Rev Immunol. 2014 Oct;14(10):667-85 (<https://doi.org/10.1038/nri3738>)

Reprinted by permission from Springer Nature (Licence number : 4493580530668).

C.2.1. ANOMALIES DE LA BARRIÈRE ET MALADIE DE CROHN

C.2.1.1. ANOMALIES DES CELLULES DE PANETH

Chez l'humain, la contribution exacte des cellules de la barrière épithéliale à la pathogénèse de la MC n'est pas claire, cependant les exemples cités ci-après sont une démonstration, dans des modèles murins, du concept d'interactions entre des facteurs génétiques et microbiens dans la pathogénèse de la maladie.

Les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes intestinales dans l'intestin grêle, pourraient contribuer à la pathogénèse de la MC lorsque que leur fonction est anormale. Elles sécrètent des peptides antimicrobiens (AMP) et des médiateurs inflammatoires qui sont essentiels à l'élimination des bactéries (Cader and Kaser, 2013). Un niveau réduit de peptides antimicrobiens (défensines) a été rapporté en MC en comparaison avec la CU. Les patients avec une MC iléale ont une expression diminuée de défensines par leurs cellules de Paneth, qui est encore plus prononcée chez les patients avec une mutation *NOD2* (Wehkamp *et al.*, 2005). En effet, plusieurs facteurs génétiques clés impliqués dans la MC, dont *NOD2* et *ATG16L1*, affectent la fonction des cellules de Paneth.

NOD2 code un récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR : pattern recognition receptor) cytosolique impliqué dans la détection des bactéries. Son activation par le N-acetyl muramyl dipeptide (MDP) dérivé des peptidoglycanes bactériens, conduit à l'activation subséquente du facteur nucléaire NF- κ B (Biswas *et al.*, 2010). Même si *NOD2* est aussi exprimé dans les cellules dendritiques et les macrophages et que la contribution de son expression dans les cellules épithéliales à la maladie est débattue, les souris *NOD2*^{-/-} de même que les patients porteurs d'un polymorphisme de susceptibilité de *NOD2* ont des niveaux diminués de défensines α (Kobayashi *et al.*, 2005). Toutefois, elles ne développent pas d'inflammation intestinale

spontanée, et une infection par *Helicobacter hepaticus* est requise pour induire une iléocolite associée à une réponse de type Th1 (Biswas et al., 2010). Ainsi, la présence d'un polymorphisme de susceptibilité et des anomalies épithéliales qui lui sont associées est insuffisante à l'induction de la MC.

ATG16L1 est un autre exemple de gène impliqué dans la MC dont les anomalies induisent une dysfonction des cellules épithéliales qui pourraient être impliquée dans la pathogénèse de la maladie. *ATG16L1* est impliqué dans les processus d'autophagie, un processus catabolique de la cellule permettant la dégradation d'un composé intracellulaire au sein d'un autophagolysosome (Cader and Kaser, 2013). Les patients porteurs du polymorphisme associé à la MC (T300A) ont des altérations structurelles de l'appareil sécrétoire et des anomalies moléculaires dans leurs cellules de Paneth (Cadwell et al., 2010). Des souris homozygotes pour un variant *ATG16L1* hypomorphique ont des changements similaires dans leurs cellules de Paneth mais uniquement en présence d'un norovirus murin. Cependant, dans ce modèle également, l'infection spécifique par le norovirus n'était pas suffisante pour induire l'inflammation intestinale (Cadwell et al., 2010).

La façon dont les polymorphismes géniques combinés peuvent affecter la fonction des cellules épithéliales est encore illustrée par l'existence d'interactions fonctionnelles directes entre NOD2 et ATG16L1, qui sont impliqués de concert dans les processus d'autophagie (Cader and Kaser, 2013). En effet, NOD2 induit l'autophagie dans les cellules épithéliales en recrutant ATG16L1 au site d'entrée des bactéries. Ainsi, une dysfonction de NOD2 chez la souris ou chez l'humain porteur d'un polymorphisme nuit à la capture des bactéries intracellulaires dans la membrane autophagique et donc à leur destruction (Kobayashi et al., 2005). De même, l'induction de l'autophagie par la stimulation de NOD2 par le MDP est anormale lorsque que le gène

d'ATG16L1 porte le variant T300A (Cader and Kaser, 2013). Aussi, une interaction entre *ATG16L1* et *IRGM* (autre gène de susceptibilité de la MC) impliqué lui aussi dans les processus d'autophagie a été rapportée dans la MC (de Souza and Fiocchi, 2016).

Enfin, en plus des anomalies des voies de signalisation bactérienne (*NOD2*) et de l'autophagie (*ATG16L1*, *IRGM*, *NOD2*), le stress du réticulum endoplasmique est une autre voie qui participe aux anomalies des cellules de Paneth. Des polymorphismes de plusieurs gènes impliqués dans le stress du réticulum endoplasmique (*ORMDL3*, *XBPI*, *AGR2*) sont associés avec la MC. Cette voie a pour rôle d'éliminer les protéines mal repliées, fonction cruciale dans une cellule sécrétoire comme la cellule de Paneth. Les délétions génétiques de ces gènes chez la souris conduisent à l'apparition d'anomalies dans les cellules de Paneth et à une susceptibilité accrue à l'inflammation intestinale (Cader and Kaser, 2013).

C.2.1.2. AUTRES ANOMALIES EPITHELIALES

A côté des anomalies des cellules de Paneth, l'augmentation de la perméabilité intestinale a été décrite depuis longtemps chez les patients avec MC et est positivement corrélée à une augmentation du risque de rechute (de Souza and Fiocchi, 2016). Les souris déficientes pour *NOD1* et *NOD2* montrent, en plus de la diminution de la production de peptides anti-bactériens, une diminution de l'expression d'E-cadherine et une augmentation de la perméabilité intestinale (Wallace et al., 2014). Cependant, les changements dans la perméabilité intestinale sont assez communs chez l'humain et peuvent être induits par de nombreux facteurs, rendant leur interprétation difficile dans la MC.

D'autre part, le contrôle de l'invasion par des bactéries pathogènes dépend de la présence compétitive de bactéries commensales et de la capacité de celles-ci à adhérer à l'épithélium.

L'antigène H1, oligosaccharide permettant l'adhésion bactérienne, est régulé par le gène *FUT2* dont certains polymorphismes sont associés à la MC. En effet, les sujets non-sécréteurs de H1 ont une susceptibilité accrue à la MC (Wallace et al., 2014).

Enfin, les patients atteints de MC ont une déplétion des cellules à mucus et un mucus anormal (Wallace et al., 2014). L'expression de l'ARNm de *MUC-1* est réduite dans les iléons inflammatoires de MC, et celui de *MUC3*, *MUC4* et *MUC5B* dans l'iléon non-inflammatoire (de Souza and Fiocchi, 2016).

C.2.2. ANOMALIES DE LA BARRIÈRE ET COLITE ULCEREUSE

Les anomalies de la barrière intestinale (entérocytes et mucus) sont considérées comme des déterminants majeurs de la pathogénèse de la CU (Ungaro et al., 2017). Celle-ci se caractérise en effet par une perte des cellules à gobelet et de la sécrétion des mucines glycosylées qui composent le mucus (Cader and Kaser, 2013). Chez la souris, la déplétion en *Muc2*, qui code le principal composant de la mucine, résulte en une colite spontanée (Van der Sluis et al., 2006), démontrant le rôle majeur du mucus dans la prévention de la pénétration bactérienne et de l'inflammation intestinale. De plus, en cohérence avec un risque accru de CU en présence de polymorphismes de loci impliqués dans l'intégrité de la barrière épithéliale (*HNF4A*, *CDH1*) (Jostins et al., 2012), la perméabilité intestinale est augmentée chez les patients atteints de CU (Ungaro et al., 2017).

A côté des anomalies du mucus, un défaut des entérocytes eux-mêmes a été proposé dans la CU. Chez les patients atteints de CU mais pas de MC, l'expression, dans les entérocytes, de *PPAR- γ* (peroxydase prolifération-activated receptor- γ), un régulateur négatif de l'inflammation dépendante de NF- κ B, est réduite (Bouguen et al., 2015; Dubuquoy et al., 2003). Son rôle est

confirmé par l'efficacité des traitements agonistes de *PPAR-γ* chez la souris et l'humain dans le traitement de la colite (Bouguen et al., 2015).

C.2.3. CONCLUSION

Des polymorphismes de susceptibilité à la MC et la CU peuvent donc être associés avec des anomalies spécifiques des cellules épithéliales, du mucus qu'elles sécrètent et de la perméabilité de la barrière. Cependant, même si ces anomalies altèrent l'élimination des bactéries et/ou favorisent la translocation bactérienne, elles ne sont généralement pas suffisantes pour induire à elles seules la maladie. En effet, des signaux provenant du système immunitaire (IFN- γ , IL-17, IL-22) et du microbiote (notamment, via les TLRs) ont un effet sur l'épithélium en régulant l'intégrité de la barrière épithéliale et sa fonction (Ni et al., 2017; Wallace et al., 2014). Un microbiote normal est donc indispensable pour restaurer l'homéostasie épithéliale après une lésion muqueuse aigue (Ni et al., 2017). Dans ce contexte, des changements du microbiote ou d'autres facteurs environnementaux décrits ci-après, pourraient ainsi contribuer au déclenchement de la maladie chez certains sujets prédisposés par des anomalies fonctionnelles sous-jacentes de leurs cellules épithéliales.

C.3. CONTRIBUTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DU MICROBIOTE

C.3.1. ROLE DES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX EXTRINSEQUES

L'émergence massive des maladies inflammatoires dans les pays industrialisés durant les cinquante dernières années et leur progression actuelle dans les pays émergents, concomitantes de changements sociétaux importants, suggèrent fortement un rôle clé des facteurs environnementaux dans l'apparition des MII. L'amélioration des conditions sanitaires et la diminution des maladies infectieuses rendent l'hypothèse hygiéniste plausible. Cependant, de nombreuses questions demeurent : avons-nous perdu des micro-organismes (*H. pylori*, helminthes, virus, bactéries) qui nous protégeaient des MII ? Sommes-nous exposés à de nouveaux agents favorisant les MII (antibiotiques, produits chimiques, polluants, additifs alimentaires, agent de préservation) ? Y-a-t-il des éléments manquant dans notre alimentation (vitamines, antioxydants) ou avons-nous des composants en excès dans notre alimentation moderne ? Y-a-t-il un rôle du stress sur notre sécrétion neuroendocrine ? De nombreuses études, rapidement résumées ci-après, ont montré certaines associations des MII avec des facteurs extrinsèques. Cependant, les théories actuelles sont plus en faveur de la combinaison d' 'attaques' multiples et séquentielles par divers facteurs que du rôle d'un facteur spécifique dans le déclenchement de la maladie (de Souza et al., 2017).

Le tabagisme favorise la MC alors que l'arrêt de la cigarette est un facteur favorisant la CU. L'appendicectomie protège de la CU, d'autant plus qu'elle est pratiquée tôt dans la vie (Ungaro et al., 2017). La prescription d'antibiotiques dans l'enfance est un facteur de risque de MII, plus particulièrement de MC et notamment de MC pédiatrique (Ungaro et al., 2014). La prise d'anti-inflammatoires non-stéroïdiens augmente le risque de développer une MII (Ananthakrishnan et al., 2012). S'il n'a pas été démontré que le mode de délivrance, qui influence fortement la

composition du microbiote, était associé à un risque de MII, l'allaitement maternel est par contre protecteur aussi bien pour la MC adulte et pédiatrique que pour la CU (Klement et al., 2004). L'urbanisation est un facteur de risque de MII et une étude canadienne a récemment montré que les personnes vivant en milieu rural, et particulièrement les jeunes enfants avaient un risque diminué de MII (Benchimol et al., 2017). La pollution atmosphérique (NO₂, SO₂, CO, particules fines) favoriserait les MII et le taux d'hospitalisations (Kaplan et al., 2010). Une alimentation riche en fruits (Amre et al., 2007), en fibres des fruits (mais pas des graines ou des céréales) (Ananthakrishnan et al., 2013) protège contre la MC alors qu'un apport en acides gras polyinsaturés n-3 diminue le risque de CU (Ananthakrishnan et al., 2014). Une alimentation riche en protéines favoriserait par contre les MII (Jantchou et al., 2010). Enfin les micronutriments, comme le zinc et la vitamine D, qui influencent respectivement la perméabilité de la barrière épithéliale et la réponse immunitaire, protégerait contre la MC (Ananthakrishnan et al., 2018). Il faut toutefois noter que ces facteurs de risque ou de protection semblent spécifiques des populations étudiées puisqu'ils diffèrent de ceux observés dans les populations asiatiques (Ng et al., 2015).

Il est probable qu'un certain nombre de ces facteurs agissent indirectement en modifiant la flore commensale et en favorisant ainsi le risque de développer une MII (Ananthakrishnan et al., 2018).

C.3.2. ROLE DU MICROBIOTE INTESTINAL

C.3.2.1. MICROBIOTE INTESTINAL CHEZ LE SUJET SAIN

La lumière intestinale contient 10^{12} micro-organismes par gramme de selles. Alors que ces bactéries ont des fonctions métaboliques indispensables à leur hôte, ce dernier doit assurer la régulation d'un délicat équilibre entre la tolérance de ces microbes et la vigilance envers les bactéries qui pourraient lui nuire (Cader and Kaser, 2013). Le maintien de cette homéostasie est sous le contrôle réciproque des bactéries et de leur hôte: le microbiote est contrôlé, entre autres, par les produits des cellules épithéliales (mucus, défensines, RegIII γ) et les IgA; en retour, l'immunité muqueuse intestinale est en partie régulée par le microbiote (Wallace et al., 2014).

Le microbiote intestinal normal se compose à plus de 98% de bactéries. Parmi celles-ci, 90% appartiennent aux phylums des Bacteroidetes et des Firmicutes. On y retrouve également des Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria et Verrucomicobacteria. Les trois genres les plus représentés dans les selles sont Bacteroides (Bacteroidetes), Faecalibacterium (Firmicutes) et Bifidobacterium (Acinetobacteria). Chez l'adulte, la composition du microbiote est relativement stable au cours du temps, malgré des changements temporaires après exposition à divers facteurs environnementaux, mais hautement variable d'un individu à l'autre (Human Microbiome project consortium (2012)).

C.3.2.2. NATURE DE LA DYSBIOSE CHEZ LES PATIENTS AVEC MC ET CU

Des anomalies qualitatives et quantitatives de la composition du microbiote intestinal (dysbiose) ont été décrites chez les patients atteints de MC et de CU (Andoh et al., 2011). Globalement, il existe une diminution de la diversité bactérienne dans les MII. Dans la MC, on note une altération de l'abondance relative des différentes espèces bactériennes avec une

augmentation des Proteobacteria (comme les Enterobacteriaceae, dont *E. coli*), des Bacteroidetes et des Fusobacteria aux dépens des Firmicutes (notamment, *Faecalibacterium prausnitzii*) (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011; Sokol et al., 2009), alors que les Firmicutes et les Proteobacteria sont plus fréquemment observées dans la CU (Forbes et al., 2016). Le microbiote des patients atteints de MC est caractérisé par une plus grande dysbiose (microbiome plus altéré et moins stable) que celle retrouvée en CU (où le microbiote est plus proche de celui des sujets sains) (Pascal et al., 2017). Aussi, le microbiote de patients avec des MC iléales diffère de celui des patients avec une maladie colique (Willing et al., 2010). Il faut noter que ces changements de la composition microbienne conduisent aussi à des altérations métaboliques (par exemple des altérations des acides gras à chaînes courtes produit par les bactéries à partir des fibres alimentaires) qui ont probablement des conséquences plus importantes sur la physiopathologie des MII que la dysbiose elle-même (Ni et al., 2017; Quevrain et al., 2016).

La contribution de pathobiontes spécifiques (microorganismes commensaux, qui sous certaines influences génétiques ou environnementales peuvent causer une MII) dans l'induction de la MC et de la CU est difficile à établir. Le pathobionte le plus décrit est l'*Escherichia coli* adhérent-invasif (AEIC), présent chez 22% des patients avec une MC iléale chronique (6% des contrôles) et 36% des nouveaux iléons terminaux formés après une résection chirurgicale (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011). AEIC est capable d'envahir les cellules épithéliales, de survivre et de se répliquer dans les M ϕ . Via son pili et son flagelle, il facilite, de manière dépendante de CEACAM6, la liaison et l'invasion des cellules épithéliales. Les souris surexprimant CEACAM6 dans leurs cellules épithéliales sont d'ailleurs colonisées par AEIC et présentent une inflammation intestinale avec des ulcérations et une infiltration neutrophilique. D'autres agents microbiens ont été rapportés en MC (*Mycobacterium avium paratuberculosis*) et en CU

(*Fusobacterium nucleatum*) mais les pathobiontes ne peuvent pas être considérés comme des agents causals individuels et spécifiques car leur interaction avec les autres membres du microbiote intestinal est nécessaire pour causer la maladie (Chassaing and Darfeuille-Michaud, 2011).

Plus récemment, les études ont été étendues aux autres micro-organismes comme les virus et les champignons. Le virome intestinal isolé à partir d'échantillons fécaux montre une prédominance de bactériophages et notamment, une augmentation des séquences de Caudovirales dans des biopsies iléales de patients avec MC et des lavages intestinaux de patients pédiatriques (Norman et al., 2015). Cette augmentation est associée à une diminution de la diversité bactérienne. L'effet du virome, qui pourrait être direct ou via son effet sur le microbiote, n'est donc pas clairement établi à ce jour (Ni et al., 2017). Les études sur le mycobiome fécal ou muqueux montrent une augmentation de *Basidiomycota*, *Ascomycota* et *Candida albicans* mais sont peu reproductibles avec une grande diversité selon les cohortes étudiées (Ni et al., 2017; Zuo and Ng, 2018). Cependant des études chez la souris suggèrent un rôle plausible des champignons sur la santé intestinale, d'autant plus que plusieurs gènes de susceptibilité aux MII (*CARD9*, *CLEC7A*, *RELA*), sont impliqués dans la réponse anti-fongique (Iliev et al., 2012; Lamas et al., 2016).

C.3.2.3. DYSBIOSE, CAUSE OU CONSEQUENCE EN MC ET CU ?

Malgré la présence d'un consensus sur l'existence d'une dysbiose chez les patients atteints de MII, la nature causale de cette altération du microbiote dans l'induction de la maladie reste à prouver. La réponse inappropriée à la flore est-elle due à un manque de tolérance vis-à-vis des bactéries commensales en raison d'une réponse immunitaire défectueuse ou à une altération primaire du microbiote (de Souza et al., 2017) ?

Il a été bien démontré chez la souris que le microbiote influence le développement du système immunitaire de l'hôte. La symbiose entre microorganismes et hôte est d'abord illustrée par le fait qu'en l'absence de microbiote, le système immunitaire est immature et défectueux. Une colonisation précoce de l'intestin par des bactéries est en effet essentielle au développement et à la maturation du système immunitaire (Kamada et al., 2013). La présence de bactéries filamenteuses segmentées dans la lamina propria iléale murine est nécessaire à la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th17 (Atarashi et al., 2015). De plus, l'exposition précoce des souris aux Clostridium cluster IV et XIVa promeut la présence de lymphocytes T régulateurs dans la muqueuse colique (Atarashi et al., 2013). Notamment, la colonisation précoce serait un facteur déterminant dans le risque de développer une MII. En effet, la période pendant laquelle sont colonisées les souris axéniques a un impact sur la présence de certaines cellules immunitaires et peut ainsi modifier la susceptibilité à la colite (Olszak et al., 2012). Des altérations primaires du microbiote pourraient donc chez l'humain, avoir un impact précoce sur le développement du système immunitaire et induire des anomalies favorisant le développement d'une MC ou d'une CU.

D'autre part, l'altération des capacités d'élimination des bactéries décrite dans la MC rend plausible un scénario dans lequel cette mauvaise élimination bactérienne induirait une réponse immunitaire adaptative compensatoire et une inflammation chronique (de Souza et al., 2017). Des études sur des jumeaux homozygotes, discordants à la fois pour la MII et la composition de leur microbiome, suggèrent que le microbiote aurait un rôle plus grand que les facteurs génétiques ou environnementaux dans l'induction de la maladie (Willing et al., 2010). Cependant, ces études peinent à démontrer un lien de cause à effet en raison de l'absence de

données sur le moment de la dysbiose par rapport au début de la maladie. Une étude pédiatrique chez des patients nouvellement diagnostiqués avec une MC et non traités a montré qu'il existait une dysbiose qui pourrait précéder et corrélérer avec l'inflammation (Gevers et al., 2014). Ceci suggère que les changements du microbiote pourraient apparaître tôt dans les MII et contribuer ainsi à induire la maladie.

A l'inverse du rôle pro-inflammatoire que certaines bactéries comme AIEC pourraient jouer dans l'induction des MII, une autre hypothèse est que les MII pourraient être causées par la diminution de certains microorganismes ayant un rôle protecteur dans l'intestin. En effet, chez la souris, le polysaccharide A produit par *Bacteroides fragilis* peut supprimer la production d'IL-17 et améliorer la colite (Sokol et al., 2008). De plus, un nombre réduit de *Faecalibacterium prausnitzii*, aux propriétés anti-inflammatoires, est retrouvé chez les patients avec une MC iléale ayant un risque accru de récurrence post-opératoire après résection chirurgicale (Quevrain et al., 2016; Sokol et al., 2009).

Enfin, en MC, la diversion des selles induit une rémission clinique et endoscopique dans le segment sous-jacent alors que des rechutes surviennent en post-opératoire après exposition au contenu bactérien (D'Haens et al., 1998). Chez la souris, dans un modèle d'iléite, le phénotype de la maladie est corrélé avec l'intensité de la dysbiose et le transfert de selles peut transférer la maladie à des souris axéniques (Kontoyiannis et al., 1999).

C.3.2.3.b. CONSEQUENCE

A contrario, l'inflammation en soi pourrait être seule responsable de la dysbiose observée. En effet, l'inflammation est un état oxydatif et les altérations métaboliques associées à cet état pourraient promouvoir la croissance des bactéries aérotolérantes telles que les

Proteobactéria et les Actinobacteria, dont l'abondance relative augmente dans les MII (Ni et al., 2017).

La dysbiose ne pourrait donc être pertinente qu'en présence d'autres facteurs environnementaux et immunitaires. En faveur de cette hypothèse, le mode de délivrance, connu pour affecter nettement le microbiote, n'est pas en soi un facteur de risque de MII (Ananthakrishnan et al., 2018).

D'autre part, les traitements visant à traiter la MC et la CU en modifiant la flore (probiotiques, diète et FMT) n'ont pas encore apporté de preuve définitive sur le rôle du microbiote dans les MII (Ni et al., 2017). En dehors du VSL3 (un mélange de huit souches bactériennes) montrant un effet thérapeutique dans la CU, les probiotiques et les prébiotiques n'ont pas fait la preuve de leur efficacité (Paramsothy et al., 2017). Deux études de FMT, contre placebo dans la CU, ont donné des résultats contradictoires (Zuo and Ng, 2018). Toutefois, une étude récente, randomisée, en double aveugle, contre placebo utilisant les selles d'un pool de donneurs, montre que des doses intensives induisent une rémission clinique et endoscopique chez 27% (vs 8% dans le groupe placebo) en CU (Paramsothy et al., 2017).

C.3.2.4. CONCLUSION

La contribution formelle des modifications du microbiome, virome et fungome dans la maladie n'est donc pas facile à établir car les facteurs environnementaux (diète, médicaments, xénobiotiques), immunitaires et l'inflammation elle-même contribuent à la dysbiose (Ni et al., 2017). Sachant que les facteurs génétiques influencent aussi le microbiote (Goodrich et al., 2014; Lamas et al., 2016), celui-ci est donc propre à chaque individu aboutissant à une maladie très personnalisée médiée par un set unique de facteurs pathogéniques. Ceci est particulièrement plausible dans la MC qui se décline en de nombreux phénotypes différents.

C.4. REPONSE IMMUNITAIRE

L'ensemble des signaux émis par les facteurs extrinsèques et intrinsèques (épithélium et microbiote) induit une réponse de l'hôte, elle-même influencée par le profil génétique qui lui est propre, qui peut se traduire par une inflammation chronique anormale caractéristique des MII. Nous détaillerons le rôle des différents acteurs de la réponse immunitaire dans les MII, en particulier celui des MNPs et lymphocytes T mémoires qui ont été l'objet de notre travail.

C.4.1. ROLE DES CELLULES INNEES DANS LES MII

C.4.1.1. PHAGOCYTES MONONUCLEES (MNPs)

Les MNPs, cellules présentes dans tous les tissus, comprennent les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ils partagent des similitudes, notamment l'aptitude à phagocyter, mais possèdent des particularités morphologiques, phénotypiques, moléculaires et fonctionnelles faisant leur spécificité. Récemment, la classification des MNPs a été profondément remaniée, notamment depuis les découvertes faites sur leur ontogénie. Les nouvelles nomenclature, classification et caractéristiques cellulaires, basées essentiellement sur des données obtenues dans le sang seront donc introduites avant de détailler les différentes populations de MNPs dans la muqueuse intestinale et les MLNs, qui sont l'objet principal de notre étude.

C.4.1.1.a. NOMENCLATURE, CLASSIFICATION, ONTOGENIE DES MNPs

La classification des MNPs, et plus particulièrement la distinction entre les DCs et les M ϕ , a été longtemps rendue difficile par l'existence de marqueurs de surface communs entre les différentes sous-populations de MNPs (MHCII, CD11c, et CD64 chez l'humain) (Heidkamp et al., 2016; Sichien et al., 2017). A la lumière des découvertes récentes sur l'ontogénie des

macrophages, la classification actuelle subdivise les MNPs en cellules dendritiques (DCs), macrophages (M ϕ), et cellules dérivées des monocytes (Guilliams and van de Laar, 2015) (Figure 4). De plus, les approches non supervisées par cytométrie de masse ou séquençage de l'ARN à l'échelle de la cellule unique (scRNA-seq) sont en train de redéfinir de manière non-biaisée l'identité des sous-populations de MNPs, telles que décrites ci-après.

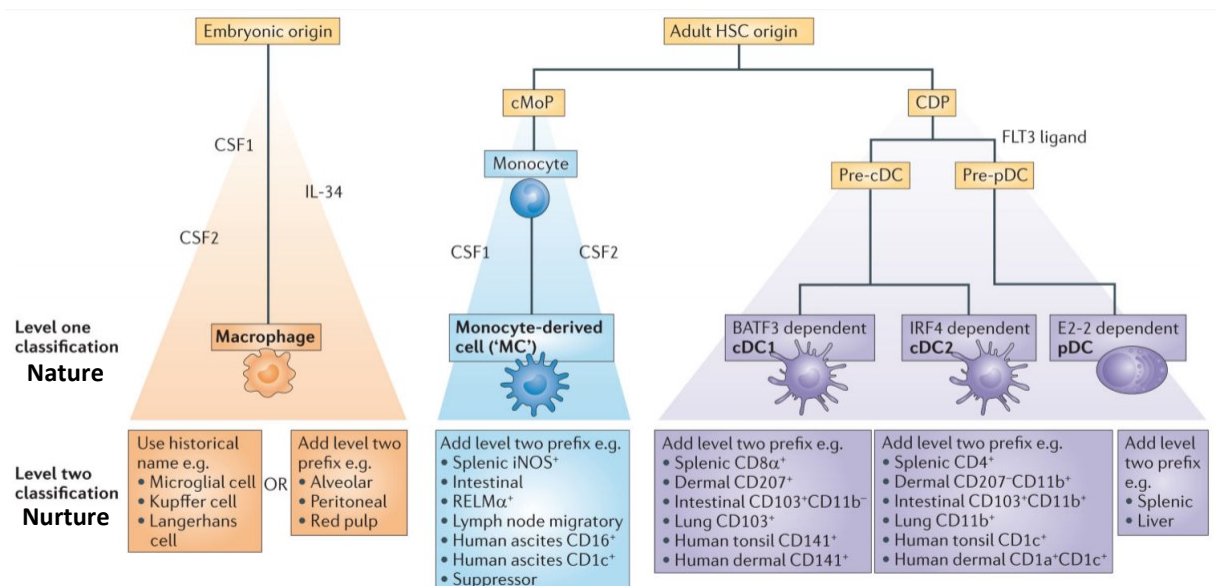


FIGURE 4: DEUX NIVEAUX DE NOMENCLATURE POUR LA CLASSIFICATION DES PHAGOCYTES MONONUCLÉÉS

D'après Guilliams *et al.* Nat Rev Immunol. 2014 Aug; 14(8): 571–578.

Reprinted by permission from Springer Nature (Licence number : 4485121494257).

Les MNPs sont définis sur la base de leur ontogénie (niveau 1 de nomenclature), puis par leur fonction, leur localisation et/ou leur morphologie (niveau 2 de nomenclature). Cette classification définit trois principaux groupes de cellules : M ϕ embryonnaires, cellules dérivées des monocytes, DCs classiques.

C.4.1.1.a.i.i. CELLULES DENDRITIQUES

Les DCs sont des cellules présentatrices d'antigène professionnelles (APCs) ayant un rôle central dans l'orchestration de la réponse immunitaire. Sur le plan ontogénique, les DCs conventionnelles (cDCs) dérivent de précurseurs médullaires produit dans la moelle osseuse, dont le développement est dépendant du facteur de transcription Flt3 (Sichien et al., 2017). Elles

migrent de la moelle vers le sang, puis dans les tissus où elles patrouillent à la recherche d'antigènes du soi ou étrangers. Elles les acquièrent par différents mécanismes, incluant l'endocytose via des récepteurs de surface et la macropinocytose. Après leur capture, elles subissent un processus d'activation qui induit leur mobilité, via l'augmentation de l'expression de CCR7. CCR7 interagit avec CCL21, sécrété par les cellules endothéliales des lymphatiques terminaux, qui sont équipés d'une membrane fenêtrée et de valves permettant l'entrée des DCs dans les vaisseaux lymphatiques et leur migration vers les ganglions drainants. Elles entrent dans le ganglion via le sinus sous-capsulaire puis dans le parenchyme via un processus dépendant encore de CCR7 (Worbs et al., 2017). Elles rejoignent alors la zone T où elles présentent les peptides antigéniques à des lymphocytes T naïfs (signal 1, par interaction avec le TCR), induisant leur prolifération et leur polarisation en différents types de lymphocytes T effecteurs spécifiques d'antigène, en fonction des signaux additionnels délivrés par la DC elle-même ou d'autres cellules présentes dans le micro-environnement (signal 2 et 3 via les molécules de costimulation et les cytokines). Les DC induisent également une empreinte sur les lymphocytes T activés leur permettant de rejoindre le tissu d'origine de la DC (Sichien et al., 2017; Worbs et al., 2017).

Classiquement, deux catégories principales de DCs étaient définies, les DCs plasmocytoides (pDCs) et les DCs conventionnelles (cDCs) ($\text{Lin}^- \text{CD45}^+ \text{CD14}^{\text{lo}} \text{CD16}^{\text{lo}} \text{MHCII}^{\text{hi}} \text{CD11c}^{\text{int/hi}}$ chez l'humain), elles-mêmes subdivisées en cDC1 ($\text{CD26}^{\text{hi}} \text{CD11c}^{\text{int}} \text{CADM1}^{\text{hi}} \text{CD172a}^- \text{IRF4}^{\text{lo}} \text{IRF8}^{\text{hi}}$) et cDC2 ($\text{CD26}^{\text{lo}} \text{CD11c}^{\text{hi}} \text{CD1c}^{\text{hi}} \text{CADM1}^{\text{lo}} \text{CD172a}^{\text{hi}} \text{IRF4}^{\text{hi}} \text{IRF8}^{\text{lo}}$) (Guilliams et al., 2016; Guilliams et al., 2014). Ces cDC1 et cDC2, ainsi définies, sont conservées entre l'homme et la souris ainsi qu'entre les différents tissus (Guilliams et al., 2016). Cependant, le scRNA-seq a

conduit récemment à la découverte de nouvelles sous-populations de DCs, pour l'instant caractérisées dans le sang de donneurs humains sains (See et al., 2017; Villani and Satija, 2017). Les cDC1 dont le développement dépend des facteurs de transcription IRF8, BATF3 et Id2 (Guilliams et al., 2016) et qui expriment classiquement le marqueur CD141 (BDCA3), sont le mieux définies par leur expression de CLEC9A, XCR1 et CADM1 (Villani and Satija, 2017). Elles sont spécialisées dans la présentation croisée de l'antigène aux lymphocytes T CD8⁺. Les cDC2, dépendantes pour leur développement d'IRF4 et ZEB2 (Guilliams et al., 2016) sont caractérisées par leur expression de CD1c (BCDA1). Alors que certains auteurs les définissent comme une population homogène (See et al., 2017), d'autres ont décrits la présence de deux 'clusters' au sein des cDC2; l'un exprimant FcεR1A et CD32B (FCGR2B) (cDC2_A), l'autre exprimant les marqueurs S100A9, S100A8, CD163 et CD36 (CD1c_B/DC3) (Villani and Satija, 2017). Ces deux populations de cDC2 induisent fortement la prolifération de lymphocytes T naïfs. Enfin, les pDCs ont également été redéfinies. Telles que classiquement reconnues par leur expression de CD123 et CD303 (BDCA2), elles contiennent effectivement une population majoritaire présentant les caractéristiques des pDCs classiques, notamment la sécrétion d'IFN-α, mais sont incapables à induire une prolifération cellulaire T en réponse au LPS ou à sécréter de l'IL-12. Ces cellules ont donc des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles plus proches des plasmocytes et tendent à être actuellement considérées comme distinctes des DCs (See et al., 2017; Villani and Satija, 2017). Par contre, parmi les cellules exprimant CD123 et CD303, une sous-population distincte des pures pDCs est capable d'induire la prolifération de cellules T allogéniques aussi bien dans le sang que dans les organes lymphoïdes (amygdales) et de produire de l'IL-12 (See et al., 2017; Villani and Satija, 2017). Cette population AXL⁺SIGLEC6⁺ est considérée par certains auteurs (Villani and Satija, 2017) comme un nouveau variant fonctionnel

de cDCs ayant un potentiel de différenciation en cDC2, alors que d'autres la définissent comme un précurseur CD33⁺CD327⁺CX3CR1⁺ de cDC1 et cDC2 (See et al., 2017).

Avant la publication de nos résultats, ces différentes populations de cDC et pDC n'avaient pas été caractérisées par le scRNA-seq dans les tissus ou chez les sujets malades. Cependant, la nouvelle population de DCs AXL⁺ n'a pas été mise en évidence par cytométrie de masse dans la peau humaine saine et les cDC2 de la peau ont un phénotype différent de celles du sang ou des organes lymphoïdes (Alcantara-Hernandez et al., 2017), mettant en évidence la limitation de l'étude du sang comme reflet de la distribution des MNPs dans les différents organes. D'autre part, cette même étude en cytométrie de masse permet d'appréhender les limitations de l'étude du transcriptome pour la caractérisation cellulaire complète. En effet, elle met en évidence l'existence de 3 clusters au sein des cDC2, différenciés par des niveaux d'expression protéiques différents de CD172 α , CD32, CD1c et CD163. De plus, elle démontre l'existence de variations individuelles importantes en termes de distribution de chaque sous-population de cDC2 dans le sang d'individus sains (Alcantara-Hernandez et al., 2017).

Ces différents travaux soulignent donc le fait qu'il existe deux étapes dans le développement des DCs, qui doivent être pris en compte dans leur classification (Guilliams et al., 2014; Sichien et al., 2017). La première étape repose sur un programme central de développement, spécifique d'une sous-population, caractérisée par le transcriptome qu'elle exprime (niveau ontogénique). La deuxième étape prend en compte l'adaptation et la reprogrammation cellulaire en fonction de sa localisation tissulaire et de sa fonction dans le tissu cible (niveau fonctionnel, anatomique et phénotypique). Ainsi, il a été montré que les caractéristiques des différentes sous-populations de DCs dans les organes lymphoïdes étaient principalement dictées par leur ontogénie, alors que les

DCs présentes dans les tissus intégraient en plus des signaux supplémentaires provenant de l'environnement local (Heidkamp et al., 2016). Ainsi, les DCs présentes dans l'intestin ont des caractéristiques propres qui seront donc détaillées au chapitre C.4.1.1.b, sachant que leur description est à ce jour basée sur des données obtenues à l'échelle de populations cellulaires et non de cellules uniques.

C.4.1.1.a.i.ii. MACROPHAGES, MONOCYTES

Les M ϕ sont l'une des populations de leucocytes les plus abondantes dans l'organisme. Cellules sessiles, présentes dans tous les organes, elles ont un abondant cytoplasme vacuolé contenant des granules lysosomiaux. Les M ϕ ont un rôle majeur dans l'immunité innée, notamment par leur fonction phagocytaire assurant l'élimination des cellules apoptotiques et des débris mais aussi la réparation tissulaire (Mowat et al., 2017). Longtemps considérés comme des dérivés tissulaires des monocytes circulants, les M ϕ , qui requièrent CSF1R/CD115 pour leur développement, sont actuellement classés en deux grandes catégories en fonction de leur ontogénie (Ginhoux and Jung, 2014; Hoeffel and Ginhoux, 2015). Certains M ϕ dérivent de précurseurs embryonnaires (provenant du sac vitellin ou du foie fœtal) qui ensemencent les tissus avant la naissance et qui s'autorenouvellent ensuite *in situ*. C'est le cas de la microglie dans le cerveau, des cellules de Kupffer dans le foie, des M ϕ alvéolaires dans le poumon et des M ϕ de la pulpe rouge dans la rate. Après la naissance, les monocytes circulants issus de précurseurs médullaires vont également coloniser les tissus pour donner naissance à d'autres M ϕ , localisés généralement dans les tissus interstitiels (Jakubzick et al., 2017). Ainsi, dans certains tissus, comme la peau ou le poumon, les deux types de M ϕ coexistent, parfois dans différents compartiments. Dans l'intestin, on pensait jusqu'à très récemment, que le pool de M ϕ dépendait uniquement d'un approvisionnement constant de monocytes circulants, y compris à

l'homéostasie (Tamoutounour et al., 2012). Cette théorie vient d'être remise en question par la mise en évidence de M ϕ d'origine embryonnaire dans les couches profondes de la muqueuse intestinale (De Schepper et al., 2018; Shaw and Houston, 2018).

Comme pour les DCs, cette classification des M ϕ en fonction de l'ontogénie ne permet pas d'appréhender la complexité fonctionnelle du système des MNPs, qui doit tenir compte de leur localisation anatomique et de leurs fonctions spécifiques (Guilliams et al., 2014). En effet, si les M ϕ ont une signature phénotypique et fonctionnelle commune et que beaucoup de leurs fonctions sont conservées à travers les tissus (comme l'élimination des cellules apoptotiques et sénescents), ils sont extrêmement adaptés aux besoins de leur environnement et remplissent des rôles spécifiques à leur tissu de résidence. Il a effectivement été démontré que l'empreinte de l'environnement local était un facteur déterminant de l'identité et de la fonction du M ϕ , quelle que soit son ontogénie (Guilliams and Scott, 2017; Schridde et al., 2017).

Enfin, même si leur présence a été longtemps sous-estimée, on retrouve dans les tissus des monocytes, qui y migrent constitutivement d'une manière dépendante de CCR2 et indépendamment de la présence du microbiote. Dérivant de la population Ly6C^{hi}CD43⁻ chez la souris et de la population CD14⁺CD16⁻ chez l'homme (et non des populations patrouillant les vaisseaux, LY6C^{low}CD43⁺ et CD14^{lo}CD16⁺), ces monocytes peuvent acquérir diverses fonctions dans le tissu, notamment des fonctions de M ϕ et de DCs. Cependant, ils peuvent aussi y rester à l'état de monocytes qui ont la capacité de migrer constitutivement vers les MLNs d'une manière dépendante de CCR7. Ils peuvent également pénétrer directement dans les ganglions via les veinules endothéliales grâce à leur expression de CD62L. Dans le poumon murin, il a d'ailleurs été montré que les monocytes sont aussi abondants que les DCs dans les ganglions drainants et

qu'au cours de l'inflammation, ils prédominent en nombre parmi les MNPs (Jakubzick et al., 2017). Les monocytes sont donc a) présents dans les tissus périphériques et dans les MLNs à l'homéostasie; b) peuvent générer une partie des M ϕ tissulaire, et notamment les M ϕ intestinaux ; et c) dans certaines conditions, infectieuses et inflammatoires, se transformer en cellules dendritiques dérivées des monocytes (Jakubzick et al., 2017) ou en M ϕ inflammatoires; ajoutant un certain niveau de complexité à la compréhension de la nature et de la fonction des différents MNPs présents dans les tissus.

C.4.1.1.b. MNPS DE LA MUQUEUSE INTESTINALE

C.4.1.1.b.i. HOMEOSTASIE

C.4.1.1.b.i.i. CELLULES DENDRITIQUES

Les DCs de la muqueuse intestinale (CD14⁻CD16⁻ chez l'homme, CD11c^{hi}CD64⁻F4/80⁻ chez la souris) ont été classées en 3 catégories en fonction de leur expression de CD103 et SIRP α , leur fréquence variant en fonction de la localisation anatomique. Ces trois sous-populations sont conservées chez l'homme et chez la souris (Sichien et al., 2017) (Figure 5a). À l'homéostasie, elles assurent la tolérance vis-à-vis des antigènes alimentaires et le maintien d'une relation symbiotique avec le microbiote.

- Les cDC1 SIRP α ⁻CD103⁺ (équivalent des SIRP α ⁻CD103⁺CD11b⁻CX3CR1⁻ cDC1 intestinales murines) (Cerovic et al., 2013; Joeris et al., 2017; Mann et al., 2016; Schlitzer et al., 2013; Scott et al., 2015; Watchmaker et al., 2014) capables de cross-présentation antigénique et reliées aux cDC1 circulantes humaines CD141⁺CLEC9A⁺CADM1⁺, sont une population mineure en nombre dans l'intestin (5 à 10% des DCs) (Mann et al., 2016; Watchmaker et al.,

2014). Chez l'homme, leur proportion décroît graduellement du colon distal vers le colon proximal et l'iléon, et réaugmente dans le jéjunum (Bernardo et al., 2016; Mann et al., 2016; Watchmaker et al., 2014).

- Les $cDC2\ SIRP\alpha^+CD103^+$ (équivalent des $SIRP\alpha^+CD103^+CD11b^+CX3CR1^{low}$ $cDC2$ intestinales murines) sont majoritairement retrouvées dans l'intestin grêle chez la souris (Scott et al., 2015) et chez l'homme (iléon et jéjunum) (Mann et al., 2013; Watchmaker et al., 2014), où elles prédominent par rapport aux autres populations de $cDCs$. Dans le colon, elles sont plus fréquentes en distal qu'en proximal où elles sont donc retrouvées en faible proportion (Bernardo et al., 2016). Elles sont reliées aux $cDC2\ CD1c^+$ sanguines humaines (Watchmaker et al., 2014).

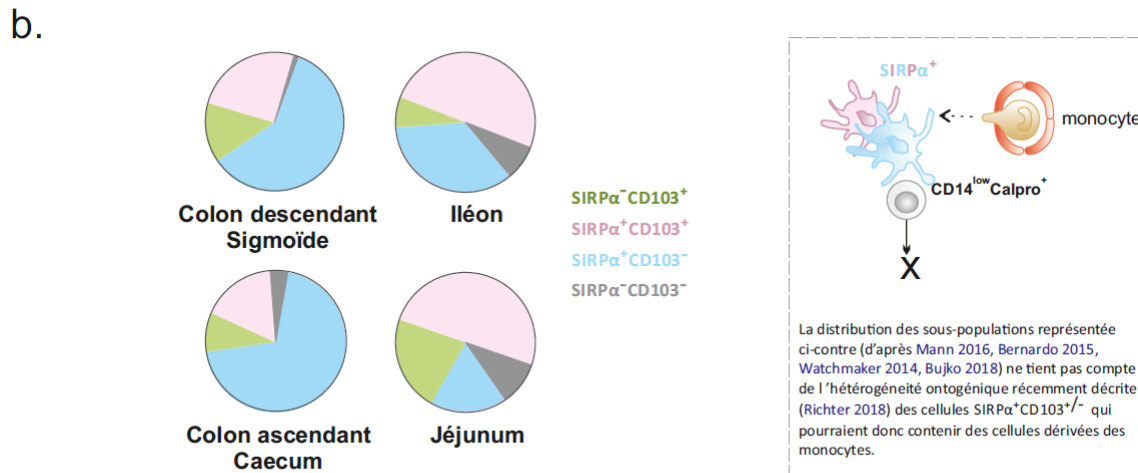
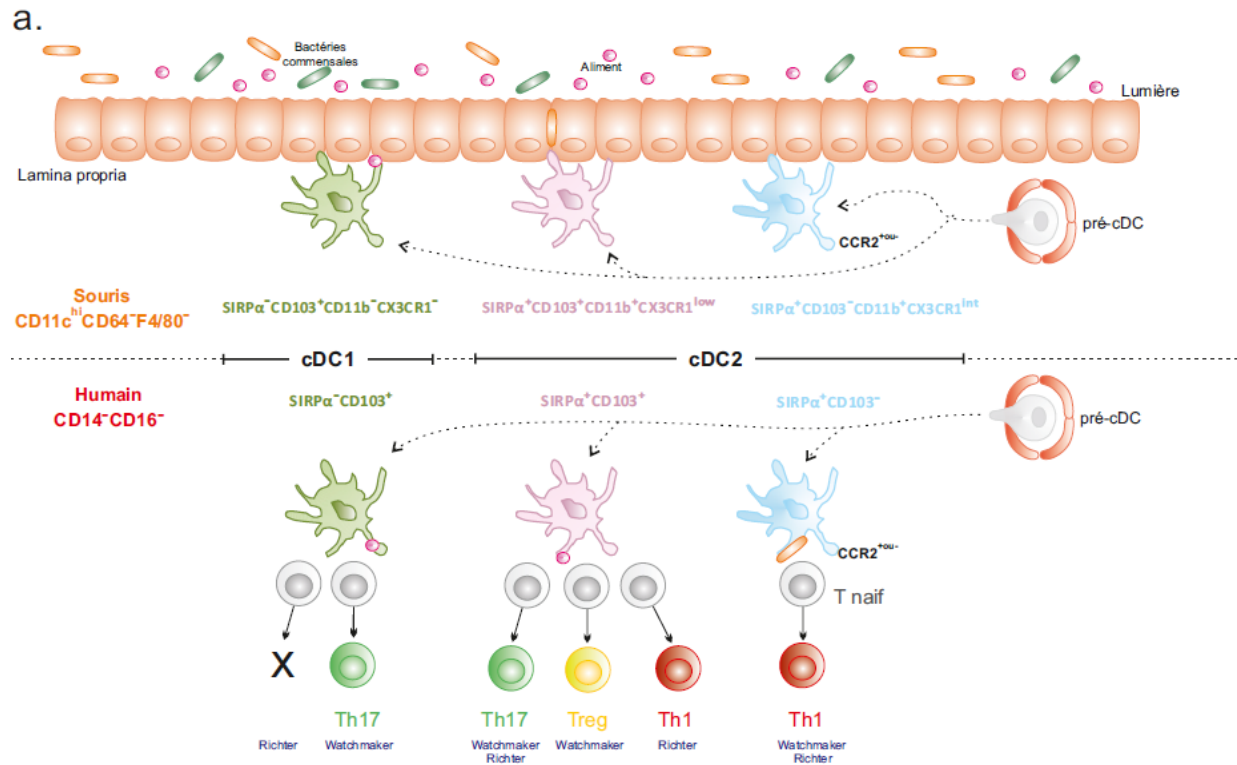
- Les $cDC2\ SIRP\alpha^+CD103^-$ (équivalent des $SIRP\alpha^+CD103^-CD11b^+CX3CR1^{int}$ $DC2$ intestinales murines) prédominent dans le colon, et diminuent en fréquence dans l'iléon puis le jéjunum (Mann et al., 2016; Watchmaker et al., 2014). Elles sont plus abondantes dans le colon proximal que distal (Bernardo et al., 2016). Ces cellules $SIRP\alpha^+CD103^-CD11b^+$ restent mal caractérisées en raison de leur hétérogénéité. Il persiste une confusion sur la nature exacte de ces cellules $CD103^-$ puisque leur phénotype est partagé avec celui des cellules $CD103^-CD11b^+CCR2^+$ dérivant des monocytes. Scott et al. ont démontré en 2014 qu'il existe dans le colon et l'intestin grêle chez la souris, une population de cellules $SIRP\alpha^+CD103^-CD64^-CD26^+Zbtb46^+$ qui sont de *bona fide* DCs, dépendantes du facteur de transcription Flt3, capables de migrer vers les MLNs (Scott et al., 2015). Comme les cellules dérivées des monocytes dont l'égression médullaire est dépendante de CCR2, une fraction de ces DCs $SIRP\alpha^+CD103^-$ exprime CCR2 et migre dans le tissu d'une manière dépendante de CCR2. La sous-population $CCR2^+$ qui produit de l'IL-12p40, est meilleure in vitro pour induire une polarisation de type Th17 que la sous-population $CCR2^-$ (Scott et al., 2015). Chez l'homme, plus de 80% de ces cellules

SIRP α ⁺CD103⁻CD64⁻ sont CCR2⁺ dans le colon, aussi bien distal que proximal, et migrent in vitro en présence de CCL2 (Bernardo et al., 2016). Les études des caractéristiques moléculaires de cette population, réalisées dans le jéjunum, sont cependant contradictoires. Watchmaker *et al.* ont montré en 2014 que la signature moléculaire des cellules SIRP α ⁺CD103⁻CD64⁻CD14⁻ était proche de celle d'un monocyte et que ces cellules pourraient donc aussi en partie dériver des monocytes (Watchmaker et al., 2014). A contrario, l'étude de Bujko *et al.* n'a pas confirmé la proximité moléculaire des cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻ humaines avec les monocytes (Bujko et al., 2018). Finalement, cette dernière équipe a très récemment montré que les cellules SIRP α ⁺CD103⁻ et SIRP α ⁺CD103⁺, considérées comme CD14⁻ en cytométrie de flux, contenaient une certaine proportion (40% et 20% respectivement) de cellules CD14^{low}, exprimant la calprotectine mais pas Flt3. Ces cellules SIRP α ⁺CD14^{low}Calpro⁺ ont un profil moléculaire et des fonctions plus proches de celles des monocytes que des DCs (plus haute capacité de phagocytose mais faible potentiel de migration et de 'priming' de cellules T naïves) (Richter et al., 2018). Ainsi les cellules CD14⁻SIRP α ⁺ intestinales, considérées comme des cDC2, pourraient contenir une proportion de cellules dérivant des monocytes (CD14^{low}) ayant des fonctions différentes de celles dérivant des précurseurs des cDCs.

Les trois sous-populations de cDCs sont donc présentes tout au long du tube digestif, en proportion variable (Figure 5b). Les tests in vitro ayant étudié leur capacité de 'priming' de cellules T naïves allogéniques sont contradictoires (Figure 5a), bien que tous obtenus avec des cellules isolées du jéjunum humain. Watchmaker *et al.* ont montré que les cDC1 SIRP α ⁻CD103⁺ induisaient des réponses de type Th17, les cDC2 SIRP α ⁺CD103⁺ de type T régulatrices et Th17 et les cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻ des réponses de type Th1 (Watchmaker et al., 2014). Les récents travaux de Richter, effectués sur les populations de cDCs CD14⁻ (excluant les cellules

CD14^{low}Calpro⁺, médiocres dans l'induction de la prolifération) n'ont pas confirmé ces résultats puisqu'ils concluent que les cellules SIRP α ⁺CD103⁺ induisent des réponses Th1 et Th17, les cellules SIRP α ⁺CD103⁻ des réponses Th1 alors que les cellules SIRP α ⁻CD103⁺ n'induisent pas la prolifération.

Enfin, chez l'humain, des différences fonctionnelles inhérentes à la localisation des cDCs ont été rapportées. Globalement, il a été montré sur le pool des trois sous-populations de DCs que les DCs coliques aurait un phénotype et une fonction d'autant plus régulatrice (plus grande capacité d'endocytose, meilleure induction de lymphocytes T régulateurs, moins bonne capacité à sécréter du TNF- α et de l'IL-1 β après stimulation) qu'elles se situent en distalité du tube digestif (colon distal versus colon proximal versus iléon) (Bernardo et al., 2016; Mann et al., 2016).



Pourcentage des sous-populations de cDC parmi les cellules muqueuses $CD45^{+} MHCII^{+} CD3^{+} CD14^{-} CD16^{-} CD19^{-} CD56^{-}$

FIGURE 5: A) cDC1 ET cDC2 DANS LES MUQUEUSES INTESTINALES : CLASSIFICATION CHEZ LA SOURIS; CLASSIFICATION ET FONCTION CHEZ L'HUMAIN

B) DISTRIBUTION DES cDC1 ET cDC2 DANS LES MUQUEUSES INTESTINALES CHEZ L'HUMAIN

a) Les DCs de la muqueuse intestinale sont classées en 3 catégories en fonction de leur expression de CD103 et SIRP α : cDC1 SIRP α^{-} CD103 $^{+}$, cDC2 SIRP α^{+} CD103 $^{+}$, cDC2 SIRP α^{+} CD103 $^{-}$. Ces trois sous-populations sont conservées entre l'homme et la souris. Leur capacité de polarisation de lymphocytes T naifs allogéniques, étudiée à partir de cDCs isolées du jéjunum humain, sont contradictoires selon les auteurs.

b) La fréquence des cDCs intestinales varient en fonction de la localisation anatomique dans le colon et l'intestin grêle.

C.4.1.1.b.i.ii. MACROPHAGES - MONOCYTES

Les M ϕ sont abondants dans toutes les couches de l'intestin grêle et du colon, notamment la lamina propria, la musculature externe et la séreuse. La majorité d'entre eux se trouvent dans la lamina propria, souvent immédiatement sous l'épithélium. Même si des M ϕ résidents d'origine embryonnaire ont récemment été décrits dans la muqueuse intestinale murine, il a été démontré que contrairement à la plupart des tissus, les M ϕ intestinaux provenaient en majorité d'un afflux constant de monocytes CCR2⁺ dérivés de la moelle osseuse (Bain et al., 2013). Durant leur différenciation, ces monocytes acquièrent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles qui contribuent à l'homéostasie du tissu. Différentes populations cellulaires, caractérisées par un phénotype spécifique, ont été décrites au cours de ce processus de différenciation, dont la durée est de 5 à 6 jours chez la souris (Figure 6). Le monocyte récemment recruté dans la muqueuse, Ly6C^{hi}CD11c⁻CX3CR1^{int}MHCII⁻CD64^{low} (nommé P1), augmente progressivement son expression de MHCII, CX3CR1, CD64 et CD11c et diminue son expression de Ly6C (Ly6C⁺CD11c⁻CX3CR1^{int}MHCII⁺CD64⁺, P2 puis Ly6C⁻CD11c^{-/low}CX3CR1^{int}MHCII⁺CD64⁺, P3), pour devenir un M ϕ mature, Ly6C⁻CD11c^{-/low}CX3CR1^{hi}MHCII^{hi}CD64^{hi} (P4) (Bain et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012). Ces M ϕ matures ont une intense activité phagocytaire et bactéricide sans stimulation exogène, et sont idéalement situés sous l'épithélium pour interagir avec les bactéries atteignant la lamina propria. Ils peuvent aussi projeter des extensions à travers l'épithélium pour capturer directement les bactéries dans la lumière intestinale. Ils sont aussi capables de phagocyter les nombreuses cellules apoptotiques présentes dans l'intestin, tissu dynamique ayant un taux élevé de renouvellement cellulaire ; et de sécréter des facteurs qui participent au renouvellement des cellules épithéliales (Prostaglandine E2, Hepatocyte growth factor) et au remodelage du tissu (métalloprotéinases). Ces M ϕ produisent constitutivement de

l'IL-10 et de faibles niveaux de TNF- α et d'IL-1 β . Ils ne répondent pas à la stimulation par des stimuli exogènes, ne produisant ni dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), ni cytokines pro-inflammatoires lorsqu'ils sont stimulés par des ligands des TLRs, incluant NOD2, par l'IFN- γ , ou par la phagocytose (Bain et al., 2013; Joeris et al., 2017). Cette anergie n'est cependant pas due à une absence de récepteurs à leur surface puisque ces M ϕ matures expriment les mêmes niveaux de TLR 1 à 7 et 9 et de CD14 que les cellules récemment recrutées CX3CR1^{int} ou que des M ϕ dérivés in vitro avec du M-CSF (Bain et al., 2013). L'IL-10 dérivée des M ϕ CX3CR1^{hi} soutient l'expansion et la survie des lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺, indispensables à la tolérance orale. Ces derniers sont d'ailleurs plus nombreux dans le colon que dans l'intestin grêle, corrélant avec une plus grande proportion de M ϕ dans le colon (Joeris et al., 2017). Les M ϕ matures sécrètent également des chimiokines indispensables au recrutement des leucocytes dans le tissu, incluant le recrutement de leurs propres précurseurs (Zigmond et al., 2012).

Très récemment, il a été montré qu'une partie de ces M ϕ matures (36% des M ϕ contenus dans les populations P3 et P4) se maintenaient localement indépendamment de l'afflux de monocytes (De Schepper et al., 2018; Shaw and Houston, 2018). Ces M ϕ CX3CR1^{hi}MHCII^{hi}Ly6C⁻ sont caractérisés par l'expression de TIM-4 et de CD4, sécrètent la même quantité de TNF- α et d'IL-10 que les M ϕ TIM-4⁻CD4⁻ mais plus de CCL2, chimiokines attirant les monocytes. Ces M ϕ TIM-4⁺CD4⁺ dérivés de précurseurs embryonnaires sont présents dans l'intestin grêle et le colon et co-existent avec les M ϕ TIM-4⁻CD4⁺ et TIM-4⁻CD4⁻, ces derniers ayant respectivement un taux de renouvellement lent et rapide à partir des monocytes circulants (Shaw and Houston, 2018). La présence du microbiote est nécessaire au maintien de toutes ces populations de M ϕ matures dans le colon puisque leur nombre diminue chez les souris axéniques (Shaw and Houston, 2018). De Schepper *et al.* ont précisé l'origine et la localisation de ces macrophages

résidents, qui dérivent de progéniteurs vitellins et qui sont principalement présents dans la sous-muqueuse et la musculature externe ainsi que dans les plaques de Peyer (De Schepper et al., 2018). L'étude de leur signature moléculaire en scRNAseq révèle qu'ils contiennent au moins deux sous-populations distinctes, participant au maintien de l'homéostasie tissulaire. Ces deux sous-populations interagissent respectivement avec les neurones des plexus myentériques et sous-muqueux participant ainsi à la motilité intestinale et avec les vaisseaux de la sous-muqueuse en assurant l'intégrité vasculaire (De Schepper et al., 2018).

Chez l'homme, à l'homéostasie, une population de M ϕ anergiques a été décrite dans la muqueuse jéjunale. Ces M ϕ intestinaux HLADR⁺ n'expriment pas les marqueurs de surface classiquement retrouvés sur les M ϕ (CD14, CD89, CD64, CD32, CD16, CD11b, CD11c, CD11a) ; ne sécrètent pas de cytokines/chémokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8, IL-2, CCL5/RANTES, IL-10, TGF- β) en réponse à la stimulation par le LPS ou en réponse à la phagocytose. Par contre, ils expriment des niveaux élevés de TLRs 3-9 et de CD36 (récepteur scavenger pour les phospholipides présents sur les cellules apoptotiques), ont un haut pouvoir phagocytaire et une capacité à tuer les bactéries (*S. typhimurium* and *E. coli*) supérieure à celle des monocytes (Smith et al., 2011; Smythies et al., 2005). Plus récemment, une autre étude dans le jéjunum a identifié 4 sous-populations de M ϕ ; deux exprimant CD11c (CD14⁺HLADR^{int} et CD14^{dull}HLADR^{hi}) et deux ayant une morphologie de M ϕ plus matures, n'exprimant pas CD11c (CD11b⁻CD14^{dull}HLADR^{hi}, les plus fréquentes, et CD11b⁺CD14^{hi}HLADR^{hi}) (Bujko et al., 2018). Des études précédentes ont aussi rapporté la présence de cellules CD14⁺CD33⁺ dans la muqueuse colique (0,46% des cellules mononuclées de la lamina propria (LPMC)) (Kamada et al., 2008), et CD14⁺HLA-DR⁺ dans la muqueuse colique et iléale (Bain et al., 2013; Ogino et al.,

2013). Enfin, Gonzalez-Dominguez *et al.* montre que 98% des macrophages coliques à l'homéostasie sont CD14^{lo}CD163⁺CD163L1⁺CD209⁺CD11c⁻CD11b⁺ et produisent constitutivement de l'IL-10 (Gonzalez-Dominguez et al., 2015) (Figure 6).

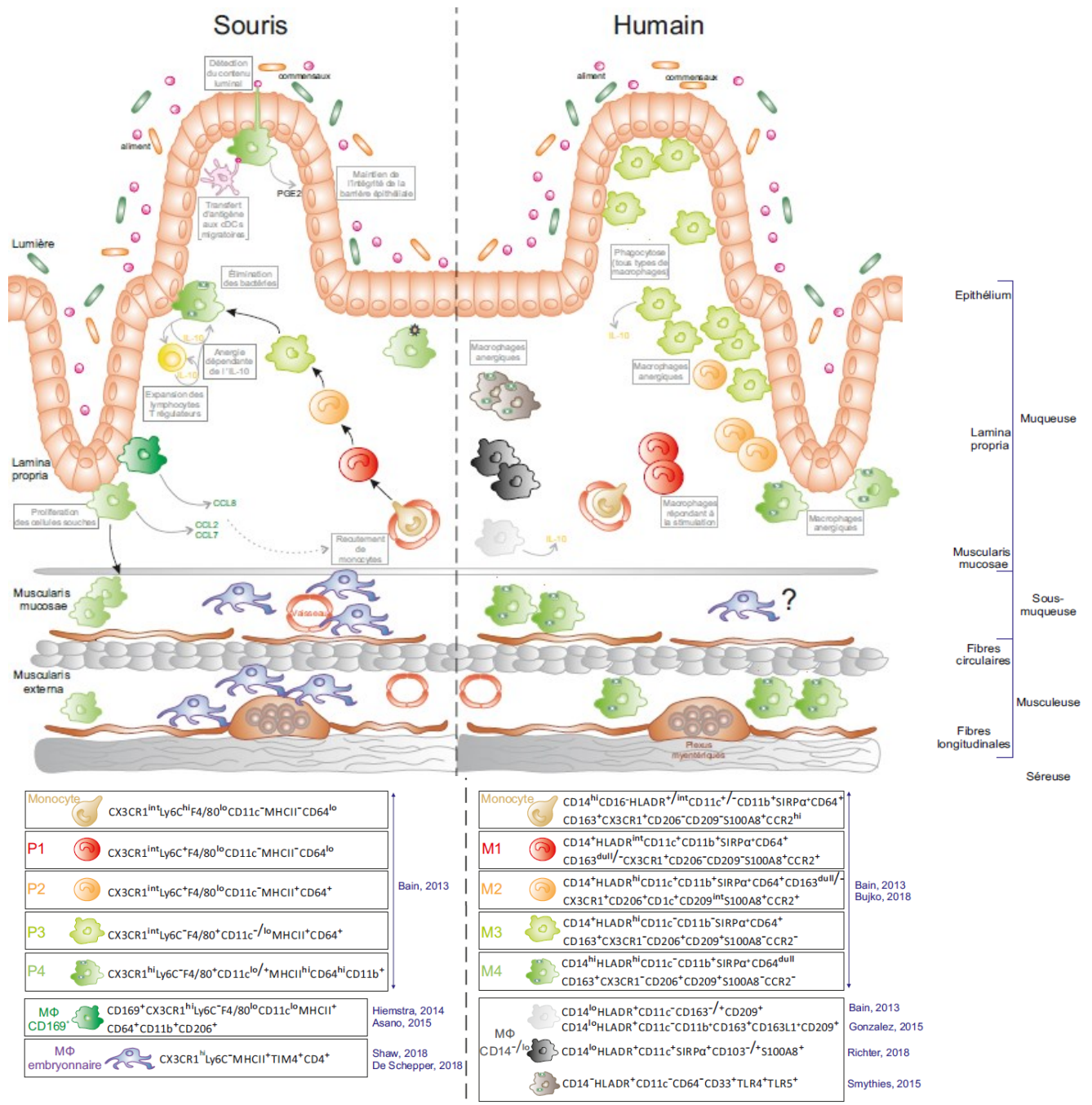


FIGURE 6: MACROPHAGES INTESTINAUX À L'HOMÉOSTASIE CHEZ LA SOURIS ET L'HUMAIN

À l'homéostasie, chez la souris (panel gauche), la majorité des MΦ intestinaux dérivent des monocytes circulants et subissent un processus de maturation intra-tissulaire (P1 à P4) vers des MΦ anergiques produisant et répondant à l'IL-10, assurant diverses fonctions dans l'intestin. Des MΦ d'origine embryonnaire sont également présents dans les couches tissulaires profondes. Chez l'humain (panel droit), des MΦ similaires dérivant également des monocytes, ont été rapportés, certains répondant à la stimulation (M1, M2) et d'autres anergiques, de morphologie plus mature (M3, M4). La présence de MΦ d'origine embryonnaire n'a pas encore été démontrée.

C.4.1.1.b.II.INFLAMMATION

Durant l'inflammation, il a été démontré chez la souris dans deux modèles de colite (induites par le DSS ou par transfert de cellules T), que la différenciation des monocytes, récemment recrutés dans la muqueuse, en macrophages anti-inflammatoires, est interrompue ; ce processus, cumulé à celui du recrutement accru de monocytes, favorise l'accumulation des populations CX3CR1^{int} (P1, P2, P3) décrites ci-dessus (Bain et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012). Ces cellules sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et répondent à la stimulation par le LPS (Bain et al., 2013). Notamment, les Mφ au stade P2 produisent du TNF-α et de l'IFN-γ et expriment iNOS (Tamoutounour et al., 2012). Cette production de TNF-α et d'iNOS a été également décrite dans des cellules considérées comme des DCs dérivés des monocytes ('TIP-DCs') qui ont été décrites dans les tissus en contexte infectieux (Jakubzick et al., 2017; Serbina et al., 2003). Des DCs dérivées des monocytes, capables de migration vers les MLNs et de présentation d'antigène, ont également été rapportés dans un modèle de colite au DSS (Figure 7) (Zigmond et al., 2012).

Chez l'humain, il a été montré qu'une population de MNPs CD14⁺ s'accumulait dans la muqueuse des patients atteints de MC et de CU, comparé aux patients sains (Kamada et al., 2008). Ces cellules expriment à la fois des marqueurs phénotypiques de Mφ et de DCs et produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-23, IL-1β, IL-6, TNF-α) à l'homéostasie et en réponse à la stimulation des TLRs (Kamada et al., 2008; Ogino et al., 2013). Elles favorisent la production d'IFN-γ par les LPMC des patients atteints de MC. Plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation des cellules CD14⁺CD64⁺HLADR^{dim} dans le colon des patients avec MC et CU, comparé à la zone non-inflammatoire ou à des patients contrôles (Dige et al., 2016; Magnusson et al., 2016; Thiesen et al., 2014), aux dépens des cDC1 CD141⁺CD103⁺ et cDC2

CD1c⁺CD103⁺ qui diminuent proportionnellement dans la muqueuse inflammatoire colique et iléale (Magnusson et al., 2016). D'autres études ont détecté des Mφ CD14⁺CD11c⁺CD163^{lo} dans la muqueuse iléale inflammatoire de patients avec MC, capables d'induire la polarisation de lymphocytes T naïfs en Th17 (Bain et al., 2013; Ogino et al., 2013). Aussi, des Mφ CD14⁺CLEC5A⁺CD11c⁺CD11b⁺CD163^{lo}CD209⁻ ont été décrits dans les muqueuses de patients atteints de MC et de CU (Gonzalez-Dominguez et al., 2015). De plus, des MNPs CD14⁺CXCR4⁺ interagissent, via CD32 et CD64, avec les plasmocytes sécrétant des IgG dans la muqueuse des patients atteints de CU, activant la sécrétion de TNF- α , IL-1 β , et TL1-A (Uo et al., 2013). Finalement, il avait été montré dans notre laboratoire qu'en comparaison avec la muqueuse non-inflammatoire chez un même patient atteint de MC, les cellules SIRP α ⁺HLADR⁺, majoritairement CD14⁺, augmentaient dans la muqueuse inflammatoire et que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires était restreinte à ces cellules (Baba et al., 2013) (Figure 7).

Toutefois, bien qu'elles s'accumulent au cours de l'inflammation, ces cellules CD14⁺ pourraient avoir également un rôle protecteur. En effet, les MNPs CD14⁺CX3CR1⁺ favorisent via l'IL-23 qu'elles produisent, la production d'IL-22 par les ILC3 dans la muqueuse de patients ayant une MC (Longman et al., 2014). Cependant, des cellules CD14⁺ sécrétant de l'IL-12A, isolées de l'iléon de patients avec MC, peuvent aussi induire la plasticité d'ILC3 en ILC1 de type pro-inflammatoire (Bernink et al., 2015; Bernink et al., 2013).

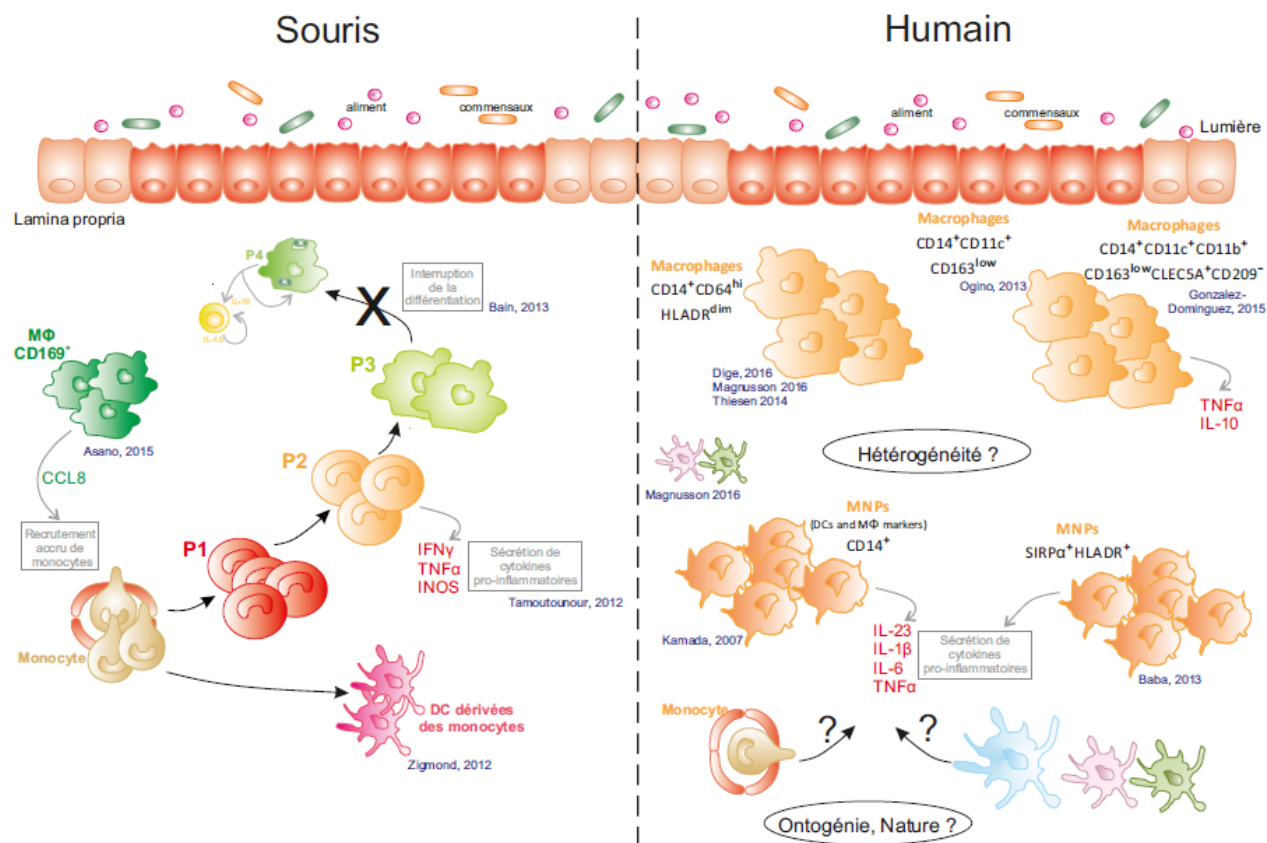


FIGURE 7 : MNPS INTESTINAUX AU COURS DE L'INFLAMMATION CHEZ LA SOURIS ET L'HUMAIN

Chez la souris, en contexte inflammatoire, la différenciation des monocytes récemment recrutés dans la muqueuse, en macrophages anti-inflammatoires (P4), est interrompue. Cumulé au recrutement accru de monocytes, ce processus favorise l'accumulation des populations $CX3CR1^{int}$ (P1, P2, P3) qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Des DCs dérivées des monocytes ('TIP-DCs') ont aussi été décrites dans les tissus en contexte infectieux. Chez l'humain, ont été rapportées plusieurs populations de MNPs $CD14^+$, sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et s'accumulant dans la muqueuse des patients atteints de MC et de CU, dont la nature reste imprécise.

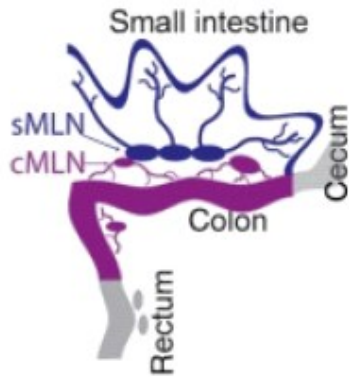
En résumé, depuis la dernière décade, les études ayant tenté de caractériser les MNPs de la muqueuse intestinale chez les patients atteints de maladie inflammatoire n'ont pas permis d'établir de consensus sur le phénotype, la nature (macrophages, cellules dendritiques ou cellules dérivées des monocytes) et la fonction de ces cellules, ces contradictions reflétant probablement l'hétérogénéité de ces cellules.

C.4.1.1.c.i. ANATOMIE

Chez la souris comme chez l'homme, le drainage de la muqueuse intestinale est compartimenté. Chez la souris, la chaîne ganglionnaire communément nommée dans la littérature 'ganglions lymphatiques mésentériques - MLN' ne draine que l'intestin grêle et le caecum (Houston 2015; Veenbergen 2016). Le colon est drainé par les ganglions lymphatiques caudaux et iliaques, beaucoup plus rarement étudiés. Cette compartimentation anatomique a été confirmée sur le plan fonctionnel puisqu'il a été montré que seules des DCs isolées des MLNs drainant l'intestin grêle (et non le colon) induisaient une prolifération lymphocytaire T en réponse à la présentation d'un antigène acquis dans l'intestin grêle (Houston et al., 2016) (Figure 8a). Chez l'homme, les chaînes ganglionnaires drainant le colon et l'iléon sont également distinctes mais toutes référées sous le terme global de ganglions lymphatiques mésentériques (Figure 8b). Dès lors, l'origine anatomique exacte (colon ou iléon) des ganglions mésentériques humains est rarement précisée dans la littérature les ayant étudiés. A noter que le rectum a un drainage lymphatique propre au niveau des ganglions iliaques.

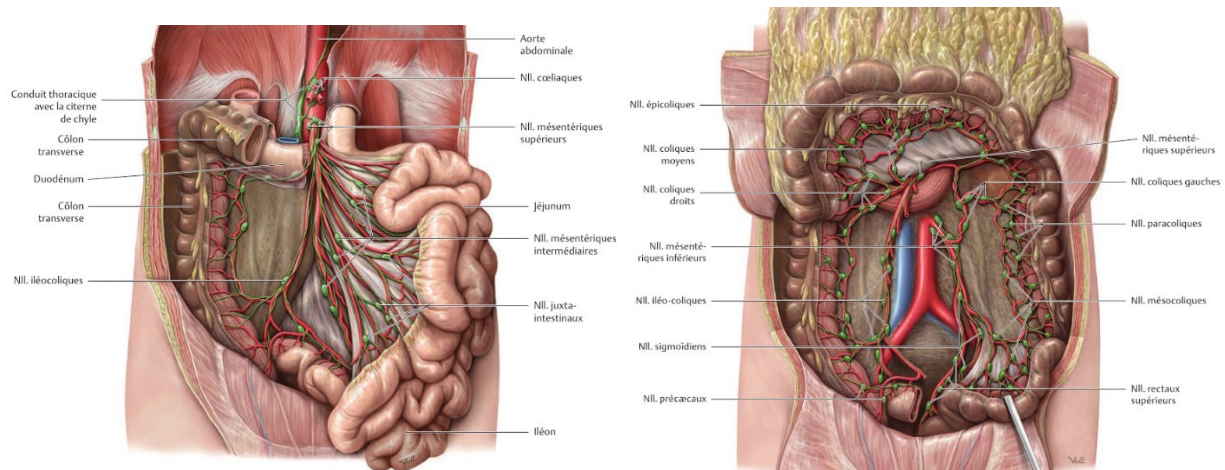
Par soucis de clarté, nous nommerons ci-après sMLN et cMLN, les ganglions lymphatiques drainant respectivement l'intestin grêle et le colon. L'abréviation MLN sera utilisée lorsque l'origine anatomique n'est pas précisée.

a.



Houston 2015

b.



Atlas d'anatomie Prométhée - Tome 3: Organes internes, Volume 3
Schulte, Schumacher, Schünke

FIGURE 8 : COMPARTIMENTATION DU DRAINAGE LYMPHATIQUE DES MLNS CHEZ LA SOURIS (A) ET L'HUMAIN (B)
D'après Houston et al, Mucosal Immunol. 2016 Mar;9(2):468-78 (<http://doi: 10.1038/mi.2015.77>)
Reprinted by permission from Springer Nature (Licence number : 443611482348)

Chez la souris comme chez l'humain, le colon et l'intestin grêle ont un drainage lymphatique distinct.

C.4.1.1.c.II. HOMEOSTASIE

C.4.1.1.c.II.i. CELLULES DENDRITIQUES

Après capture de l'antigène, les DCs migrent vers les ganglions lymphatiques d'une manière dépendante de CCR7 et subissent un processus de maturation au cours de leur migration. Chez la souris, il a aussi été montré que certaines DCs étaient capables de migrer à l'homéostasie (Worbs et al., 2017). Dans les ganglions lymphatiques, on retrouve des DCs migratoires, qui migrent du tissu périphérique et atteignent les ganglions à un stade mature (exprimant alors fortement des molécules de co-stimulation et du CMH) et des DCs résidentes, présentes à un stade immature, et restant dans le ganglion durant toute leur durée de vie (Segura and Soumelis, 2017). Ces dernières sont intégrées dans le réseau stromal de la zone T et acquièrent les antigènes par l'intermédiaire des conduits lymphatiques. Sessiles à l'état basal, elles sont aussi capables de mobilité vers la médulla en cas d'infection (Worbs et al., 2017), mais ne sont pas capables d'imprimer des molécules de 'homing' sur les lymphocytes T contrairement aux DCs migratoires (Worbs et al., 2017).

Au niveau du tube digestif, chez la souris, les 3 populations de cDCs décrites dans la muqueuse de l'intestin grêle sont retrouvées dans les sMLN (Cerovic et al., 2013; Joeris et al., 2017; Schlitzer et al., 2013; Scott et al., 2015) (Figure 9). Ces trois populations présentes dans la muqueuse (cDC1 SIRP α ⁻CD103⁺, cDC2 SIRP α ⁺CD103⁺ et cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻) sont capables d'accroître leur expression de CCR7 et HLA-DR et de migrer vers les sMLN (Cerovic et al., 2013; Scott et al., 2015). Ces DCs migratoires rejoignent alors des populations de cDC1 et cDC2 résidentes HLA-DR^{low} (Cerovic 2013; Schlitzer 2013). Fonctionnellement, il a été montré que les DCs migratoires (cDC1 SIRP α ⁻CD103⁺ jéjunales et cDC2s SIRP α ⁺CD103⁺ jéuno-iléales) peuvent présenter les antigènes oraux dans le sMLN pour induire la tolérance orale en favorisant

l'induction de cellules T régulatrices FOXP3⁺ (Coombes et al., 2007; Esterhazy et al., 2016; Scott et al., 2015). De plus, les cDC1 migratoires 'cross-présentent' les antigènes dérivés de l'épithélium intestinal aux lymphocytes T CD8⁺ à l'homéostasie (Cerovic et al., 2015) et leur absence est associée à une réduction des lymphocytes T intraépithéliaux CD8 $\alpha\alpha$ et CD8 $\alpha\beta$ dans l'intestin grêle (Joeris et al., 2017). Elles induisent aussi des réponses de type Th1 par leur production constitutive d'IL-12 (Scott et al., 2015). Les cDC2 SIRP α ⁺CD103⁺ participent à la différenciation en Th17 dans les sMLNs via leur production d'IL-6 (Persson et al., 2013; Schlitzer et al., 2013). Les cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻CD11b⁺ retrouvées en minorité dans les sMLN (~14%), secrètent de l'IL-12 et de l'IL-23 et peuvent induire la polarisation de lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 et Th17 (Cerovic et al., 2013; Milling et al., 2009). Les trois populations de cDCs sont capables d'induire l'expression de molécules de 'homing' (α 4 β 7, CCR9) sur les lymphocytes T, par un mécanisme dépendant de l'acide rétinoïque (Cerovic et al., 2013; Esterhazy et al., 2016) (Figure 9).

Dans les cMLN, en cohérence avec la distribution des DCs coliques, on retrouve essentiellement deux populations de cDCs (cDC1 SIRP α ⁻CD103⁺ et cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻) (Houston et al., 2016; Veenbergen et al., 2016). A cet endroit, les cDC2 CD103⁻CD11b⁺ sont les cellules principalement responsables de la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺, dans un modèle de tolérance orale (Veenbergen et al., 2016). D'autre part, les DCs isolées des cMLN, ont une activité aldehyde dehydrogenase inférieure à celle des sMLN (Houston et al., 2016; Veenbergen et al., 2016) (Figure 9).

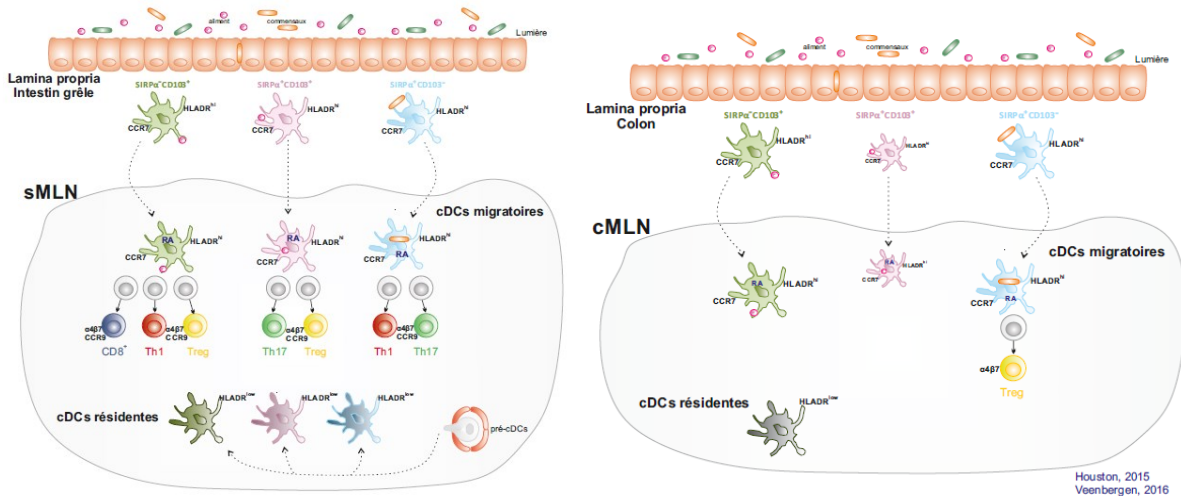


FIGURE 9 : CLASSIFICATION ET FONCTION DES cDC1 ET cDC2 DANS LES GANGLIONS LYMPHATIQUE GRELES (sMLN) ET COLIQUES (cMLN) CHEZ LA SOURIS

Les trois populations de cDCs présentes dans la muqueuse de l'intestin grêle (cDC1 SIRP α ⁺CD103⁺, cDC2 SIRP α ⁺CD103⁺ et cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻) migrent d'une manière dépendante de CCR7, à l'état mature après capture de l'antigène, dans les sMLN. Elles présentent l'antigène aux lymphocytes T naïfs, induisent leur prolifération et leur polarisation et impriment des molécules de 'homing' sur les lymphocytes T. Notamment, les cDCs migratoires (cDC1 SIRP α ⁺CD103⁺ et cDC2s SIRP α ⁺CD103⁻) induisent la tolérance orale en favorisant l'induction de cellules T régulatrices FOXP3⁺. Elles rejoignent les cDCs résidentes immatures dans les sMLN. Dans les cMLN, en cohérence avec la distribution des cDCs coliques, on retrouve essentiellement deux populations de cDCs (cDC1 SIRP α ⁺CD103⁺ et cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻), les cDC2s SIRP α ⁺CD103⁻ étant les cellules principalement responsables de la polarisation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ dans les cMLN.

Chez l'humain, en raison de la difficulté d'accès, peu de données sont disponibles sur les MLNs. Dans les ganglions lymphatiques de la peau humaine, les populations de DCs migratoires et résidentes ont été bien caractérisées et sont conservées avec celles retrouvées chez la souris (Haniffa et al., 2012; Segura et al., 2012). Dans les MLNs de donneurs d'organes, Granot *et al.* ont rapporté la présence de cDC1 et cDC2, qui ont des caractéristiques migratoires (augmentation de l'expression de HLA-DR et CCR7 ; expression de CD103, marqueur associé à l'origine muqueuse et absent sur les cDCs résidentes). Les cDC1 sont plutôt dispersées dans la zone T alors que les cDC2, qui prédominent en nombre, ont plutôt tendance à s'agréger près des follicules lymphoïdes (Granot et al., 2017) (Figure 10).

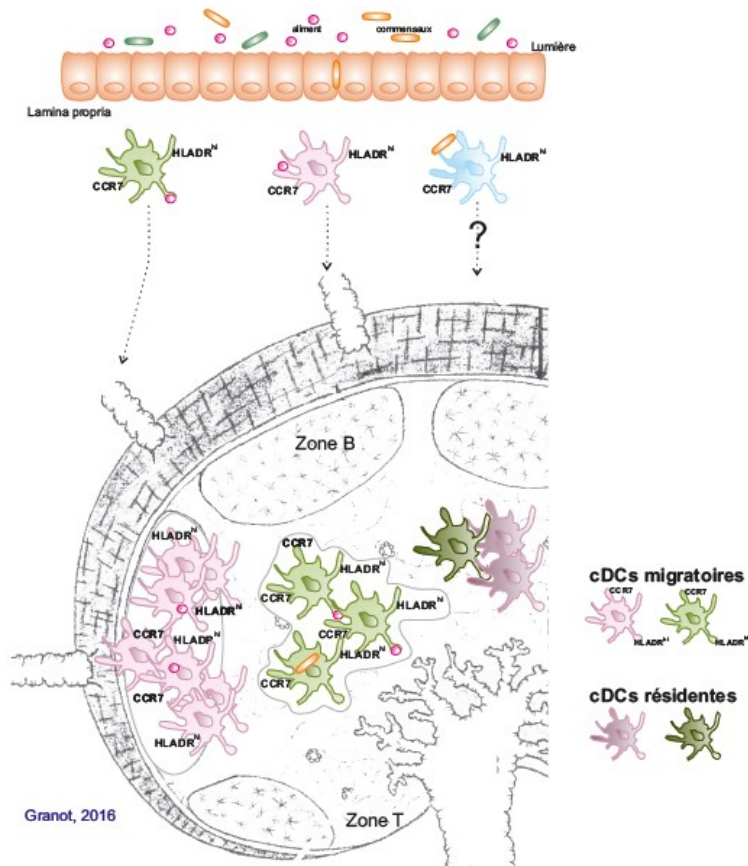


FIGURE 10 : cDC DES GANGLIONS LYMPHATIQUES MÉSENTERIQUES CHEZ L'HUMAIN

Dans les MLNs de donneurs d'organes, des cDC1 et cDC2, qui ont des caractéristiques migratoires (augmentation de l'expression de HLA-DR et CCR7 ; expression de CD103, marqueur associé à l'origine muqueuse et absent sur les cDCs résidentes). Les cDC1 sont plutôt dispersées dans la zone T alors que les cDC2, qui prédominent en nombre, ont plutôt tendance à s'agréger près des follicules lymphoïdes

Plusieurs populations de monocytes et de M ϕ coexistent dans les ganglions lymphatiques murins. Ontogéniquement, il semble que les M ϕ ganglionnaires dérivent de monocytes circulants et non de précurseurs embryonnaires (Bellomo et al., 2018; Hoeffel and Ginhoux, 2015). Les M ϕ ganglionnaires ont été décrits en fonction de leur situation anatomique (Figure 11). Les M ϕ présents dans les sinus sous-capsulaires (SSM) et médullaires (MSM) possèdent de nombreux PPRs ('pattern recognition receptors'), leur permettant de capturer et de retenir les pathogènes dans le ganglion lymphatique, prévenant ainsi la dissémination des infections (Bellomo et al., 2018). Ils expriment CD169, une lectine de type I qui se lie à l'acide sialique et permet l'adhésion d'autres leucocytes. Les SSM (CD169⁺CD11b⁺F4/80⁻) sont capables de capturer et de transférer des complexes immuns ou des particules virales provenant des vaisseaux lymphatiques afférents aux lymphocytes B, tandis que les MSM (CD169⁺CD11b⁺F4/80⁺) ont de grandes capacités phagocytaires, reflétées par l'expression de F4/80, MARCO, CD206 et SIGN-R1 (CD209b) qui se lie à différents PAMs ('pattern recognition receptors') (Bellomo et al., 2018). Les SSM et les MSM interagissent aussi avec les cellules endothéliales lymphatiques en sécrétant des facteurs trophiques qui régulent la lymphangiogenèse (Bellomo et al., 2018). A côté des M ϕ sinusaux, des M ϕ 'colorables' (Tingible body M ϕ , TBM : CX3CR1⁺MERTK⁺CD68⁺) sont présents dans les centres germinatifs et participent à la phagocytose des lymphocytes B apoptotiques via MERTK (myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase) (Bellomo et al., 2018). Les M ϕ des cordons médullaires (MCM : CD169⁻CD11b⁺F4/80⁺) fournissent un support trophique aux plasmocytes et les phagocytent après leur apoptose (Gray; Cyster 2012). Enfin, une autre population de M ϕ a été rapportée au sein de la zone T. Ces M ϕ CD169⁻CD64⁺F4/80⁻ CX3CR1⁺MERTK⁺, dérivés des monocytes circulants chez la souris adulte, mais qui se

renouvellent in situ en cas d'inflammation, sont spécialisés dans l'efferocytose des nombreuses cellules apoptotiques présentes dans la zone T. Bien qu'ils expriment des molécules de co-stimulation, ils sont incapables d'induire la prolifération et la polarisation de lymphocytes T naïfs. Ces actions combinées participent à la prévention de l'activation de cellules autoréactives à l'homéostasie (Baratin, 2017). Ils jouent aussi un rôle dans la survie des cellules réticulaires fibroblastiques et régulent leur contractilité (Bellomo et al., 2018).

Plus spécifiquement au niveau du tube digestif murin (Figure 11), des M ϕ CD64⁺CD14⁺CX3CR1^{high}CD11b⁺ ont été rapportés dans les sMLN, avec une faible fréquence comparée aux DCs, leur localisation dans les sMLN n'étant pas précisée (Schlitzer, 2013). Aussi, des M ϕ MHCII⁺CD64⁺CD11c^{-/low} ont été décrits dans les sMLN à l'homéostasie en faible proportion (3% des cellules MHCII⁺) et se situent principalement dans la zone T (Tamoutounour et al., 2012).

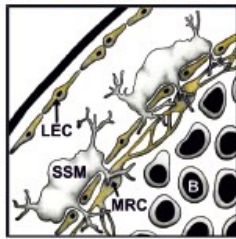
En plus des M ϕ , Jakubzick et al. ont montré qu'à l'homéostasie, dans le poumon murin, les monocytes entraient directement dans les ganglions lymphatiques depuis le sang et y restaient à l'état de monocytes, après avoir acquis certains marqueurs comme le CMH de classe II par leur interaction avec les cellules endothéliales. De plus, les monocytes peuvent également migrer à l'état de monocytes depuis le tissu en transportant des antigènes vers le ganglion drainant (Jakubzick et al., 2013). Ces données n'ont cependant pas été démontrées dans les MLNs.

Chez l'humain, les M ϕ ganglionnaires sont peu caractérisés (Figure 11). Granot et al. ont montré, sur des MLNs provenant de donneurs d'organes, que 75% des cellules CD11c⁺ exprimaient CD14 à l'homéostasie, la majorité d'entre elles n'exprimant pas ou peu HLA-DR (Granot et al., 2017). Il est donc probable que les cellules décrites par Granot soient des monocytes, et non des

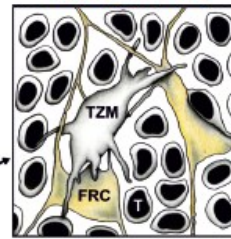
M ϕ sinusoidaux puisque qu'il a été montré que dans les cMLNs drainant un adénocarcinome colique, les SSM et MSM expriment CD68, CD169, CD163, CD204 mais pas CD11c (Komohara et al., 2017). Cependant, la présence de M ϕ CD14⁺CD11c⁺ en faible proportion parmi les cellules HLADR⁺, a été rapportée dans les MLNs à l'homéostasie (Ogino et al., 2013). Des M ϕ similaires ont aussi été décrits dans les ganglions lymphatiques drainant la peau et le poumon: des cellules CD14⁺CD163⁺SIRP α ⁺ ayant une morphologie de M ϕ et une grande aptitude à phagocyter des cellules apoptotiques mais n'induisant pas la prolifération de lymphocytes T naïfs ont été décrites dans les ganglions drainant la peau saine (Haniffa et al., 2012; Segura et al., 2012); des cellules CD14⁺CD64⁺ ont aussi été rapportée dans la zone T des ganglions drainant les poumons (Desch et al., 2016).

1. Macrophages ganglionnaires murins

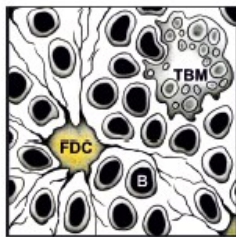
SSM: $CD169^+CD11b^+CX3CR1^+F4/80^-$



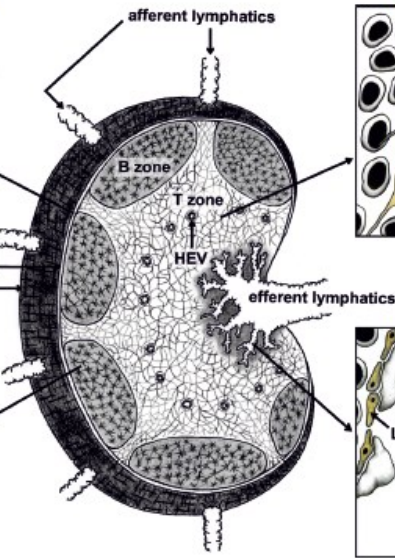
TZM: $CD169^-CD64^+F4/80^-$
 $CX3CR1^+MERTK^+$



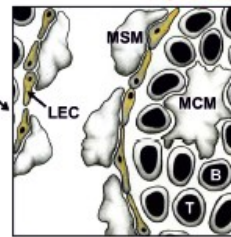
subcapsular sinus
capsule



TBM: $CD68^+CX3CR1^+MERTK^+$



MSM: $CD169^+CD11b^+CX3CR1^-$
 $F4/80^+MARCO^+CD209b^+$
 $CD206^+$



MCM: $CD169^-CD11b^+$
 $CX3CR1^+F4/80^+$

Microanatomical niches of LN MF. Stromal cells: LEC, lymphatic endothelial cell; HEV, high endothelial venules; FRC, fibroblastic reticular cell; FDC, follicular dendritic cell; MRC, marginal reticular cell MF: SSM, subcapsular sinus MF; TZM, T zone MF; TBM, tingibile body MF; MSM, medullary sinus MF; MCM, medullary cord MF; B, B cell; T, T cell.

Bellomo et al, Cellular immunology, 2018
Reproduit avec l'autorisation des éditions Elsevier

2. Macrophages ganglionnaires murins dans les sMLNs

$CD14^+CD64^+CX3CR1^{hi}CD11b^+$ (Schlitzer, 2013)

$MHCII^+CD64^+CD11c^{-/low}$ dans la zone T (Tamoutounour, 2012)

3. Macrophages ganglionnaires humains

MLNs: $CD11c^+CD14^+HLADR^{du}CD11b^+$ (probable monocytes) (Granot, 2017)

$CD11c^+CD14^+HLADR^+$ (Ogino, 2013)

Peau: $CD14^+CD163^+SIRP\alpha^+$ (Haniffa, 2012 - Segura, 2012)

Poumon: $CD14^+CD64^+$

FIGURE 11 : MACROPHAGES DES GANGLIONS LYMPHATIQUES CHEZ LA SOURIS ET L'HUMAIN

D'après Bellomo et al. Cellular Immunol. 2018 Aug (330), 168-174

(<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.010>).

Reprinted by permission from Elsevier (Licence number : 4493571065474).

Caractéristiques phénotypiques des macrophages ganglionnaires rapportés chez la souris et chez l'humain, en fonction de la localisation anatomique, à l'homéostasie.

Chez la souris et chez l'humain, comme dans la muqueuse, les monocytes deviennent les MNPs prépondérants dans les ganglions lymphatiques lors d'une inflammation (Jakubzick et al., 2017). Plusieurs études chez la souris ont décrit, en contexte inflammatoire, dans différents organes, la présence de cellules qualifiées de DCs dérivées des monocytes (Cheong et al., 2010; Flores-Langarica et al., 2011; Kim and Braciale, 2009; Ko et al., 2014; Langlet et al., 2012; Nakano et al., 2009; Plantinga et al., 2013). Stimulées notamment via TLR4 et CD14, ces DCs dérivées des monocytes migrent vers les ganglions lymphatiques en transportant l'antigène qu'elles présentent aux lymphocytes T naïfs (Cheong et al., 2010). Ces DCs dérivées des monocytes peuvent également entrer directement dans les ganglions lymphatiques depuis le sang (Segura and Amigorena, 2013). Elles sont surtout localisées dans la zone interfolliculaire et paracorticale, où elles sont alors capables d'induire la prolifération des lymphocytes T aussi bien que des cDCs et de les polariser en Th1 (Flores-Langarica et al., 2011; Kim et al., 2014; Langlet et al., 2012; Nakano et al., 2009), Th2 (Plantinga et al., 2013) et Th17 (Ko et al., 2014). Plus spécifiquement, dans les MLNs, ces DCs dérivées des monocytes ont été rapportées dans des modèles de colite au DSS (Zigmond et al., 2012) et par transfert de cellules T (Siddiqui et al., 2010) (Figure 12).

Dans ce dernier modèle, d'autres auteurs ont plutôt décrit une rapide accumulation de cellules qu'ils qualifient de M ϕ . Ces M ϕ CD64⁺CCR7⁻, se distribuent dans les sMLN comme dans la muqueuse en cellules Ly6C^{hi}MHCII⁻ et Ly6C^{int to hi}MHCII⁺ (Tamoutounour et al., 2012). En majorité Ly6C^{int to hi}MHCII⁺, ils se situent principalement dans la zone T et ont une forte activité phagocytaire. Ils sont aussi capables d'induire rapidement la différenciation de lymphocytes T naïfs en cellules Th productrices d'IFN- γ in vitro et in vivo (Tamoutounour et al., 2012). De

plus, dans un modèle de colite au DSS, les M ϕ CD11c⁺CD169⁺ s'accumulent dans les MLNs, produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-1 β) et sont impliqués dans la genèse des lymphocytes Th17 (Li et al., 2017a) (Figure 12).

Enfin, en contexte inflammatoire, en réponse à *Trichomonas musculus*, les cDC1 sont nécessaire à l'induction de lymphocytes Th1 dans l'intestin grêle et le colon. Il a d'ailleurs été montré, à l'homéostasie, que les cDC1 sont la source majeure d'IL-12 dans le MLN (Joeris et al., 2017).

Dans les conditions inflammatoires de la MC et de la CU, les MLNs recrutent de nombreuses cellules immunitaires innées via l'axe CCR7/CCL14-CCL20. En immunohistochimie, dans les MLNs de patients atteints de MC, des cDCs BDCA3⁺ (cDC1) ont été détectées dans les sinus sous-capsulaires et médullaires, les vaisseaux et à la frontière entre zones T et B ; des cDCs BDCA1⁺ (cDC2), dans la mantle zone essentiellement, avec quelques cellules dans les sinus médullaires (Verstege et al., 2008). Par cytométrie de flux, une augmentation des cDC1 et cDC2 CD11c^{hi}CD14⁻HLADR^{int}, aux dépens des DCs CD11c^{hi}CD14⁻HLADR^{hi}, a été montrée dans les cMLN et les sMLN de patients avec MC et CU (Magnusson et al., 2016). De plus, les cDCs CD11c⁺HLA-DR^{high} et HLA-DR^{int}, isolées des MLNs de patients atteints de MC, induisent, dans une réaction lymphocytaire mixte, une bien plus forte production d'IFN- γ que les cDCs isolées de patients contrôles ou atteints de CU (Sakuraba et al., 2009). Ces cDCs produisent sous stimulation bactérienne, de plus grandes quantités d'IL-23 (IL-12p40 et IL-23p19), une quantité égale d'IL12p70 et une quantité inférieure d'IL-10 en MC par rapport à la CU (Sakuraba et al., 2009).

D'autre part, tel que chez la souris, des DCs dérivées des monocytes sont recrutées dans les tissus non lymphoïdes (peau, articulations, ascite tumorale) et lymphoïdes (rate) en contexte

inflammatoire. Non décrites pour l'instant dans les MLNs humains, elles expriment HLA-DR, CD11c, SIRP α et CD14 et induisent la polarisation de lymphocytes T naïfs en Th17 (Segura and Amigorena, 2013; Segura et al., 2013).

Enfin, il avait été montré dans notre laboratoire, une accumulation de MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ dans les cMLNs de patient avec MC dont la nature restait à déterminer.

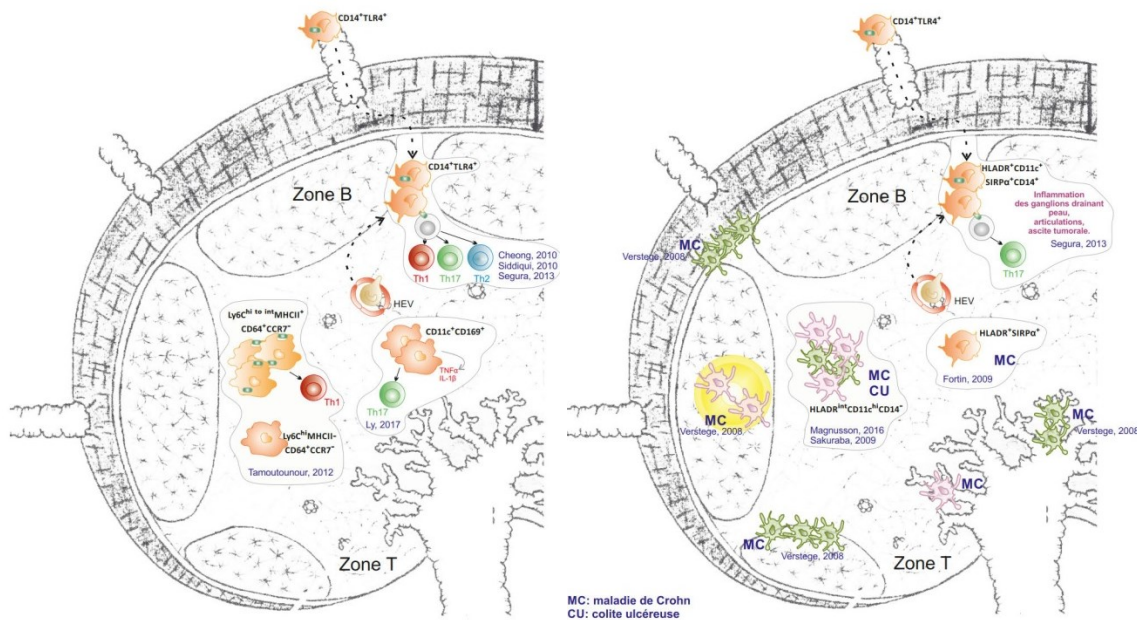


FIGURE 12 : PHAGOCYTES MONONUCLEES DES GANGLIONS LYMPHATIQUES CHEZ LA SOURIS (A GAUCHE) ET L'HUMAIN (A DROITE) AU COURS DE L'INFLAMMATION

Caractéristiques phénotypiques des MNPs ganglionnaires rapportés chez la souris et chez l'humain, en contexte inflammatoire.

C.4.1.1.d. QUESTIONS RESTANTES

La caractérisation des MNPs intestinaux a nettement progressé ces dernières années, en particulier chez la souris. Chez l'humain, les données restent peu nombreuses, notamment en contexte inflammatoire. Le manque de concordance entre les études amène l'hypothèse d'une hétérogénéité au sein des MNPs qui n'a été pour l'instant que partiellement appréhendée. Dans

notre laboratoire, il avait été démontré, dans un modèle murin, que les cellules coliques et ganglionnaires CD103⁻ pouvaient être discriminées positivement par le marqueur SIRP α . Ces cellules CD103⁻SIRP α ⁺ s'accumulaient dans les MLNs et le colon dans un modèle de colite au TNBS et étaient absentes chez les souris déficientes en CD47 (ligand du SIRP α), qui étaient protégées de la colite. La reconstitution de souris déficientes en CD47 avec des cellules CD103⁻SIRP α ⁺, co-exprimant CD47 et provenant de souris sauvages, étaient capable d'induire une colite associée à un infiltrat de type Th17 (Fortin et al., 2009). Il avait été également mis en évidence que l'équivalent humain de ces cellules (ClassII⁺CD103⁻SIRP α ⁺) était présent dans la muqueuse colique et les mLN de patients atteints de MC (Baba et al., 2013). Cette population s'accumulait dans les tissus inflammatoires et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires était restreinte à ces cellules (Baba et al., 2013). Or, lorsque nous avons initié la présente étude, certains auteurs suggéraient que des DCs CD103⁻ s'accumulaient dans la muqueuse inflammatoire intestinale humaine (Watchmaker et al., 2014), alors que d'autres décrivaient une accumulation de macrophages CD14⁺ en MC et CU (Kamada et al., 2008; Ogino et al., 2013; Thiesen et al., 2014). D'autre part, des DCs inflammatoires (DCs Inf) dérivant des monocytes, avaient aussi été décrites dans plusieurs modèles murins de maladies inflammatoires (Segura and Amigorena, 2013), et rapportées chez l'homme dans l'arthrite rhumatoïde et l'ascite tumorale (Segura et al., 2013). La composition précise de l'infiltrat de MNPs (cDCs, macrophages ou cellules dendritiques dérivant des monocytes) restait donc à éclaircir. La présente étude avait donc pour objectif de caractériser phénotypiquement, moléculairement et fonctionnellement les cellules ClassII⁺CD103⁻SIRP α ⁺ s'accumulant dans la muqueuse et dans les MLN de patients atteints de MC et de CU (Résultats sections A, B et C).

C.4.1.2. GRANULOCYTES - MASTOCYTES

Les granulocytes sont des cellules myéloïdes, comprenant les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles, qui se distinguent selon l'affinité de leurs granules pour les colorants histologiques. On les retrouve dans le sang et dans les tissus. Les mastocytes, cellules tissulaires, ne sont pas considérés comme des granulocytes malgré la présence de granules dans leur cytoplasme.

C.4.1.2.a. POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES

Les neutrophiles représentent 50 à 70% des leucocytes circulants. Ils sont produits dans la moelle osseuse sous l'influence du GM-CSF, du G-CSF, de l'IL-3 et de l'IL-6. Ils contiennent quatre types granules en fonction de leur stade de maturation. Les granules primaires ou azurophiliques contiennent des enzymes (myéloperoxydase, élastase, cathepsin G, métalloprotéinases). Les granules secondaires contiennent notamment de la lactoferrine et des collagénases (MMP-8). Les autres granules sont les granules tertiaires contenant de la gélatinase-B (MMP-9) et les vésicules sécrétoires (Fournier and Parkos, 2012). Les neutrophiles expriment de nombreux récepteurs dont des récepteurs de médiateurs inflammatoires (FPR1: récepteurs du fMLP, récepteurs des leucotriène B4) ; des récepteurs de cytokines pour l'IFN- γ , le TNF- α , le G-CSF, le GM-CSF, l'IL-4 et l'IL-6; des récepteurs de chimiokines (CXCR1 et CXCR2: récepteurs de l'IL-8) ; des récepteurs des immunoglobulines G (CD64) et des PPRs (tous les TLRs, à l'exception du TLR3) (Fournier and Parkos, 2012).

Les neutrophiles sont absents dans la muqueuse intestinale saine humaine, mais leur présence est cruciale en cas de lésions tissulaires pour protéger l'hôte des pathogènes invasifs (Wera et al., 2016). Ils sont alors recrutés dans les muqueuses via un processus de transmigration endothéliale

impliquant les intégrines CD11a, CD11b, CD11c, CD11d et CD18. Leur recrutement est favorisé par l'IL-8, sécrétée principalement par les cellules épithéliales et les MNPs, puis par les neutrophiles eux-mêmes, notamment sous l'influence de fragments de collagène produits lors de la transmigration. Le fMLP produit par les bactéries, a aussi un rôle chimiotactique sur les neutrophiles. Il favorise également l'activation des neutrophiles de concert avec l'IL-1 β , l'IL-8, le G-CSF, le GM-CSF, l'IFN- γ , le TNF- α (Wera et al., 2016). Ces cytokines favorisent aussi la survie des neutrophiles en inhibant leur apoptose. Les neutrophiles ont un rôle bactéricide, en reconnaissant, phagocytant et tuant les pathogènes, via la production de radicaux libres, l'activation des enzymes lytiques et des peptides antimicrobiens contenus dans leurs granules et la production de pièges extracellulaires ('NETs : neutrophils extracellular traps'). Les neutrophiles ont aussi un rôle dans la réparation épithéliale en limitant leur propre recrutement et en sécrétant des médiateurs lipidiques tels que l'annexin A4, les lipoxines, les resolvines et les protectines qui favorisent l'efferocytose des neutrophiles par les M ϕ résidents. En effet, ils doivent être correctement éliminés après la résolution de l'inflammation pour éviter de perpétrer des dommages épithéliaux (Fournier and Parkos, 2012).

Dans les MII, la présence de neutrophiles définit l'activité histologique de la maladie (Magro et al., 2013). En CU, l'infiltration neutrophilique corrèle avec la sévérité de la maladie (Lemmens et al., 2013) et la quantité de neutrophiles est prise en compte dans les scores de sévérité histologique (Magro, 2013). De plus, une augmentation de l'activité chémotaxique et de la production de ROS a été rapportée en CU. En MC, la contribution des neutrophiles est plus difficile à définir. Plutôt qu'une hyperactivation neutrophilique, certains auteurs ont suggéré une dysfonction neutrophilique ou un défaut de recrutement (Fournier and Parkos, 2012). Cette dysfonction pourrait conduire à une élimination incomplète des antigènes bactériens dans le tissu

et favoriser la persistance de l'inflammation et la formation de granulomes. Chez la souris, ce double rôle des neutrophiles est appuyé par la discordance des études, montrant soit une amélioration, soit une aggravation de la colite lors de la déplétion en neutrophiles (Wera et al., 2016). Chez l'humain, l'hypothèse de la dysfonction neutrophilique est illustrée par les mutations génétiques causant une neutropénie ou altérant la fonction neutrophilique (granulomatose septique chronique, glycoséose de type 1B), qui s'accompagnent de manifestations cliniques similaires à celles de la MC (Peloquin et al., 2016). Cependant, dans les MC non monogéniques, une augmentation de la fréquence et de l'activation des neutrophiles (évaluée par le niveau d'expression de CD66b) dans la muqueuse inflammatoire a été démontrée par cytométrie de flux, immunohistochimie et microscopie confocale (Kvedaraite et al., 2015; Lampinen et al., 2008; Pelletier et al., 2010). De plus, l'expression de CD64 (autre marqueur d'activation des neutrophiles) sur les neutrophiles circulants est corrélée à l'activité clinique de la MC et à la CRP ainsi qu'à la sévérité endoscopique dans une cohorte pédiatrique (Minar et al., 2014). Dans notre laboratoire (voir Annexe 2), nous avons également montré que le pourcentage des neutrophiles augmentait dans le colon inflammatoire et était corrélé avec la sévérité de la maladie évaluée par le SES-CD (Therrien et al., 2018). De plus, l'expression de CD66b dans la muqueuse (mais pas dans le sang) et de CD64 dans le sang (mais pas dans la muqueuse) corrélaient avec la sévérité endoscopique. Nous avons aussi montré qu'un index d'activation neutrophilique (MFI de CD66b dans la muqueuse x CD64 dans le sang) corrèle avec le SES-CD et permet la discrimination entre les maladies légères et sévères (Therrien et al., 2018). Ces observations plaident donc, comme en CU, pour un rôle pro-inflammatoire des neutrophiles en MC. Toutefois, bien que nous ayons détecté des neutrophiles de faible densité (LDN) dans le sang et la muqueuse des patients atteints de MC (données non montrées), nous n'avons pas

étudié la possible hétérogénéité des neutrophiles dans les MII. En effet, plusieurs types de neutrophiles ont été rapportés, en fonction de leur phénotype (CD177⁺ ou ⁻), de leur demi-vie, de leur réponse à la stimulation bactérienne, de leur densité ('low density versus high density neutrophils') ou de leur capacités anti- (N1) ou pro- (N2) tumorales (Garley and Jablonska, 2018). Notamment, la fréquence de LDN corrélait avec la sévérité de la maladie et/ou la réponse au traitement dans des vasculites ou dans le lupus systémique juvénile, alors que des LDN ayant des fonctions immunosuppressives ont aussi été décrits au cours de sepsis, de myelomes ou de lymphomes (Garley and Jablonska, 2018). De plus, une étude récente dans les cancers pulmonaires non à petites cellules a révélé l'existence d'un continuum de 5 populations de neutrophiles au sein du tissu, qui corrélaient mal avec les populations de neutrophiles circulants (Zilionis et al., 2019). La population N1 exprimait des marqueurs canoniques de neutrophiles et progressait graduellement vers une population N5 spécifique de la tumeur, favorisant la croissance tumorale et contenant de nombreux gènes prédictifs d'un moins bon taux de survie du patient. Finalement, en MII, des neutrophiles CD177⁺ s'accumulant dans le sang et la muqueuse des patients ayant une maladie active ont été rapportés. Ces neutrophiles ont une activité bactericide augmentée et produisent plus d'IL-22 que les neutrophiles CD177⁻ et pourraient ainsi avoir un rôle protecteur dans les MII (Zhou et al., 2018). Ceci indique que la poursuite des efforts de caractérisations phénotypique et fonctionnelle des différents types de neutrophiles présents dans le sang et la muqueuse des patients atteints de MII est nécessaire puisqu'elles pourraient avoir, comme pour les tumeurs, des implications pronostiques et thérapeutiques bénéfiques pour les patients.

Les polynucléaires éosinophiles représentent moins de 5% des leucocytes circulants. Leur développement et leur activation sont sous la dépendance de l'IL-5, de l'IL-3 et du GM-CSF (Woodruff et al., 2011). Comme les neutrophiles, ils possèdent quatre types de granules. Ceux-ci contiennent les protéines basiques majeures (MBP-1 et MBP-2), la protéine cationique éosinophilique et la neurotoxine dérivée de l'éosinophile qui ont pour but d'augmenter la perméabilité membranaire et de créer des pores dans les cibles des éosinophiles. De plus, la peroxydase de l'éosinophile induit la formation de produits oxydants toxiques pour les cellules. Des médiateurs et des cytokines (IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, TNF- α , GM-CSF et TGF- β) préformés dans les granules sont relâchés lors de la dégranulation. Les éosinophiles sont recrutés dans la muqueuse via l'interaction de CCR3 à leur surface avec son ligand eotaxin-1, produit par les cellules de la lamina propria. La réponse des éosinophiles à l'eotaxin-1 est augmentée en présence d'IL-5, produite par les lymphocytes Th2 et les ILC2 en cas d'inflammation. Leur adhésion à l'endothélium se fait via les intégrines $\alpha 4\beta 7$, $\alpha 4\beta 1$ et $\beta 2$ (CD11b/CD18) (Woodruff et al., 2011).

Les éosinophiles sont présents dans le colon normal, en plus grande fréquence dans le caecum et le colon proximal que dans le colon distal et le rectum (DeBrosse et al., 2006). Ils participent à l'homéostasie tissulaire et leur absence a été associée à une diminution de la concentration d'IgA (Weller and Spencer, 2017).

Dans les MII, il a été montré que les éosinophiles pourraient avoir un rôle pathogénique en MC et en CU. Premièrement, on retrouve une concentration accrue d'eotaxin-1 dans les selles témoignant du recrutement accru d'éosinophiles dans la muqueuse inflammatoire (Woodruff et

al., 2011). Le nombre d'éosinophiles, leur viabilité et leur activité est augmenté dans la muqueuse inflammatoire en MC et en CU actives comparé à des sujets contrôles (Lampinen et al., 2008). En outre, en MC et en CU, les éosinophiles de la muqueuse inflammatoire, sécrètent un antagoniste de l'IL-22 ('IL22-binding protein') qui inhiberait les effets bénéfiques de l'IL-22 sur la barrière épithéliale (DeBrosse et al., 2006). Aussi, les éosinophiles circulants des patients avec une MII active relâchent plus d'ECP, dont les taux sont corrélés à l'activité clinique de la maladie, que ceux ayant une maladie en rémission (Luck et al., 1997). En MC, la présence des éosinophiles dans la muqueuse des patients en rémission est prédicteur de la rechute (Brennan et al., 2017) et ils sont présents dans la muqueuse inflammatoire lors de rechutes précoces après résection chirurgicale (Dubucquoi et al., 1995). Dans notre laboratoire (Voir Annexe 2), nous avons montré que le pourcentage des éosinophiles n'augmentait ni dans le colon inflammatoire ni dans le sang des patients avec une MC active (SES-CD ≥ 3) comparé aux maladies en rémission (SES-CD 0-2). L'activation des éosinophiles mesurée par l'expression de CD66b ou CD64 ne corrélait pas avec la sévérité endoscopique. L'expression de CD66b était toutefois supérieure dans la muqueuse que dans le sang, chez les patients ayant une maladie active (Therrien et al., 2018). Il faut toutefois noter que les éosinophiles pourraient aussi avoir un rôle double dans l'intestin. En effet, l'absence d'éosinophile chez la souris aggrave la colite en raison d'un déficit en médiateur lipidique anti-inflammatoire (protectine D1), entraînant un afflux accru de neutrophiles (Masterson et al., 2015b). Le TGF- β sécrété par les éosinophiles pourrait avoir aussi un rôle anti-inflammatoire (Woodruff et al., 2011). Toutefois, les éosinophiles pourraient favoriser la fibrose. En effet, la présence des éosinophiles a été corrélée au degré de fibrose dans des biopsies iléales et dans des spécimens chirurgicaux de patients atteints de MC avec sténose iléale (Masterson et al., 2015a).

Les basophiles sont de rares granulocytes, représentant moins de 1% des leucocytes circulants. Ils sont surtout connus pour leur implication en tant que cellule innée effectrice dans les infections à helminthes et dans les pathologies allergiques dépendantes des IgE (Schroeder, 2011; Siracusa et al., 2013). Ils se différencient dans la moelle osseuse, avant de circuler dans le sang où ils ont une demi-vie courte, d'environ deux jours (Siracusa et al., 2013). L'IL-3 et la TSLP (Thymic stromal lymphopoietin) contribuent toutes deux à leur différenciation puisque un nombre de basophiles circulants normal est maintenu par la TSLP chez des souris déficientes en IL-3 (Lantz et al., 1998; Siracusa et al., 2011). Les basophiles expriment les récepteurs à l'histamine (HR1 à 4), à la prostaglandine E2 (CRTH2) et à l'IL-3 (CD123). Leur recrutement dans les tissus inflammatoires est sous la dépendance de l'histamine, de la prostaglandine D2 (sécrétées par les mastocytes) et de l'IL-3 (sécrétée par les lymphocytes T activés), cette dernière augmentant également l'expression de l'intégrine CD11b/CD18, nécessaire à l'adhésion des basophiles à l'endothélium vasculaire (Sarfati et al., 2015). Les basophiles expriment fortement le récepteur de haute affinité des IgE (FcεR1) et sont activés via le 'cross-linking' du FcεR1 par les complexes d'IgE liées à leur antigène. Ils libèrent alors des médiateurs contenus dans leurs granules cytotoxiques, comme l'histamine, des protéoglycanes (héparine, chondroïtine), et des enzymes protéolytiques (élastase et lysophospholipases). Ils sécrètent aussi des médiateurs lipidiques (leukotriènes), des cytokines (IL-4, IL-6, IL-13, TNFα, TSLP, GM-CSF) et des peptides antimicrobiens.

Les basophiles peuvent également être activés indépendamment du FcεR1, notamment par la TSLP. En effet, chez la souris, les basophiles induits par la TSLP, en l'absence de mastocytes et d'IgE, ont un rôle clé dans l'induction et la pérennisation d'un modèle d'œsophagite à

éosinophiles (Noti et al., 2013). Aussi, dans un modèle murin de dermatite de contact dépendant de la TSLP et dans la peau de patients atteints de dermatite atopique, les basophiles forment des agrégats avec les lymphocytes T, témoins de la coopération des basophiles avec les cellules de la réponse adaptative dans les pathologies allergiques impliquant les lymphocytes T (Sarfati et al., 2015). Premièrement, les basophiles coopèrent avec les DCs dans l'initiation des réponses Th2 en sécrétant l'IL-4 nécessaire à la polarisation de la réponse Th2 (Sarfati et al., 2015). De plus, il existe une amplification réciproque de la réponse entre les basophiles et les lymphocytes T mémoires activés : les lymphocytes T activés induisent la sécrétion d'IL-4 par les basophiles dans le poumon alors que l'IL-4 augmente la survie et la réponse cytokinique des lymphocytes Th2 *in vitro* (Wakahara et al., 2012). En plus des lymphocytes Th2 sécrétant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, des cellules sécrétant à la fois de l'IL-4 et de l'IL-17 ont été décrites chez les patients ayant un asthme sévère et dans les poumons de souris asthmatiques (Wakahara et al., 2013).

En plus de promouvoir les réponses de type Th2, il avait été montré dans notre laboratoire que les basophiles amplifiaient les réponses Th17 *in vitro*. En effet, dans le sang humain, les basophiles activés, soit par l'IL-33, l'IL-3 ou la TSLP augmentaient la réponse Th17 et Th17/Th1, dans des T_{EM} stimulés par l'IL-2 ou dans des T_{CM} stimulés via le TCR. Il avait aussi été observé que les basophiles pouvaient être détectés dans le colon inflammatoire d'un pool de patients atteints de MII (MC et CU) et que l'histamine dérivée des basophiles était requise mais pas suffisante pour promouvoir les réponses de type Th17 dans des lymphocytes mémoires circulants isolés de sujets sains (Wakahara et al., 2013).

Cependant, la majorité des lymphocytes T mémoires ne résident pas dans le sang circulant mais dans les tissus lymphoïdes, depuis lesquels ils rejoignent les tissus périphériques. D'autre part, le

nombre de patients inclus dans l'étude suscitée était insuffisant pour déterminer s'il y existait des différences entre la MC et la CU en terme d'implication des basophiles sur les réponses Th17. Dans le présent travail (Résultats section 4), nous avons d'abord étudié la fréquence des basophiles dans le sang et la muqueuse intestinale de patients atteints de MII, puis observé la réponse *in vitro* de lymphocytes T mémoires (T_{CM} et T_{EM}), isolés des MLNs de patients, à des basophiles autologues ou allogéniques provenant de la muqueuse intestinale ou du sang.

C.4.1.2.e. MASTOCYTES

Les mastocytes quittent la moelle osseuse sous forme de précurseurs $CD34^+$ puis se différencient et arrivent à maturation dans les tissus périphériques. Ils sont donc des cellules résidentes des tissus qui représentent 2 à 3% des cellules de la lamina propria intestinale (Bischoff, 2016). Dans l'intestin, on retrouve des mastocytes sécrétant uniquement des tryptases dans la muqueuse, ainsi que des mastocytes sécrétant des tryptases et des chymases dans la sous-muqueuse et le tissu conjonctif (Bischoff, 2016). La liaison du $Fc\epsilon RI$, qu'ils expriment à leur surface, aux IgE stimule la dégranulation des mastocytes et leur relâche d'histamine. Ils peuvent aussi être activés par l'IL-3 et le LPS. Ils produisent alors de la prostaglandine D2 qui contribue au recrutement des basophiles et des éosinophiles ainsi que des leucotriènes B4, du GM-CSF, de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-8 qui favorisent le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles dans la muqueuse. Ils ont aussi un rôle sur la perméabilité intestinale, le péristaltisme et les fonctions sécrétoires épithéliales (Bischoff, 2016).

Dans la CU, la fréquence de mastocytes exprimant de la chymase est diminuée dans la muqueuse inflammatoire par rapport aux sujets contrôles, mais pas chez les patients en rémission. En MC,

on observe une augmentation des mastocytes exprimant de la chymase dans la muqueuse des patients atteints de MC active et non active en comparaison avec les sujets sains (Andoh et al., 2006). Ces cellules sont surtout situées dans la sous-muqueuse, la musculuse et autour du tissu adipeux. D'autres auteurs ont montré une infiltration de mastocytes dans les tissus fibrotiques des patients atteints de MC, suggérant un rôle possible dans la fibrogénèse (Gelbmann et al., 1999). Enfin, certains auteurs ont également montré une relâche accrue d'histamine par les mastocytes intestinaux dans la MC et la CU comparé aux sujets sains (Xie and He, 2005). Dans notre laboratoire, de même que pour les basophiles, nous avons étudié la fréquence des mastocytes dans la muqueuse des patients atteints de MC et de CU par cytométrie de flux. Nos données, montrées dans la section 4 des résultats, ne montrent pas de différences de fréquence des mastocytes entre le tissu non-inflammatoire et inflammatoire du même patient et de sujets contrôles, en MC et en CU (Chapuy et al., 2014). Dans une autre cohorte (voir Annexe 1), nous avons montré que la fréquence des mastocytes dans la muqueuse colique n'était pas supérieure chez les patients avec MC active versus non active et qu'elle ne corrélait pas avec la sévérité endoscopique de la maladie. Toutefois, la fréquence des mastocytes étaient diminuée dans la sous-cohorte de patients ayant une maladie fibrosante ou fistulisante (Therrien et al., 2018). Ces contradictions avec la littérature peuvent être dues à la localisation cellulaire, notre étude n'ayant porté que sur les couches superficielles de l'intestin obtenues par prélèvements biopsiques.

C.4.1.3. CELLULES LYMPHOÏDES INNEES

Les cellules lymphoïdes innées (ILC) sont des cellules rares de la lignée lymphoïde, dépendantes de l'IL-7 pour leur survie et présentes dans les muqueuses. Par analogie aux lymphocytes T CD4⁺, elles sont classées, en fonction de leur phénotype et de leur production de cytokines, en trois groupes qui sont tous présents dans l'intestin (Peters et al., 2016). Les ILC1 expriment T-bet et produisent de l'IFN- γ , les ILC2 expriment GATA3 et produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 et les ILC3 expriment ROR γ t et produisent de l'IL-17 et de l'IL-22. Les ILC3 comprennent les LTi ('lymphoid tissue inducer cells') qui sont impliquées dans la formation des MLNs et des plaques de Peyer dans l'intestin (Peters et al., 2016). Dans la lamina propria intestinale humaine normale, la majorité des ILCs sont des ILC3 exprimant NKp44 et NKp46, alors que des ILC3 NCR⁺ sont retrouvées dans les plaques de Peyer et les MLNs. Les ILC3 NCR⁺ produisent de l'IL-22 sous l'influence de l'IL-23, de l'IL-1 β et de ligands de AHR, promouvant l'intégrité de la barrière épithéliale et la défense antibactérienne (Peters et al., 2016). De plus, l'expression de CMH de classe II par les ILC3 NCR⁻ leur permet de restreindre la réponse des lymphocytes T CD4⁺ aux bactéries commensales (Hepworth et al., 2013).

Dans les MII, les cellules NK cytotoxiques CD56^{low}, qui font partie des ILC1, sont augmentées dans la lamina propria des patients (Steel et al., 2011). Dans la MC, les ILC1 non NK s'accumulent dans la muqueuse inflammatoire alors que la fréquence des ILC3 NCR⁺ diminue (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013). Deux sous-populations d'ILC1 non-NK ont été décrites, CD127⁻ et CD127⁺, produisant toutes deux de l'IFN- γ , mais différant par leur phénotype et leur localisation. Les ILC1s CD127⁻ résident dans l'épithélium et sont retrouvées en plus grande fréquence, au sein des lymphocytes intra-épithéliaux, dans la muqueuse

inflammatoire comparé à la muqueuse non-inflammatoire dans la MC. Elles répondent à l'IL-12 et l'IL-15 qui induisent la sécrétion d'IFN- γ (Fuchs et al., 2013). Les ILC1s CD127⁺ sont retrouvées dans la lamina propria. Elles produisent de grande quantité d'IFN- γ en réponse à l'IL-12 et à l'IL-18 (Bernink et al., 2015) et leur fréquence augmente dans la MC (Bernink et al., 2013). Par ailleurs, une augmentation d'ILC3 NCR⁻ produisant de l'IL-17 et de l'IFN- γ est observée dans le colon et l'iléon de patients atteints de MC mais pas de CU (Geremia et al., 2011). En fait, il a été montré que les ILC3 CD127⁺ étaient plastiques et pouvaient se différencier en ILC1 en perdant leur capacité à produire de l'IL-22 et en augmentant leur production d'IFN- γ sous l'effet de l'IL-12 et de l'IL-18 sécrétées par les MNPS CD14⁺ muqueux (Bernink et al., 2015). Cependant, il a aussi été montré que la production d'IL-22 par les ILC3 était augmentée dans le colon inflammatoire des patients avec MC. Cette production d'IL-22 est régulée par les MNPs CD14⁺ muqueux via l'IL-23, l'IL-1 β et le TL1A qu'ils sécrètent (Longman et al., 2014). Ceci est en cohérence avec les observations de Bernink et al. qui montrent que l'IL-23, l'IL-1 β et l'acide rétinoïque favorisent la conversion d'ILC1 en ILC3 (Bernink et al., 2015).

Au total, il semble que les ILC-1 (et/ou ex-ILC3) jouent un rôle dans la MC, alors que leur implication n'a pas été montrée dans la CU. Au cours de notre travail, nous avons tenté d'étudier l'impact de nos sous-populations de MNPs sur les ILCs isolées de la muqueuse des patients. Cependant, nous n'avons pas été en mesure de purifier suffisamment d'ILCs pour permettre l'étude de leurs interactions avec les MNPs. Les ILCs n'ont donc pas été étudiées plus avant dans notre étude.

C.4.2. ROLE DES CELLULES ADAPTATIVES DANS LES MII

C.4.2.1. LYMPHOCYTES B, PLASMOCYTES, ANTICORPS

Le rôle de la réponse B dans les MII est débattu. Cette réponse pourrait être pathogénique, protectrice (via le contrôle direct du microbiote par les IgA sécrétoires), ou simplement associée, reflétant la réponse pathogénique T. Certains patients atteints de MII monogéniques présentent une agammaglobulinémie dont la correction n'améliore pas l'inflammation intestinale, suggérant que l'absence d'immunoglobuline n'est pas responsable de la maladie (Uhlir et al., 2014). Chez la plupart des patients atteints de MII, des anticorps sont présents dans le sérum (pANCA, anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae*, anti-OmpC, anti-flagelline), en quantité variable en CU et en MC, parfois des années avant les premières manifestations cliniques de la maladie (Choung et al., 2016). Cette présence différentielle d'anticorps entre les deux MII est d'ailleurs maintenant utilisée, en combinaison avec des marqueurs génétique et inflammatoire, pour aider au diagnostic différentiel entre MC et CU (Prometheus® IBD sgi Diagnostic™). Aussi, un fort recouvrement des bactéries commensales par les IgA permettrait d'identifier les bactéries colitogéniques (Palm et al., 2014). La présence d'anticorps semble être une réponse associée à la maladie plutôt qu'un événement causal. Cependant, la présence de taux élevés d'anticorps est associée à une MC ou une CU plus sévère et plus compliquée (Elkadri et al., 2013). Aussi, la présence d'anticorps anti-GM-CSF est un marqueur de MC agressive alors qu'un polymorphisme 'perte de fonction' du récepteur du GM-CSF est associé à un risque accru de MC. Ceci suggère que chez certains patients des anticorps spécifiques ne sont pas simplement des biomarqueurs mais contribuent à la pathogénèse de la maladie (Gathungu et al., 2013). En dehors de la réponse sérologique, d'autres mécanismes peuvent aussi impliquer les lymphocytes B intestinaux, dont la fréquence est augmentée dans la

muqueuse intestinale chez les patients atteints de MII (Mann and Li, 2014). Il a été montré que les lymphocytes B sont plus activés, qu'ils produisent plus de chimiokines, notamment d'eotaxine-1, responsable de l'attraction d'éosinophiles, et moins d'IL-10 (Mann and Li, 2014). Aussi, la fréquence de plasmocytes IgG⁺CXCR4⁺ augmente dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de CU ce qui pourraient contribuer à la pathogénèse de la maladie, en activant via le FcγR, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les Mφ CD14⁺ de la muqueuse (Uo et al., 2013). Ainsi, le rôle de la réponse B dans les MII mérite d'autres investigations qui n'ont pas été l'objet de ce travail.

C.4.2.2. LYMPHOCYTES T

C.4.2.2.a. LYMPHOCYTES T MEMOIRES

Les lymphocytes T mémoires (LTM) constituent la plus abondante population de lymphocytes T chez un adulte (Sathaliyawala et al., 2013). Ils assurent une protection à long terme contre les organismes pathogènes, protection d'autant plus d'importante que l'humain a une espérance de vie longue et qu'il est exposé à de nombreux pathogènes, notamment via la colonisation des muqueuses (Thome et al., 2014). Il a été bien montré chez la souris que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs s'activent après rencontre avec leur antigène spécifique, en présence de co-signaux, prolifèrent et se différencient en lymphocytes T effecteurs. La majorité de ces lymphocytes T effecteurs activés ont une durée de vie courte, meurent lors de la contraction de la réponse immunitaire et sont donc rarement retrouvés à l'homéostasie (Farber et al., 2014). Cependant, une population d'effecteurs terminaux nommées T_{EMRA} (CD45RA⁺CCR7⁻) a été décrite en circulation, chez l'humain uniquement, essentiellement parmi la lignée CD8⁺ en cas d'infection virale persistante (CMV) mais aussi dans la lignée CD4⁺ lors d'infection par la

Dengue (Kumar et al., 2018). D'autre part, une petite partie des lymphocytes T générés lors de la réponse primaire survit, pour constituer une population hétérogène de lymphocytes T mémoires (LTM) à durée de vie longue. Chez l'humain, la grande majorité des LTM (20×10^{10}) réside dans les organes lymphoïdes (ganglions lymphatiques, moelle osseuse et rate), puis dans les tissus périphériques (3×10^{10} dans l'intestin); le pool de lymphocytes circulants (10×10^9) ne représentant qu'une minorité des LTM de l'organisme (2,5%) (Farber et al., 2014). Il a été récemment démontré que les populations de LTM se différenciaient selon un modèle de différenciation linéaire, la cellule T naïve (T_N : $CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+CD62L^+CD27^+CD127^+$) donnant naissance à une cellule souche mémoire (T_{SCM} : $CD45RA^+CD45RO^-CCR7^+CD62L^+CD27^+CD127^+CD95^+CD122^+$), puis à une cellule centrale mémoire (T_{CM} : $CD45RA^-CD45RO^+CCR7^+CD62L^+$), puis effectrice mémoire (T_{EM} : $CD45RA^-CD45RO^+CCR7^-CD62L^-$), et enfin effectrice, cellule terminale de la différenciation (Durek et al., 2016; Sallusto et al., 1999; Takeshita et al., 2015). Les T_{SCM} et T_{CM} sont retrouvés dans le sang et les tissus lymphoïdes et ont une grande capacité de prolifération (Farber et al., 2014). Comme les T_{CM} , les T_{EM} peuvent produire de l'IL-2 et des cytokines effectrices, mais en plus grande quantité et ont la capacité de migrer vers les tissus non lymphoïdes. Ainsi, les T_{EM} constituent, dès la fin de l'enfance, la majorité des lymphocytes T dans les tissus, notamment dans la muqueuse intestinale (plus de 80% des $CD8^+$ et 65 à 80 % des $CD4^+$ dans le jéjunum, iléon et colon), alors qu'ils ne représentent que 20 à 30% des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques, notamment les MLNs (Kumar et al., 2018). Il a également été démontré chez l'animal, que les T_{EM} étaient capables de recirculer des tissus vers les LNs (Lira, 2005). Cette recirculation requiert CCR7 qui peut donc être acquis de nouveau par les T_{EM} après leur migration dans les tissus (Debes et al., 2005). Cependant, il a été récemment établi que les T_{EM} comprennent une

large population de cellules, nommée lymphocytes T mémoires résidents (T_{RM}), qui sont retenus dans les tissus et qui représentent la majorité des lymphocytes T dans l'intestin dès l'âge de deux ans chez l'humain (Sathaliyawala et al., 2013; Thome et al., 2014). Cette sous-population exprime CD69 qui promeut la rétention tissulaire en séquestrant le récepteur du SIP (sphingosine 1 phosphate), empêchant ainsi leur attraction dans la lymphe (Schenkel and Masopust, 2014). Elle peut également exprimer CD103 mais pas CD25, CD38 ni HLADR, la différenciant de lymphocytes effecteurs activés (Kumar et al., 2017). Elle a été définie moléculairement, chez l'humain et chez la souris, par la surexpression de CD49a, CXCR6 et la diminution de l'expression de CD62L, CX3CR1, S1PR1 et KLF2 (Kumar et al., 2017). Dans l'intestin humain, 70% des LTM $CD4^+$ mémoires expriment CD69, mais moins de 10% sont $CD69^+CD103^+$, alors que 70% des LTM $CD8^+$ sont $CD69^+CD103^+$ (Kumar et al., 2017). Ces cellules semblent avoir un double rôle, à la fois protecteur puisqu'elles expriment de plus haut niveaux de cytokines (telles que $IFN-\gamma$, IL-17, $TNF-\alpha$, IL-2) que les T_{EM} circulants, mais également régulateur plus qu'elles expriment aussi plus d'IL-10, de PD-1, LAG3 et CTLA-4 et ont une faible capacité de prolifération (Kumar et al., 2017). Les T_{RM} persistent donc à un stade quiescent dans les tissus, promouvant ainsi leur longévité. Ils ont des fonctions régulatrices empêchent une activation intempestive dans le tissu, mais gardent la capacité de répondre rapidement en cas d'invasion par des pathogènes (Kumar et al., 2018). Il faut noter que chez l'humain, des T_{RM} exprimant CD69 mais pas CD103, ont été également décrits dans les tissus lymphoïdes, notamment les MLNs (Sathaliyawala et al., 2013).

Les lymphocytes T sont catégorisés en lymphocytes T CD8⁺ ou CD4⁺, en fonction du cluster de différenciation qu'ils expriment, leur permettant d'interagir respectivement avec les molécules du CMH de classe I ou de classe II, exprimées à la surface des APCs. Les lymphocytes T CD4⁺ ou 'helper' (Th) sont des orchestrateurs centraux de la réponse immunitaire par leurs interactions avec les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes B, ainsi que par les cytokines qu'ils produisent qui activent ou modulent les cellules immunitaires innées, stromales et épithéliales. Lors de la reconnaissance du peptide antigénique spécifique présenté via le CMH de classe II à la surface des APCs, la polarisation des lymphocytes CD4⁺ naïfs en différentes catégories de Th est alors influencée par des signaux de co-stimulation spécifiques et le milieu cytokinique.

Chacun des sous-types de lymphocytes Th est caractérisée par l'expression d'un régulateur principal qui induit l'engagement dans une lignée. Les acteurs (cytokines inductrices, régulateurs principaux et co-facteurs, cytokines sécrétées, molécules de surface) impliqués dans la différenciation des lymphocytes Th, tel que classiquement définis en Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, T follicular helper et T régulateurs, sont résumés dans la Figure 13.

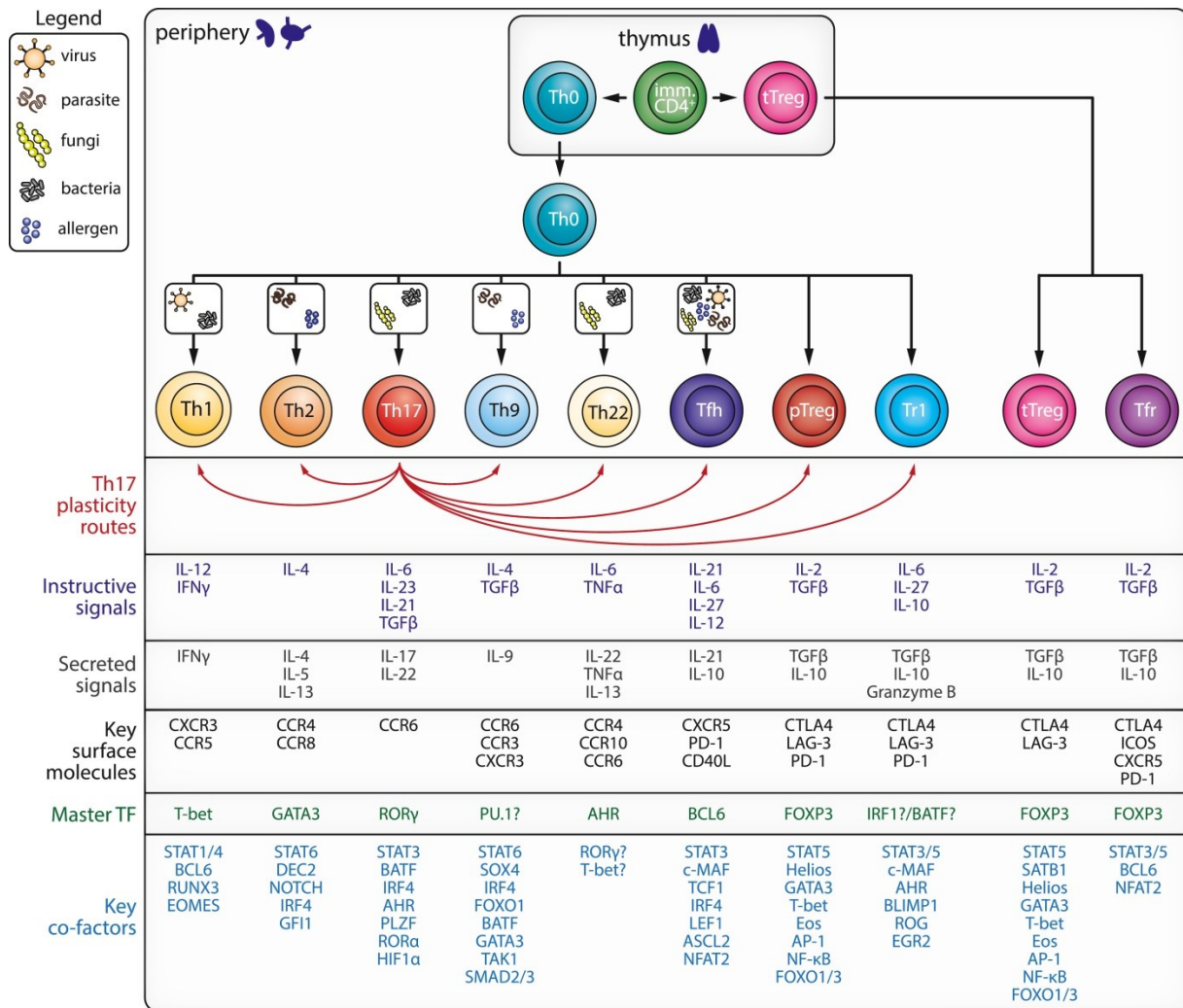


FIGURE 13: DIFFÉRENTIATION DES LYMPHOCYTES T HELPER CD4⁺

D'après Stadhouders et al. Journal of Autoimmunity 2018 (<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.007>).

Image libre de droit (Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND)).

Il faut cependant retenir que la différenciation de chaque lignée est orchestrée par des réseaux complexes impliquant plusieurs régulateurs, parfois partagés entre les lignées, permettant la plasticité de certaines d'entre elles. Des études récentes chez l'humain montrent d'ailleurs que l'exposition in vitro de lymphocytes CD4⁺ à de nombreuses combinaisons de cytokines résulte en un continuum plutôt qu'en un nombre limité de phénotypes distincts (Eizenberg-Magar et al.,

2017). D'autre part, une étude en cytométrie de masse montre que les lymphocytes Th humains ne peuvent pas facilement être séparés en lignées distinctes et que les profils de sécrétion se chevauchent entre les lignées (Wong et al., 2016).

L'implication des lymphocytes T CD4⁺ dans l'induction et le maintien de la colite a été montrée chez la souris (Brasseit et al., 2015). Chez l'humain, l'efficacité du Vedolizumab, anticorps monoclonal ciblant l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ exprimée sur les lymphocytes T à tropisme digestif, démontre l'implication des lymphocytes T dans la CU (Feagan et al., 2013) et la MC (Sandborn et al., 2013).

Nous décrivons les différents types de lymphocytes T helper impliqués dans les MII, en commençant brièvement par les lymphocytes Th1, Th2, Th9, Th22 et T régulateurs, puis en décrivant précisément les Th17 qui ont fait l'objet de notre étude.

C.4.2.2.b.I. LYMPHOCYTES TH1

Les lymphocytes Th1 produisent principalement de l'IFN- γ et du TNF- α et sont cruciaux dans la défense contre les virus et les bactéries intracellulaires en activant les macrophages qui détruisent ces bactéries. Leur différenciation est initiée en présence d'IL-12 et d'IFN- γ qui induisent respectivement les facteurs de transcription STAT4 et STAT1. Ceux-ci augmentent directement le principal régulateur de Th1, le facteur de transcription T-bet codé par le gène *TBX21*, dont les gènes cibles incluent *IFN- γ* et *CXCR3* (Romagnani, 1999). L'expression d'IFN- γ dans l'intestin de patients atteints de MC étant plus élevée que chez les patients sains (Fuss et al., 1996; Sakuraba et al., 2009), et le rôle des Th1 étant suggéré par plusieurs modèles murins (Powrie et al., 1994; Simpson et al., 1998), la MC a d'abord été considérée comme une maladie de type Th1. Cependant, la découverte du rôle des Th17 dans la pathogénèse de la maladie et

l'absence d'efficacité thérapeutique du Fontolizumab (anticorps monoclonal anti-IFN- γ) ont minimisé l'implication des lymphocytes Th1 dans la MC (Reinisch et al., 2006).

C.4.2.2.b.II. LYMPHOCYTES TH2

Les lymphocytes Th2 produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, contrôlent les infections à helminthes et sont impliqués dans l'allergie par la prolifération d'IgE qu'ils induisent. La différenciation en Th2 est induite par l'IL-4 qui induit la phosphorylation de STAT6 qui augmente le facteur de transcription GATA3 (Romagnani, 1999). La colite ulcéreuse a été initialement considérée comme une maladie de type Th2 puisque que des niveaux élevés d'IL-5 et d'IL-13 avaient été détectés dans la muqueuse colique des patients (Fuss et al., 1996; Heller et al., 2005). Cependant, ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres (Biancheri et al., 2014) et certains auteurs ont même proposé un rôle protecteur de l'IL-13 dans une cohorte pédiatrique (Rosen et al., 2017). Finalement, deux anticorps monoclonaux anti-IL-13 ont échoué dans le traitement des patients avec colite ulcéreuse (Danese et al., 2015; Reinisch et al., 2015). D'autre part, un rôle de l'IL-33 et de son récepteur ST2, qui induisent la production de cytokines par les lymphocytes Th2, a été proposé dans la CU. Cependant, les études sont contradictoires puisque certaines montrent que l'IL-33 promeut la colite et compromet la réparation épithéliale alors que d'autres décrivent un effet protecteur dans la colite (Beltran et al., 2010). Finalement, il est généralement admis actuellement que la colite ulcéreuse, comme la maladie de Crohn est plutôt médiées par des Th de type Th17 (Globig et al., 2014).

C.4.2.2.b.III. LYMPHOCYTES TH9

Les lymphocytes Th9 sont induits par la combinaison d'IL-4 et de TGF- β , ce dernier supprimant GATA3 et empêchant ainsi la différenciation vers Th2. Cette combinaison induit les facteurs de transcription PU.1 (purine-rich box), IRF4 et STAT6. Les lymphocytes Th9

produisent de l'IL-9 et parfois de l'IL-10. Ils sont impliqués dans l'asthme allergique et l'encéphalite auto-immune expérimentale (Zhao et al., 2013). Plusieurs études plaident pour un rôle des lymphocytes Th9 dans les MII, notamment dans la CU, dans laquelle une fréquence augmentée de lymphocytes exprimant de l'IL-9 et PU.1 a été mise en évidence, ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-9 sur l'épithélium (Gerlach et al., 2014; Nalleweg et al., 2015). Le rôle des lymphocytes Th9 a été démontré dans un modèle de colite à l'oxazolone, mimant la CU, dans lequel l'IL-9 empêche la réparation épithéliale en inhibant les protéines de jonction cellulaire (Gerlach et al., 2014). Enfin, le déficit en IL-9 améliore aussi la colite au TNBS, modèle de MC, suggérant une possible implication des Th9 dans les deux MII (Gerlach et al., 2015).

C.4.2.2.b.IV. LYMPHOCYTES TH22

Les lymphocytes Th22 se différencient en réponse à l'IL-6 et au TNF α et la production d'IL-22 est dépendante du facteur de transcription AHR ('Aryl Hydrocarbon Receptor'). Il s'agit d'une population de lymphocytes T effecteurs indépendante des lymphocytes Th17 qui sont aussi des producteurs d'IL-22. Dans l'intestin, ils sont importants dans la défense contre *Citrobacter rodentium* et *Salmonella enterica* (Mizoguchi et al., 2018). L'IL-22, qui peut provenir de plusieurs sources cellulaires, dont les Th17 et les ILC2, est cruciale dans la réparation des cellules épithéliales intestinales via l'induction de STAT3 dans ces cellules et induit leur sécrétion de peptides anti-microbiens et de mucus (Mizoguchi et al., 2018). Un rôle protecteur des Th22 a été montré dans le modèle de colite par transfert de cellules T CD45RB^{hi} (Zenewicz et al., 2008), tandis que le nombre de Th22 dans la lamina propria de patients atteints de CU est diminué (Leung et al., 2014). De plus, les symptômes d'un patient atteint de CU ont été améliorés par l'administration volontaire de *Trichuris trichiura*, qui s'accompagnait d'une

expansion des lymphocytes T CD4⁺ produisant de l'IL-22 (Broadhurst et al., 2010). Toutefois, la production d'IL-22 par les lymphocytes T aggrave l'inflammation dans un autre modèle de colite par transfert de cellules T (CD4⁺CD45RB^{lo}) (Kamanaka et al., 2011) et les Th22 auraient un rôle dans l'induction du carcinome colorectal, complications des MII (Huang et al., 2015b).

C.4.2.2.b.V. LYMPHOCYTES T REGULATEURS

Les lymphocytes T régulateurs (Treg) sont retrouvés en grand nombre dans la muqueuse intestinale et leur présence est indispensable au maintien de la tolérance intestinale (Panduro et al., 2016). L'intestin contient deux grands types de Treg, exprimant le FT Foxp3 : les uns générés dans le thymus (tTreg), migrant vers les organes lymphoïdes en tant que tTreg naïfs où ils sont capables de reconnaître les antigènes du soi et de contrôler les réponses auto-immunes (Luu et al., 2017) ; les autres, différenciés en périphérie (pTreg) à partir de lymphocytes T naïfs après rencontre avec un antigène, généralement issu du microbiote ou de l'alimentation (Luu et al., 2017). La tolérance intestinale envers ces antigènes exogènes requière leur migration et leur présentation dans les MLNs via des cDC1 et cDC2 CD103⁺, capables de produire de grande quantité d'acide rétinoïque et de vitamine D (Esterhazy et al., 2016; Luu et al., 2017; Pedros et al., 2016). Classiquement, on différenciait les tTreg des pTreg par leur expression de Helios et du récepteur de la neuropilin 1 (Nrp1). Cependant, il a été récemment montré qu'Helios pouvait être induit dans les pTreg et qu'il n'existait pas pour l'instant de marqueurs permettant de les distinguer formellement (Dominguez-Villar and Hafler, 2018). De plus, les Treg résidents des tissus périphériques, qu'ils soient d'origine thymique ou périphérique, acquièrent des caractéristiques spécifiques à leur localisation en fonction des facteurs environnementaux auxquels ils sont soumis (Dominguez-Villar and Hafler, 2018). Ceci est à l'origine d'une grande hétérogénéité tissulaire des Treg, notamment dans l'intestin, y compris à l'homéostasie, puisqu'il

s'agit d'un organe constamment soumis à une forte pression environnementale microbienne et alimentaire. Ainsi, les Treg tissulaires partagent généralement des caractéristiques phénotypiques spécifiques d'autres lignées Th, tel que décrit ci-dessous dans l'intestin (Honda and Littman, 2016).

Le colon et l'intestin grêle contiennent une large population de lymphocytes T Foxp3⁺ qui expriment le FT GATA3 (Honda and Littman, 2016). La plupart expriment Nrpl et Helios et ne sont pas affectés par l'absence du microbiote, suggérant qu'ils dérivent principalement de tTreg (Sefik et al., 2015). Ces tTreg Foxp3⁺GATA3⁺ coexpriment le récepteur de l'IL-33 (ST2). L'IL-33 produite par les cellules épithéliales, de concert avec l'IL-2, induit l'expression de GATA3 dans les tTreg, qui régule par un feed-back positif l'expression de Foxp3 et de ST2, promouvant la prolifération et le maintien des Treg et la prévention des réactions autoimmunes (Honda and Littman, 2016; Yu et al., 2015). En effet, le répertoire TCR de ces tTreg est enrichi en antigènes du soi, même si la spécificité antigénique des différentes populations de Treg reste débattue, certains auteurs ayant montré qu'ils ont une réactivité envers les antigènes microbiens (Cebula et al., 2013). De plus, l'IL-33 favorise la transcription d'AREG, connu pour son rôle dans les processus de réparation tissulaire (Panduro et al., 2016). A noter que l'IL-23 inhibe la réponse à l'IL-33 des Treg coliques (Panduro et al., 2016).

D'autre part, dans le colon, on retrouve une importante population de lymphocytes T Foxp3⁺, exprimant RORγt mais généralement pas Helios ou Nrpl, considérés comme des pTreg induits par le microbiote, puisqu'ils disparaissent chez les souris axéniques (Honda and Littman, 2016). De plus, les lymphocytes T Foxp3⁺RORγt⁺ ont un répertoire restreint de type oligoclonal, caractéristique de cellules ayant proliférées en réponse à un stimulus périphérique et reconnaissent les antigènes dérivés des microbes entériques (Yang et al., 2016). Notamment, il a

été montré que plusieurs souches de Clostridia avaient une forte capacité à induire l'accumulation préférentielle dans le colon de pTreg Foxp3⁺RORγt⁺ et à faciliter leur production d'IL-10 et de CTLA-4. L'administration orale de 17 souches bactériennes d'origine humaine est suffisante pour promouvoir l'accumulation de Treg dans des souris axéniques, et les protège du développement d'une colite par transfert de cellules T (Atarashi et al., 2013). Un des mécanismes d'action des *Clostridium* est la production d'acides gras à chaînes courtes par la fermentation des fibres alimentaires. Ceux-ci agissent en inhibant les histone-déacétylases, enzymes impliquées dans la régulation épigénétique de l'expression génique, en acétylant le promoteur du locus Foxp3 et en favorisant la stabilité de la protéine Foxp3 (Furusawa et al., 2013). Ils agissent également directement sur la prolifération des Treg en activant GPR43, facteur mitogène présent à la surface des Treg coliques (Honda and Littman, 2016). Ils induisent aussi la sécrétion d'IL-10 et de Aldh1a1 par les cellules dendritiques, qui induisent alors préférentiellement la différenciation de lymphocytes T naïfs en Treg (Luu et al., 2017). D'autres bactéries commensales (*Lactobacillus*, *Bacteroides*) ont un rôle dans l'induction des Treg, et dans leur production d'IL-10. Notamment, *Bacteroides fragilis* stimule la production d'IL-10 à travers le PSA contenu dans sa capsule. La capture du PSA par les DCs induit leur production d'IL-10 qui agit sur les Treg pour favoriser leur propre production d'IL-10 (Luu et al., 2017). L'action suppressive des Treg est en effet liée à des mécanismes contact dépendant et indépendant et une importante fraction de ces pTreg Foxp3⁺RORγt⁺ expriment CTLA-4 et produisent de l'IL-10, qui sont indispensables à la suppression de l'activité des cellules myéloïdes et des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ effectrices (Rubtsov et al., 2008).

Dans l'intestin grêle, on retrouve une troisième population de Treg exprimant Foxp3, mais pas RORγt, Helios ni Nr1p1, qui n'est pas affectée par l'absence du microbiote, mais disparaît chez

des souris axéniques nourries avec une diète sans antigène. Elle semble donc être induite par les antigènes alimentaires, d'autant plus que les souris n'ayant pas cette population ont une susceptibilité augmentée aux allergies alimentaires (Kim et al., 2016). La génération de ces Treg requière la présence de cDC1 CD103⁺CD11b⁻ et de cDC2 CD103⁺CD11b⁺ dans les MLNs où sont présentés les antigènes alimentaires.

Une population de lymphocytes T régulateurs Foxp3⁻, appelé Tr1, a été décrite dans l'intestin. Ils sécrètent de grande quantité d'IL-10 et de l'IL-21, expriment CTLA-4 et PD-1. Leur transfert adoptif peut prévenir la colite dans un modèle murin par transfert de cellules T (Roncarolo et al., 2014).

Enfin, dans les tissus lymphoïdes du GALT, des tTreg folliculaires ont aussi été décrits dans les centres germinatifs. Ils partagent des marqueurs phénotypiques de T folliculaires (Bcl6, CXCR5, PD-1) mais agissent comme des Treg. Ils sont particulièrement impliqués dans la sélection des IgA dans les centres germinatifs et contribuent ainsi à maintenir la diversité du microbiote intestinale qui, en retour, favorise l'expansion des Treg (Stadhouders et al., 2018).

Les Treg présentent donc une considérable hétérogénéité fonctionnelle dans l'intestin, correspondant probablement à une certaine division du travail entre les différentes sous-populations.

En contexte inflammatoire, il a été montré que les Treg pouvaient prévenir l'apparition mais également soigner une colite active dans un modèle de colite par transfert de cellules T (Maloy and Powrie, 2011). Ce modèle a permis de montrer le rôle crucial de l'IL-10 provenant des Treg dans l'homéostasie intestinale puisque que le transfert de Treg Foxp3⁺ ayant une

délétion du gène de l'IL-10 induit une colite spontanée, notamment par l'activation aberrante des MNPs. De plus, le rôle indispensable de CTLA-4 est mis en évidence par le fait que l'administration d'anticorps anti-CTLA-4 empêche le rôle protecteur des Treg, devenus incapables d'inhiber les T effecteurs colitogéniques. Les Treg induisent également l'apoptose des lymphocytes T et les tuent via leur machinerie cytotoxique. Enfin, en cas de transfert de Treg déficients en CCR7, alors incapables de rejoindre les MLNs, les souris ne sont pas protégées de la colite. Ceci souligne le fait que les Treg doivent entrer dans les MLNs pour exercer leur fonction suppressive, sans exclure un rôle local dans la muqueuse intestinale (Pedros et al., 2016).

Chez l'humain, l'étude des Treg est rendue difficile par l'absence de marqueurs strictement spécifiques des Treg, et les études antérieures doivent donc être considérées avec prudence. CD25 est exprimé sur les T effecteurs activés et Foxp3 peut être transitoirement exprimé sur les cellules T activées. CD127 et CD27, qui sont exprimés à un niveau plus haut sur les Treg que sur les lymphocytes T activés ont également été utilisés pour leur identification. L'importance du FT Foxp3 chez l'humain dans le contrôle de la réponse immunitaire est démontrée par le syndrome IPEX dans lequel des mutations du gène Foxp3 sont responsables d'une auto-immunité systémique, ciblant notamment l'intestin. Dans les MII, le rôle d'un défaut de Treg contribuant à un déséquilibre de la balance immunitaire a été évoqué. Plusieurs études ont montré que les patients avaient une quantité diminuée de Treg CD4⁺CD25⁺ circulants mais qu'ils étaient augmentés dans la muqueuse intestinale inflammatoire comparé à la muqueuse non-inflammatoire (Globig et al., 2014; Li and Ueno, 2017; Li et al., 2016; Pedros et al., 2016). Ils sont cependant moins augmentés que dans des colites infectieuses, suggérant que leur recrutement dans la muqueuse est insuffisant pour contrôler l'inflammation ou qu'ils exercent

leur fonction régulatrice dans d'autres endroits comme les MLNs (Pedros et al., 2016). Les études sur la fonctionnalité des Treg isolés de muqueuse intestinale des patients avec MII sont par contre discordantes mais leur apoptose semble augmentée dans la muqueuse (Pedros et al., 2016). Même si leur fonction suppressive in vitro est conservée dans la plupart des études, il a été suggéré que les cellules T effectrices des patients pourraient être résistantes à l'effet immunosuppresseur du TGF- β produit par les Treg. D'autre part, une augmentation de Treg co-exprimant Foxp3 avec ROR γ t et IL-17 a été rapportée dans le sang et la muqueuse des patients atteints de MC et de CU, mais les deux études les ayant décrits sont contradictoires quant à leur capacité suppressive (Hovhannisyanyan et al., 2011; Kryczek et al., 2011a). La question de la nature fonctionnelle de ces Treg ROR γ t⁺ chez les patients avec MII reste entière. Chez la souris, dans un modèle de colite par transfert de cellules T, la présence de ROR γ t dans les Treg favorise leur capacité suppressive puisqu'elle est supérieure à celle des Treg Foxp3⁺ROR γ t⁻ (Yang et al., 2016). Cependant, en contexte d'inflammation intestinale, le signal de CCR6 dans les pTreg diminue leur fonction suppressive, en augmentant l'expression de ROR γ t et en les dirigeant vers la lignée Th17. La conversion des Treg en Th17 exFoxp3 pathogéniques a d'ailleurs été montrée dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde. Il n'y a cependant pas de preuve que les Treg Foxp3⁺ROR γ t⁺ soient pathogéniques dans l'intestin où les Th17 ont un rôle protecteur. Récemment, il a aussi été décrits dans la muqueuse inflammatoire des patients, des Treg Foxp3⁺Gata3⁺ et Foxp3⁺T-bet⁺ mais leur rôle exact dans les MII n'est pas connu (Li and Ueno, 2017).

- **Rôles des lymphocytes Th17 à l'homéostasie**

Les lymphocytes Th17 résident essentiellement dans la peau et dans les muqueuses, notamment du tube digestif et des voies respiratoires. Ils sécrètent plusieurs cytokines dont l'IL-17A, IL-17-F, IL-21 et l'IL-22. A l'état basal, les lymphocytes Th17 sont la principale source d'IL-17 dans l'intestin, mais pas d'IL-22, majoritairement sécrétée par les ILC3 (Hirota et al., 2011). Ils jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie des muqueuses en prévenant l'invasion par les bactéries extracellulaires (*Pseudomonas aeruginosa*) et les champignons (*Candida albicans*) et en promouvant l'intégrité de la barrière épithéliale.

L'IL-17 agit par l'intermédiaire de son récepteur IL-17R, hétérodimère composé des chaînes IL-17RA et IL-17RC. La liaison de l'IL-17A/F entraîne l'activation de la protéine adaptatrice ACT1, de NF- κ B et de TNFRA6 qui induisent la sécrétion par les cellules épithéliales et stromales de cytokines et de chimiokines (IL-6, IL-8, G-CSF, CXCL1), impliquées dans le recrutement des neutrophiles (Cosmi et al., 2014). De plus, l'IL-17 et l'IL-22 activent la sécrétion de peptides antimicrobiens (β -defensines, lipocalins et S100A8/9 (calprotectine)) par les cellules épithéliales. L'IL-26 est également sécrétée par les lymphocytes Th17 et agit comme un peptide antimicrobien capable de tuer directement des bactéries pathogènes (Lee and Cua, 2015).

Dans l'intestin, les lymphocytes Th17, de concert avec les autres cellules sécrétant de l'IL-17 (lymphocytes T $\gamma\delta$, iNKT cells, ILC3), jouent un rôle majeur dans la protection de la barrière intestinale. Dans le modèle de colite au DSS, l'absence d'IL-17 entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale liée à une localisation anormale des protéines responsables des jonctions

serrées épithéliales (Lee et al., 2015). De plus, l'IL-17A, en coopérant avec le FGF (fibroblast growth factor), stimule la prolifération des cellules épithéliales intestinales et leur cicatrisation. Les Th17 coopèrent également avec les lymphocytes T régulateurs pour promouvoir la réparation des dommages épithéliaux dans l'intestin durant la colite (Song et al., 2015). Enfin, dans un autre modèle de colite (souris *Abcb1^{-/-}* infectées par *Helicobacter bilis*), le blocage de l'IL-17A ou de IL-17RA est aussi associé à des anomalies de l'intégrité épithéliale et aggrave les symptômes. Ces observations, qui plaident pour un rôle protecteur des Th17 dans l'intestin murin, sont corroborées chez l'humain par l'échec des anticorps monoclonaux anti-IL-17 dans la MC qui ont même contribué à aggraver les symptômes (Hueber et al., 2012).

- **Facteurs impliqués dans la différenciation Th17**

ROR γ (retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma) est le régulateur principal de la lignée Th17 qui orchestre sa différenciation et induit directement la transcription de l'IL-17A/F. Chez la souris, l'expression de ROR γ est induite par le TGF- β 1, l'IL-6 et l'IL-1. L'IL-21 amplifie la réponse Th17 par une boucle autocrine (Stadhouders et al., 2018). L'IL-23 n'est pas un inducteur de Th17 puisque l'IL-23R n'est pas exprimé par les lymphocytes T naïfs; elle est cependant requise pour leur expansion et leur maintien. Chez l'homme, les Th17 se développent en présence d'IL-6 et d'IL-1 β . L'IL-1R et l'IL-23R ne sont pas exprimés sur les lymphocytes T naïfs humains mais induits par IL-6/IL-21 et TGF- β (Stadhouders et al., 2018). L'IL-21 participe donc à la polarisation des lymphocytes Th17 de concert avec le TGF- β (Yang et al., 2008). Cependant, les patients ayant des mutations de *TGFB1*, *TGFBRI*, *TGFBR2* (maladies d'Engelmann et de Marfan) n'ont pas de déficit en lymphocytes Th17, démontrant que

TGF- β n'est pas indispensable à leur développement. Il a toutefois un rôle permissif en supprimant la différenciation vers Th1 (Cosmi et al., 2014).

STAT3 est un autre FT indispensable au développement des Th17 tel que démontré par l'altération de la différenciation des Th17 chez les patients porteurs d'une mutation du gène (Cosmi et al., 2014).

En plus de STAT3 et ROR γ , d'autres FT jouent un rôle important dans la différenciation Th17. BATF et IRF4 sont indispensables au remodelage de la chromatine permettant l'accès aux autres FT induisant Th17 (Ciofani et al., 2012) et FOSL2 (Fos-related antigen 2), ROR α et AHR sont également impliqués dans la différenciation (Stadhouders et al., 2018). Fas, par une inhibition directe de STAT1, promeut également la différenciation et la stabilité des Th17, en prévenant la polarisation vers Th1 (Meyer Zu Horste et al., 2018). Enfin, PLZF (ZBTB16) joue un rôle dans l'acquisition et le maintien du phénotype Th17 et régule à leur surface, l'expression de CCR6, qui est responsable, via son ligand CCL20, de l'attraction des Th17 vers les muqueuses, à l'homéostasie et en conditions inflammatoires (Singh et al., 2015).

Ainsi, STAT3, ROR γ et ROR α induisent l'expression de l'IL-17A, IL-17-F, IL-21, IL-22 et de l'IL-23R. A contrario, RAR α , RAR γ et l'IL-2 (via STAT5) limitent la polarisation en Th17. Aussi, L'IFN- γ et l'IL-27 (via STAT1), l'IL-12 (via STAT4) et l'IL-4 bloquent la différenciation en Th17 en empêchant l'activation de ROR γ (Stadhouders et al., 2018).

- **Influence du microenvironnement sur la différenciation et la fonction des lymphocytes Th17**

Chez la souris, l'induction des lymphocytes Th17 intestinaux est sous l'influence des bactéries commensales, le rôle du SFB ayant été particulièrement étudié dans l'iléon. Pour

induire des Th17, l'adhésion bactérienne à l'épithélium est indispensable (Atarashi et al., 2015). Cependant contrairement à des bactéries pathogènes comme *Citrobacter rodentium* ou *E. coli* O157, l'adhérence du SFB n'induit pas de dommages ni d'apoptose des cellules épithéliales, permettant une relation mutualiste avec l'hôte (Atarashi et al., 2015). Les antigènes du SFB sont alors présentés par des APCs dans le ganglion mésentérique et des lymphocytes Th17 ROR γ ⁺ spécifiques apparaissent dans le ganglion puis dans la lamina propria, y compris en présence de bactéries comme *Listeria monocytogenes* connue pour induire une polarisation de type Th1 (Yang et al., 2014). Ainsi, les lymphocytes Th17 ont une forte spécificité pour les bactéries commensales (Yang et al., 2014). Cependant, la présence de lymphocytes Th17 dans la lamina propria n'est pas synonyme d'une forte production d'IL-17 car leur activation in situ est requise pour leur pleine fonction. En effet, l'IL-22 sécrétée par les ILC3 sous l'influence de l'IL-23 en présence de SFB, induit une augmentation de la sécrétion épithéliale de SAA1/2 (serum amyloid A protein) nécessaire à la production locale d'IL-17 par les Th17 (Sano et al., 2015). Ainsi, le microenvironnement tissulaire a un rôle majeur dans l'activation des fonctions effectrices des cellules Th17. Toutefois, chez l'humain, le rôle du SFB est discutable puisque cette bactérie n'a été détectée que durant les 36 premiers mois de vie et semble absente du microbiote de l'adulte, suggérant que d'autres bactéries sont impliquées dans ces processus (Stockinger and Omenetti, 2017). En accord avec cette hypothèse, la colonisation de souris axéniques avec une vingtaine de souches bactériennes (incluant des *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* et *Bacteroides*) isolées de patients atteints de CU montre que les souches induisant des lymphocytes Th17 sont adhérentes comme l'est le SFB chez la souris (Atarashi et al., 2015).

- **Spécificité antigénique des lymphocytes Th17**

La présence de cellules T CD4⁺ spécifiques des bactéries commensales a été démontrée chez des individus sains et des patients atteints de MC, les T CD4⁺ de ces derniers ayant une réponse proliférative accrue aux antigènes commensaux (ASCA-Ag, CBir1, FlaX, A4-fla2 et YidX). Alors que chez les patients contrôles, après rappel anti-tétanique, ces lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des bactéries commensales ont uniquement un phénotype Th1 (IFN- γ ⁺IL-17⁻), ils présentent un profil transcriptionnel (augmentation de *CCR6*, *IL-17F*, *RORC*, *CCL20*, diminution de *PTGER2*) et fonctionnel, de type Th17 (IFN- γ ⁻IL-17⁺) et Th17/Th1 (IFN- γ ⁺IL-17⁺) en MC. De plus, ces lymphocytes T CD4⁺ spécifiques sont capables d'amplifier la réponse inflammatoire, en favorisant la sécrétion épithéliale de CXCL1, CXCL8 et CCL20, capables d'attirer respectivement les neutrophiles et les Th17 (Calderon-Gomez et al., 2016). Cette étude démontre que la réponse T CD4⁺ n'est pas globalement biaisée vers une réponse de type Th17 ou Th17/Th1 dans la MC puisque l'exposition des T CD4⁺ à la toxine tétanique engendre une réponse similaire chez les contrôles et les malades. Les différences entre les individus contrôles et ceux atteints de MC se voient donc uniquement au sein des Th spécifiques des bactéries commensales, ce qui suggère que l'environnement dans lequel s'est fait la polarisation de ces T CD4⁺ est crucial pour leur différenciation. De même, dans un modèle murin utilisant des cellules T transgénique CBir1, les lymphocytes T spécifiques d'antigène se différencient en Th1 en cas d'infection par *Toxoplasma gondii* et en Th17 dans une colite induite par le DSS (Hand et al., 2012). Ceci indique que les cellules T spécifiques du microbiote sont modulées par des signaux fournis par le milieu inflammatoire plutôt que par la spécificité antigénique.

C.4.2.2.b.VI.iii. PLASTICITÉ DES LYMPHOCYTES TH17

Contrairement à T-bet dans les Th1 et GATA-3 dans les Th2, ROR γ régule la transcription d'un petit nombre de locus dans les Th17 et son expression n'est pas stabilisée par une boucle de rétroaction positive (Ciofani et al., 2012). ROR γ peut donc être influencé par des facteurs environnementaux, rendant les Th17 instables et aptes à une certaine plasticité fonctionnelle. Les Th17 peuvent donc être ségrégués en Th17 non pathogéniques et pathogéniques qui se distinguent par les molécules effectrices qu'ils produisent, une signature moléculaire spécifique et par leur aptitude à transférer la maladie.

C.4.2.2.b.VI.iii.1. TH17 PATHOGÉNIQUES

- **Plasticité des Th17 vers un profil pro-inflammatoire/pathogénique**

La plasticité des lymphocytes effecteurs Th17 a été montrée dans des conditions physiologiques in vivo ainsi qu'en situation pathologique. En effet, les Th17 peuvent acquérir la capacité de produire, en plus de l'IL-17, des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le GM-CSF (Duhon and Campbell, 2014). La pathogénicité de ces cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ a d'abord été étudiée et définie par leur capacité à induire une encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012). L'utilisation de 'reporter mice' dans ce même modèle a permis de démontrer que ces cellules n'étaient pas des lymphocytes Th1 mais bien originellement des Th17 ayant modifié leur phénotype (Hirota et al., 2011). Ces cellules IFN- γ ⁺IL-17⁺ (Th17/Th1) ont également été décrites dans des infections à *Helicobacter hepaticus* (Harbour et al., 2015) ou *H. bilis* (Maxwell et al., 2015), *Citrobacter rodentium* et dans les modèles de colite par transfert de cellules T (Ahern et al., 2010).

Chez l'humain, ces lymphocytes $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-17}^+$ ont également été retrouvés dans plusieurs pathologies dont la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et les MII (Maggi et al., 2014). La muqueuse des patients avec MC (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014; Rovedatti et al., 2009) et CU (Globig et al., 2014; Rovedatti et al., 2009), comparée à la muqueuse de patients sains, est riche en cellules coproduisant $\text{IFN-}\gamma$ et IL-17 . La fraction de cellules produisant de l' $\text{IFN-}\gamma$ (jusqu'à 80%) parmi les Th17 augmentent dans les tissus inflammatoires dans les deux maladies intestinales, suggérant un shift de Th17 vers Th17/Th1 (Globig et al., 2014).

- **Phénotype et signature moléculaire des lymphocytes Th17 et Th17/Th1**

Sur le plan phénotypique, chez l'humain, les Th17 expriment CD161 et CCR6 (Maggi et al., 2012), La sous-population de Th17 qui sécrète de l' $\text{IFN-}\gamma$ exprime aussi de haut niveau de CD26 , T-bet , IL-23R et $\text{IL12}\beta\text{R}$ (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014) ainsi que CXCR3 . Ainsi, les Th17 ($\text{IFN-}\gamma^-\text{IL-17}^+$) sont $\text{CCR6}^+\text{CXCR3}^-$ et les Th17/Th1 ($\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-17}^+$) sont $\text{CCR6}^+\text{CXCR3}^+$. De plus, la plasticité des Th17 est telle qu'ils peuvent perdre la capacité de sécréter de l' IL-17 au profit de l' $\text{IFN-}\gamma$, les rendant alors difficile à distinguer des Th1 classiques. Cependant, ces Th1 non classiques, ex-Th17 ou encore appelés Th1* ($\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-17}^-$) expriment CD161 et CCR6 , qui sont absents des Th1 classiques (Maggi et al., 2012). Les Th1* sont donc majoritairement $\text{CCR6}^+\text{CXCR3}^+$ alors que les Th1 classiques sont $\text{CCR6}^-\text{CXCR3}^+$ (Maggi et al., 2012). L'utilisation de clones isolés du sang d'individus sains, a permis de confirmer, au niveau épigénétique, l'existence de ces lymphocytes Th1*, ces cellules ayant une déméthylation des promoteurs des gènes de l' IL-17A , RORC2 , $\text{IFN-}\gamma$ et T-bet , alors que les Th1 classiques ont une méthylation des promoteurs des gènes de l' IL-17 et RORC (Mazzoni et al., 2015).

D'autre part, le séquençage de l'ARN des lymphocytes Th17 pathogéniques et non-pathogéniques dans le modèle murin d'EAE a permis de définir une signature moléculaire associée à leur profil pro-inflammatoire (*CCL5*, *CCL4*, *CXCL3*, *IL-22*, *IL-3*, *IL-7R*, *IL-23R*, *STAT4*, *TBX21*, *CSF2*, *CASP1*, *ICOS*, *GZMB*, *LRMP*, *LAG3*, *LGALS3*) ou protecteur (*IL-9*, *IL-10*, *IL1RN*, *IKZL3*, *AHR*, *MAF*, *IL6ST*) (Lee et al., 2012). Chez l'humain, dans le sang de donneurs sains, l'expression de ces mêmes gènes a été comparée à ceux de la souris dans des lymphocytes Th17 (CCR6⁺CXCR3⁻CCR4⁺) et Th17/Th1 (CCR6⁺CXCR3⁺CCR4⁻) purifiés en fonction de marqueurs de surface (Ramesh et al., 2014) ; puis dans des populations plus pures purifiées en fonction de leur expression cytokinique (CD4⁺ IL-17⁺IFN- γ ⁺ et IL-17⁺IFN- γ ⁻) (Hu and Notarbartolo, 2017). Ces études démontrent que les sous-populations Th17 et Th17/Th1 sont enrichies respectivement en une signature non-pathogénique ou pathogénique comparable à celle de la souris. La signature pathogénique la plus robuste chez l'humain inclut des chimiokines et des cytokines (*CCL3*, *CCL4*, *CCL5*, *CSF2*, *IFNG*, *IL-3*), des récepteurs de chémokine et cytokines (*CXCR3* et *IL-23R*), *EPSTI1*, *GZMB* et *RGS2*, alors que *CCR6* et *STAT1* sont régulés négativement (Hu and Notarbartolo, 2017). Finalement, le caractère plastique des Th17 a été démontré par une étude en scRNAseq qui montre dans le modèle d'EAE, que les Th17 isolés de ganglions évoluent graduellement d'un phénotype non pathogénique vers un phénotype pathogénique, d'abord de type Th17/préTh1 puis, de manière concomitante à leur présence dans le tissu, de type Th17/Th1 effecteur puis mémoire (Gaublomme et al., 2015). Cette étude a également permis d'identifier les facteurs impliqués dans la transition vers un phénotype pathogénique.

- **Facteurs impliqués dans la pathogénicité des Th17**

L'acquisition d'un profil pathogénique des Th17 peut se faire au moment de la polarisation des lymphocytes T naïfs dans le ganglion mésentérique (Becattini et al., 2015) ou plus tard au niveau des Th17 effecteurs et mémoires, en fonction du contexte et des facteurs présents dans l'environnement tissulaire.

- **ROR γ t** est requis pour la différenciation des Th17 en cellules produisant de l'IFN- γ , et pour l'induction de la colite dans le modèle de colite par transfert de cellules T. En effet, le transfert dans des souris *Rag1*^{-/-}, de lymphocytes T déficients en *RORc*, induit seulement une colite légère, avec des niveaux réduits d'IL-17A et d'IFN- γ dans les cultures d'explants coliques (Krausgruber et al., 2016). Chez l'humain, des polymorphismes de RORC sont associés à la susceptibilité aux MII et les données chez les patients porteurs d'une mutation homozygote de RORC sont en cohérence avec les observations faites chez la souris. En effet, ces patients sont susceptibles non seulement à des candidoses mais aussi à des infections par les mycobactéries malgré une réponse Th1 qui semble normale. Par contre, leurs lymphocytes T $\alpha\beta$ CD4⁺CCR6⁺ ont une capacité réduite à produire de l'IFN- γ alors que les cellules Th17/Th1 sont fortement augmentées en réponse aux mycobactéries chez les sujets sains (Okada et al., 2015). Ceci expliquerait la susceptibilité de ces patients aux infections mycobactériennes et corrobore les observations murines sur le rôle indispensable de ROR γ t dans la genèse de lymphocytes Th17 pro-inflammatoires coproduisant IL-17 et IFN- γ .

- Les données de la littérature sur le rôle de **T-bet** dans l'induction de la colite sont par contre contradictoires. Certains auteurs ont montré le caractère indispensable de T-bet pour induire la maladie (Harbour et al., 2015; Neurath et al., 2002b), alors que d'autres montrent que T-bet n'est pas indispensable à l'apparition des cellules IL-17⁺IFN- γ ⁺ et à l'induction de la colite

(Krausgruber et al., 2016; Zimmermann et al., 2016). Cependant, dans ce dernier cas, la neutralisation de l'IFN- γ , dont la production pourrait alors être soutenue grâce à d'autres FT comme Runx 1 et Runx 3 (Wang et al., 2014), abolit la colite (Zimmermann et al., 2016). Ces apparentes contradictions sur le rôle de T-bet seraient en lien avec des différences de microbiote, certains microbiotes étant permissifs ou non à la colite indépendante de T-bet (Zimmermann et al., 2018). Chez l'humain, le gène de l'IFN- γ , de même que ceux de *STAT4* et *STAT1* mais de pas *T-bet*, font partie des locus ayant des polymorphismes de susceptibilité aux MII.

- L'**IL-23** est une cytokine clé dans l'induction de la pathogénicité des Th17. En effet, l'absence d'IL-23 prévient l'acquisition d'IFN- γ et de GM-CSF par les Th17 dans l'EAE (Hirota et al., 2011). D'autre part, alors que TGF- β 1 et IL-6 induisent la polarisation de lymphocytes T naïfs en Th17 non pathogéniques, l'addition d'IL-23 est requise pour maintenir la sécrétion de TGF- β 3 par les Th17, ce qui les rend fortement pathogéniques dans ce même modèle (Lee et al., 2012). La combinaison d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23 est également à l'origine de la polarisation en lymphocytes Th17 pathogéniques dans ce modèle (Ghoreschi et al., 2010). Dans l'intestin, la neutralisation de l'IL-23 ou de l'IL-23R diminue la proportion de cellules IFN- γ ⁺IL-17⁺ et améliore la maladie dans les modèles de colite par infection à *H. hepaticus* chez des souris *Abcb1*^{-/-} (Maxwell et al., 2015) et de colite par transfert de cellules T (Ahern et al., 2010). Dans ce dernier modèle expérimental, l'IL-23 restreint aussi la différenciation des lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ et leur production d'IL-10. De plus, les voies qui affectent l'expression de l'IL-23R influencent également la pathogénicité des Th17. Ainsi, RBPJ (recombination signal binding protein for Ig κ J), un médiateur canonique du signal Notch, se lie au promoteur de l'IL-23R, le transactive et induit son expression, ce qui conduit à la répression de la production d'IL-10 par les Th17 (Meyer Zu Horste et al., 2016). Dans le sang humain, l'IL-23R a été identifié

parmi les gènes associés à la signature pathogénique des Th17/Th1 circulants (Hu and Notarbartolo, 2017). Le rôle de l'IL-23 dans les MII sera abordé en détail dans la discussion de ce travail.

- De même, l'**IL-1 β** , l'**IL-12** et le **TNF- α** sont impliqués dans la plasticité des Th17 vers la production d'IFN- γ et leur rôle sera détaillé à la lumière de nos résultats dans la partie discussion de ce travail.

- D'**autres facteurs** ont été impliqués dans la pathogénicité des Th17: Gpr65, un récepteur des glycosphingolipides dont les polymorphismes sont associés au risque de MII, est impliqué dans la pathogénicité des Th17 puisque son absence protège de l'EAE (Gaublomme et al., 2015). L'hélicase d'ARN, DDX5 (DEAD-box protein 5) agit comme partenaire de ROR γ t pour coordonner la transactivation de ses gènes cibles. Dans le modèle de colite transférée par les cellules T, son absence confère une protection et s'associe notamment avec une diminution de la fréquence des cellules co-exprimant IL-17 et IFN- γ (Huang et al., 2015a). Le rôle de plusieurs microRNA a également été démontré par plusieurs auteurs. Notamment, Mirc35hg, qui contient un cluster de 3 microRNA (miR-183, miR-96 et miR-182) est impliqué dans la pathogénicité des Th17. Ces microRNA inhibent l'expression de FOXO1 (Forkhead box O1) qui bloque la pathogénicité des Th17 en bloquant la transactivation de l'enhancer de l'IL-1R et l'IL-23R dans ces cellules (Ichiyama et al., 2016). Ceci est en cohérence avec une étude réalisée chez les patients atteints de MII qui montre que miR-425, dont la cible est aussi FOXO1, est augmenté dans les lymphocytes Th17 circulants et muqueux de patients avec MII dans lesquels il promeut l'expression de CXCL3, CSF2 et IL-23R, molécules associées à un phénotype pathogénique (Yang et al., 2018). Aussi, le microRNA miR-10a, qui inhibe in vitro la production d'IL-12p40 par les DCs dérivées des monocytes, est diminué dans la muqueuse inflammatoire des patients

avec MII; de plus, sa surexpression dans des lymphocytes T CD4⁺ provenant de patients avec MII inhibe directement la sécrétion d'IL-17 et d'IFN- γ (Wu et al., 2015). Enfin, La liaison de PTGER2 (qui code le récepteur de prostaglandine EP2) avec ROR γ t est réduite dans les Th17 de patients avec sclérose en plaques, conduisant à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par les Th17.

- Des **facteurs extrinsèques** peuvent également influencer la différenciation en Th17 pathogéniques. Un régime riche en gras favorise la différenciation en Th17 et un régime riche en sel aggrave l'EAE en favorisant la signature pathogénique des Th17, par l'activation de SGK1 (serum/glucocorticoid-regulated kinase 1), un inhibiteur de FOXO1 (Kleinewietfeld et al., 2013). Enfin chez l'humain, le rôle du microbiote dans la plasticité des Th17 a été démontré in vitro. La production de cytokines par les Th17 est influencée par la nature des agents infectieux impliqués dans leur différenciation : *Candida albicans* induit la production d'IFN- γ alors que *Staphylococcus aureus* induit celle d'IL-10 par les Th17 (Zielinski et al., 2012).

C.4.2.2.b.VI.iii.2. TH17 PROTECTEURS

- **Phénotype des Th17 protecteurs**

Dans le modèle d'EAE, il a été montré que les Th17 non pathogéniques induits par la combinaison de TGF- β 1 et IL-6 produisaient, en plus de l'IL-17, de l'IL-10 (Lee et al., 2012). De plus, la signature moléculaire (dont *STAT1*, *CCR6*, *IFNGR2*, *PIK3IP1*, *AHR*) des Th17 non-pathogéniques murins est partagée avec celles de clones lymphocytaires CD4⁺ IL-17⁺IL-10⁺ isolés du sang humain de donneurs sains (Hu and Notarbartolo, 2017). L'expression d'IL-10 par

les Th17 et les Th17/Th1 est diminuée chez des patients avec sclérose en plaques comparée aux patients contrôles (Maggi et al., 2014).

- **Facteurs impliqués dans la non pathogénicité des Th17**

Certains facteurs ont été associés à la non-pathogénicité des Th17 dans le modèle d'EAE. Ainsi, **CD5L** (CD5 antigen-like), un membre de la superfamille des récepteurs scavenger riches en cystéine, est spécifiquement surexprimé dans les Th17 non pathogéniques (Wang et al., 2015). Sans affecter la différenciation en Th17, il réprime l'activité transcriptionnelle de ROR γ t en limitant l'accès à ses ligands lipidiques et sa liaison à ses gènes cibles. D'autre part, le récepteur à la protéine C activée (**PROCR**) est surexprimé à la surface des Th17 et régule négativement leur pathogénicité en réprimant notamment l'expression de l'IL-23R et de l'IL-1R (Kishi et al., 2016). De plus, la différenciation en Th17 pathogéniques est également affectée par les perturbations du rythme circadien puisque **NFIL3** inhibe les Th17 en inhibant directement ROR γ , rendant les souris NFIL3^{-/-} plus sensibles aux colites au DSS (Yu et al., 2013). Enfin, tel que cité plus haut, la nature des agents bactériens influence la pathogénicité des Th17 puisque les Th17 spécifiques de Staphylocoque aureus produisent de l'IL-10 en plus de l'IL-17 (Zielinski et al., 2012).

- **Plasticité des Th17 vers un profil anti-inflammatoire**

La plasticité des Th17 peut également se faire vers un phénotype régulateur. Les lymphocytes Th17 peuvent acquérir un profil et une fonction de lymphocytes T_{FH} dans les plaques de Peyer où ils induisent la production d'IgA dépendante des lymphocytes T, par les lymphocytes B des centres germinatifs (Hirota et al., 2013). L'IL-23 n'est pas nécessaire à la

survie et à la plasticité des Th17 vers un profil T_{FH} puisque le nombre de Th17 est normal chez les souris n'exprimant pas l'IL-23 (Hirota et al., 2013).

D'autre part, les Th17 peuvent se différencier en lymphocytes T_{R1}-like (T regulatory type 1 like cells) produisant de l'IL-10 dans des conditions inflammatoires dans l'intestin (Gagliani et al., 2015). La plasticité des Th17 vers un phénotype T régulateur est sous la dépendance du TGF- β 1 et d'AHR. Dans ce cas, les auteurs ont démontré qu'ils ne s'agissaient pas d'une simple plasticité mais d'une véritable trans-différentiation avec reprogrammation complète de la cellule qui modifie son programme transcriptionnel. Aussi, les anti-TNF- α , via cMaf et Aiolos, induisent l'expression d'IL-10 dans les Th17 (Ueno et al., 2018).

C.4.2.2.b.VI.iv. CONCLUSION

En conclusion, le programme de différenciation en Th17 semble favoriser un phénotype non pathogénique à l'homéostasie, comme le suggère l'induction de PROCR à la surface des Th17 par les FT qui induisent la différenciation en Th17 (i.e. STAT3, ROR γ t, IRF4) (Kishi et al., 2016). Dans des conditions inflammatoires, des facteurs extrinsèques, comme l'IL-23 et l'IL-1 β , peuvent moduler ce phénotype vers un phénotype pathogénique, lors de la polarisation des lymphocytes T naïfs mais également par la plasticité des lymphocytes Th17 déjà différenciés. Des facteurs intra-cellulaires régulent alors les modules pro et anti-inflammatoires au sein des Th17 en agissant comme des interrupteurs qui permettent une réponse rapide à des déclencheurs environnementaux, permettant ainsi au Th17 de changer rapidement de phénotype (Wang et al., 2015). La compréhension des mécanismes impliqués dans nature pathogénique ou non-pathogénique des Th17 est indispensable pour cibler thérapeutiquement les Th17 pathogéniques tout en épargnant les Th17 non-pathogéniques (Stockinger and Omenetti, 2017).

Les lymphocytes T helper CD4⁺ sont donc impliqués dans la physiopathologie des MII, en particulier les lymphocytes Th17. Dans notre travail, nous nous sommes particulièrement intéressés à la réponse des lymphocytes T mémoires CD4⁺ aux MNPs coliques autologues et aux cytokines qu'ils sécrètent ainsi qu'à la plasticité des lymphocytes Th17 mémoires, aussi bien dans la muqueuse intestinale (chapitre A et B de la section résultats) que dans le ganglion mésentérique (chapitre C de la section résultats, Annexe 2 et résultats non montrés).

D. OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Contexte

Lors de l'initiation du projet en 2013, les données de la littérature sur les MNPs intestinaux, en particulier chez l'humain sain et malade, étaient rares et contradictoires. Nous avons montré qu'une population de MNPs HLADR⁺SIRPα⁺ s'accumulaient dans la muqueuse colique inflammatoire et les MLNs de patients atteints de MC (Baba et al., 2013). Ces cellules HLADR⁺SIRPα⁺ représentaient l'équivalent humain des MNPs ClassII⁺SIRPα⁺CD103⁻ identifiées chez la souris dans notre laboratoire, qui étaient capables d'induire une colite associée à un infiltrat de type Th17 (Fortin et al., 2009). Dans le même temps, certains auteurs suggéraient que les MNPs s'accumulant dans la muqueuse inflammatoire intestinale humaine étaient des DCs CD103⁻ (Watchmaker et al., 2014), alors que d'autres rapportaient l'accumulation d'une population unique de macrophages CD14⁺ en MC et en CU (Kamada et al., 2008). De plus, des DCs inflammatoires dérivant des monocytes, avaient été décrites chez l'homme dans d'autres contextes inflammatoires (Segura et al., 2013). D'autre part, il était établi que les lymphocytes CD4⁺ Th17 et Th17/Th1 étaient impliqués dans la pathogénèse des MII.

Malgré les nombreux traitements disponibles ciblant les cellules de l'immunité innée et les lymphocytes T, les MII restent un problème majeur de santé publique. La compréhension des mécanismes physiopathologiques qui les sous-tendent est donc indispensable dans le but d'améliorer la thérapie. De plus, une connaissance précise de ces mécanismes peut aussi permettre de mieux appréhender les différences entre la MC et la CU afin de développer une prise en charge plus personnalisée.

Hypothèse

Nous avons postulé que les MNPs et les basophiles avaient un rôle essentiel dans le maintien de l'inflammation et donc la chronicité des MII et qu'ils pourraient constituer une cible thérapeutique et/ou un outil de stratification des MII.

Objectifs du doctorat

- 1) Étudier la distribution sanguine et tissulaire des basophiles et leur rôle dans les ganglions mésentériques dans la MC et la CU.
- 2) Identifier et caractériser au niveau phénotypique, moléculaire et fonctionnel les MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ qui s'accumulent dans la muqueuse et les ganglions mésentériques de patients atteints de MC.
- 3) Analyser les différences en terme de MNPs entre la MC et la CU dans la muqueuse et dans les ganglions mésentériques, afin de déterminer des spécificités de chaque maladie dans la réponse immunitaire.

RESULTATS

A. TWO DISTINCT COLONIC CD14⁺ SUBSETS CHARACTERIZED BY SINGLE CELL RNA PROFILING IN CROHN'S DISEASE

Laurence Chapuy, MD¹, Marwa Bsati, MSc¹, Siranush Sarkizova, PhD^{2,3}, Manuel Rubio¹, Amélie Therrien, MD, MSc^{1,4}, Evelyne Wassef¹, Mickael Bouin, MD, PhD⁴, Katarzyna Orlicka, MD⁴, Audrey Weber, MD⁴, Nir Hacohen, PhD³, Alexandra-Chloé Villani, PhD^{3,5}, and Marika Sarfati, MD, PhD¹

¹Immunoregulation Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

²Department of Biomedical Informatics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

³Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA.

⁴Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

⁵Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

Published in Mucosal Immunology, 2019 Janv 22. doi: 10.1038/s41385-018-0126-0

A.1. ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases are associated with dysregulated immune responses in the intestinal tissue. Four molecularly identified macrophage subsets control immune homeostasis in healthy gut. However, the specific roles and transcriptomic profiles of the phenotypically heterogeneous CD14⁺ macrophage-like population in inflamed gut remain to be investigated in Crohn's disease (CD). Here we identified two phenotypically, morphologically and functionally distinct colonic HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺ subpopulations that were further characterized using single cell RNA sequencing (scRNAseq) in CD. Frequencies of CD64^{hi}CD163^{-dim} cells selectively augmented in inflamed colon and correlated with endoscopic score of disease severity. IL-1 β and IL-23-producing CD64^{hi}CD163^{-dim} cells predominated over TNF- α -producing CD64^{hi}CD163^{hi} cells in lesions. Purified “inflammatory monocyte-like” CD163⁻, but

not “macrophage-like” CD163^{hi} cells, through IL-1 β , promoted Th17/Th1 but not Th1 responses in tissue memory CD4⁺T cells. Unsupervised scRNAseq analysis that captures the entire HLADR⁺SIRP α ⁺ population revealed six clusters, two of which were enriched in either CD163⁺ or CD163^{hi} cells, and best defined by *TREMI/FCAR/FCN1/IL1RN* or *CD209/MERTK/MRC1/CD163L1* genes, respectively. Selected newly identified discriminating markers were used beyond CD163 to isolate cells that shared pro-Th17/Th1 function with P3 cells. In conclusion, a molecularly distinct pro-inflammatory CD14⁺ subpopulation accumulates in inflamed colon, drives intestinal inflammatory T cell responses, and thus, might contribute to CD disease severity.

A.2. INTRODUCTION

The interplay between genetic, environmental and immunological factors contributes to the pathogenesis of Crohn’s disease (CD), a chronic inflammatory bowel disease (IBD) that results from an inappropriate immunologic response to the commensal microflora (de Souza and Fiocchi, 2016; Maloy and Powrie, 2011). Several experimental models of colitis were developed in syngeneic mice to unravel CD pathogenesis (Valatas et al., 2015). However, none of them entirely recapitulates the complex clinical and histopathological features that are observed in CD patients, emphasizing the need to examine the immune response in human gut disease tissues (Mowat and Agace, 2014). Intestinal immune infiltrate is composed of T helper (Th) cell subsets (Globig et al., 2014), granulocytes (Chapuy et al., 2014; Lampinen et al., 2008), mononuclear phagocyte (MNP) populations (Kuhl et al., 2015) as well as rare innate lymphoid cells (ILCs) (Bernink et al., 2013; Fuchs et al., 2013). Mucosal MNPs, which includes macrophages (M ϕ), monocyte-derived cells and dendritic cells (DCs), expressing or not CD14 and SIRP α (Baba et

al., 2013; Bujko et al., 2018; Watchmaker et al., 2014), contribute to gut homeostasis. Therefore, investigating the function and molecular profile of the MNP population, which is phenotypically heterogeneous in inflamed gut mucosa, has clear implication in better understanding IBD pathophysiology (Guilliams and van de Laar, 2015).

A large population of human intestinal resident M ϕ actively maintains healthy steady-state conditions. Previous studies reported that these M ϕ lack CD14 and CD64 expression, are anergic in response to Toll-like receptor (TLR) stimulation, and retain phagocytic functions (Smith et al., 2011). However, it was recently proposed that recruitment and maturation of human monocytes into four M ϕ subsets expressing various levels of CD14 and retaining endocytic function occurred in jejunum at homeostasis (Bujko et al., 2018). A similar maturation process was previously demonstrated in murine gut lamina propria where M ϕ arise from Ly6C^{hi} monocytes, which are continuously recruited to the mucosa. These cells differentiate towards TLR-hyporesponsive M ϕ that secrete IL-10 and express CD64 at steady state (Bain et al., 2013).

In addition to intestinal resident M ϕ , conventional DC (cDCs) subsets that drive the polarization of naïve CD4 T cells (Sakuraba et al., 2009; Watchmaker et al., 2014) are key players in the maintenance of regulatory T cell-mediated intestinal homeostatic conditions (Loschko et al., 2016). Briefly, two cDC subsets stratified by SIRP α and CD103 expression levels in humans and mice have been reported in gut homeostatic state (Bernardo et al., 2016; Fortin et al., 2009; Guilliams et al., 2016; Watchmaker et al., 2014). More specifically, human SIRP α ⁻ cDC1s that express CD103 represent a minor population in the gut (Bernardo et al., 2016; Mann et al., 2016), which is related to circulating CLEC9A⁺CD141⁺ cDC1 (Watchmaker et al., 2014). The CD103⁺SIRP α ⁺ cDC2 are the predominant cDC population in the ileum (Mann et al., 2016) and

are related to circulating CD1c⁺ cDC2 (Sichien et al., 2017). In contrast, CD103⁻SIRPα⁺ cDC2s predominate in the colon but are the less characterized cDC population (Cerovic et al., 2013; Diehl et al., 2013). In fact, these CD103⁻SIRPα⁺ cells, which reportedly clustered with blood monocytes, might include monocyte-derived cells (Watchmaker et al., 2014). Noteworthy, markers commonly associated with circulating monocytes and cDC2 appeared to be more broadly expressed than previously appreciated. For example, CD14⁺ monocytes were shown to co-express CD1c (Schroder et al., 2016), a cDC2 marker, while CD1c⁺ DC subsets were reported to express several monocyte markers, including CD14 (Villani and Satija, 2017).

The characterization of the MNP population is far more challenging in human inflamed gut tissue, owing to the heterogeneity of IBD patients with differences in genetic background, disease onset, duration, severity, treatment and geographic location (Ng et al., 2018). In mice, it was shown that the maturation process of Ly6C^{hi} monocytes is interrupted during intestinal inflammation favoring the accumulation of an intermediate Ly6C⁺CD64⁺CX₃CR1^{int} monocyte-like cell subset that shows a pro-inflammatory profile (Bain et al., 2013). Noteworthy, infusion of autologous circulating radiolabeled CD14⁺ monocytes into CD patients can be retraced as CD14⁺ Mφ-like cells in their inflamed gut mucosa (Grimm et al., 1995). However, analyses deciphering the composition of human CD14⁺ MNP subpopulations in inflamed intestine remain sparse. Kamada et al reported the presence of a unique CD14⁺ Mφ-like cell population, which produce large amounts of IL-23, IL-1β, IL-6, TNF-α and IL-10 in the inflamed ileal or colonic mucosa of IBD patients (Kamada et al., 2008). Our previous report showed that HLADR⁺SIRPα⁺ cells, which predominantly include CD14⁺ cells, but also comprise cDC2, selectively accumulate in inflamed colon of CD patients, and that IL-1β and TNF-α secretion was restricted to

HLADR⁺SIRP α ⁺ cells (Baba et al., 2013). Yet, the potential heterogeneity of mucosal CD14⁺ MNPs under chronic inflammatory conditions is highlighted by the dual function of these cells. The CX₃CR1⁺CD14⁺ MNPs favor IL-22 production by ILC3 in an IL-23-dependent manner in human mild-inflamed CD mucosa (Longman et al., 2014), suggesting their protective function. Furthermore, several groups of investigators have stratified CD14⁺ MNPs according to their phenotype. CD14⁺HLADR^{high}CD163^{low} M ϕ are detected in equal proportions in non-inflamed and inflamed CD or UC mucosa (Barman et al., 2016; Ogino et al., 2013) while CD14⁺HLADR^{dim} are increased in inflamed ileum and colon of CD or UC patients (Bain et al., 2013; Magnusson et al., 2016; Thiesen et al., 2014). Whether CD14⁺HLADR^{high/dim} MNPs represent molecularly distinct subpopulations endowed with functional diversity in inflamed CD tissues remain unanswered.

The efficacy of Vedolizumab, a monoclonal antibody (mAb) that targets the gut homing integrin α 4 β 7, argues for a T-cell-dependent mechanism in CD patients (Sandborn et al., 2013). Studies have provided evidence that HLADR⁺CD14⁺MNPs induce human allogeneic circulating naïve T cell polarization into Th17 or Th17/Th1 (Kamada et al., 2009; Ogino et al., 2013). Whether and how these cells drive intestinal inflammatory T cell responses and more particularly promote Th17/Th1 responses in mucosal effector memory CD4⁺T cells, has not been investigated in inflamed gut mucosa. Double IFN- γ /IL-17-secreting cells are considered pathogenic in mice with colitis (Ahern et al., 2010) and in patients with CD (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014). The IFN- γ ⁺IL-17⁺ cells might arise from Th17 cells, which display a high degree of plasticity (Cosmi et al., 2014). Indeed, Th17 cells, which exert a protective role in the intestine (Maxwell et al., 2015; Sano et al., 2015), can acquire a pathogenic signature and

function depending on the tissue cytokine environment (Sano et al., 2015). In humans, intestinal Th17 clones can be skewed to produce IFN- γ , shifting to IFN- γ^+ IL-17 $^+$ (Th17/Th1) and IFN- γ^+ IL-17 $^-$ (non-classic Th1 or Th1*) cells in the presence of IL-12 (Annunziato et al., 2007) or IL-23 (Kleinschek et al., 2009).

Here, we assessed the morphology, function and molecular diversity of HLADR $^+$ SIRP α^+ MNPs that were stratified by CD14, CD64 and CD163 protein expression, in colonic tissues from a large cohort of CD patients. The CD14 $^+$ CD64 hi CD163 $^{-dim}$ and more precisely the CD163 $^-$ cells selectively accumulated in inflamed CD colon, expressed low levels of TNF- α , and promoted colonic memory Th17 and Th17/Th1 but not Th1 responses in an IL-1 β -dependent manner. Frequency of CD163 $^-$ cell accumulation in inflamed mucosa was independent of age, gender, disease location, disease behavior, and remarkably, their frequency correlated with endoscopic disease severity. Isolation of CD14 $^+$ subpopulations from two extremes of CD163 expression spectrum, i.e. CD163 $^-$ (P3) and CD163 hi (P4), led to the identification of two morphologically and molecularly distinct CD14 $^+$ subsets, while further identifying new discriminating markers that allowed validation of the presence of two distinct functional CD14 $^+$ subsets.

A.3. RESULTS

A.3.1. HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs COMPRISE TWO CD14⁺CD64^{hi} SUBPOPULATIONS: ACCUMULATION OF CD64^{hi}CD163^{-dim}, BUT NOT CD64^{hi}CD163^{hi} CELLS, IN INFLAMED COLON OF CD PATIENTS.

After excluding dead cells, doublets and neutrophils and gating on hematopoietic CD45⁺ cells (Figure S1), the average frequency of HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs was significantly greater in inflamed tissues relative to paired non-lesional sites in the colon of patients with CD ($n=36$) ($P<0.0001$; Figure 1A). Considering the increased cellular infiltrate in inflamed CD tissues (mean 54.1% (\pm SD 21.1) versus 34.6% (\pm SD 16.0) CD45⁺ cells in inflamed versus non-inflamed colon), the augmentation of HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs in total cells further reflected their accumulation in lesions ($P<0.0001$; Figure 1B). We therefore postulated that HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs could be associated with disease pathogenesis. The frequency of this population was significantly reduced in healthy colonic mucosa of CD patients in endoscopic remission ($P<0.0001$; Figure 1A) to similar levels as those observed in non-inflamed mucosa of CD as well as in healthy non-CD donors ($P<0.0001$). Moreover, HLADR⁺SIRPα⁺ cells were detected at a lower frequency in inflamed colon of patients with infectious or drug-induced colitis ($P<0.002$; Figure 1A) relative to inflamed CD colon.

To assess potential heterogeneity within the HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs infiltrating inflamed colon, this population was subdivided according to CD64 and CD163 expression levels (Figure 1C). CD163, a scavenger receptor expressed on human gut Mφ and CD64 (the Fc-gamma receptor 1), has been reported to be an inflammatory DC or Mφ marker in chronic inflammatory disorders in humans (Jakubzick et al., 2017; Segura and Amigorena, 2013). Four subpopulations were identified: two CD64^{-dim} (left quadrants) as well as two CD64^{hi} cells (right quadrants) expressing variable intensity of CD163 (i.e. CD163^{-dim} and CD163^{hi}) (Figure 1C). Further

immunophenotyping highlighted that the two CD64^{hi} populations expressed high levels of CD14 (Figure 1C); mean fluorescence intensity of SIRP α , its isoform SIRP β , CX3CR1 or CD103 (Figure S2A) could not discriminate these two CD14⁺ subpopulations. In contrast, HLADR expression was significantly higher in CD64^{hi}CD163^{hi} when compared to CD64^{hi}CD163^{-dim} cells but reduced in inflamed versus non-inflamed colon in all three subsets examined (Figure S2B). Furthermore, CD64^{-dim}CD163^{-dim} cells were CD14⁻ and overrepresented among the HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs that expressed CD1c (Figure S2C).

Next, we assessed whether any of the 4 HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs subpopulations accumulated in inflamed CD colonic lesions. As depicted in Figure 1D, only the frequency of one CD14⁺ subset, i.e. the CD64^{hi}CD163^{-dim} cells, significantly increased in inflamed versus paired non-inflamed mucosa of CD patients ($P < 0.05$). When accounting for the increased percentage of the entire HLADR⁺SIRP α ⁺ MNP population in inflamed infiltrate versus non-inflamed colon (Figure 1A), the accumulation of CD64^{hi}CD163^{-dim} cells was further highlighted compared to CD in remission and non-CD control donors as well as to paired non-inflamed CD tissue ($P < 0.0001$) (Figure 1E). The cohort of active CD patients was next subdivided based on treatment history at the time of sample collection (Figure 1F). The frequencies of CD64^{hi}CD163^{-dim} cells increased in inflamed when compared to paired non inflamed colon and remained the predominant HLADR⁺SIRP α ⁺ cell subset in both treated and untreated groups. Notably, a slight accumulation of CD64^{hi}CD163^{high} cells was noticed in inflamed relative to non-inflamed samples in patients undergoing treatment.

Overall, these data provide evidence that HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs accumulate in inflamed colon of patients with CD. These MNPs are heterogeneous and comprise two CD14⁺CD64^{hi} (CD163⁻

$^{\text{dim}}$ and CD163^{hi}), one $\text{CD14}^{\text{dull}}$ ($\text{CD64}^{-\text{dim}}\text{CD163}^{\text{hi}}$) and one CD14^- ($\text{CD64}^{-\text{dim}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$) subpopulations. However, only the $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ cells augment in inflamed CD colon.

A.3.2. FREQUENCY OF $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ CELLS CORRELATES WITH DISEASE SEVERITY IN CD PATIENTS AND IS NOT MODIFIED BY TREATMENT HISTORY.

To assess the potential biological relevance of $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ cell accumulation in inflamed CD colon, we measured disease severity using the validated Simple Endoscopic Score for CD (i.e. SES-CD) (Table S1) (Daperno et al., 2004) in an independent cohort of CD patients. The data showed that the percentage of $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ but not $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{\text{hi}}$ cells in $\text{HLADR}^+\text{SIRP}\alpha^+$ MNPs positively correlated with SES-CD ($P < 0.0001$; Figure 2A). Furthermore, frequencies of $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ and $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{\text{hi}}$ cells were not modified by treatment history that included biologics combined or not with immunosuppressive drugs, in none of the two independent cohorts examined separately (Figure 2B). We therefore combined the two cohorts ($n=97$) and showed that age, gender, age at diagnosis, disease location (L2 and L3) and disease behavior (B1, B3 and B3) did not influence the percentage of $\text{HLADR}^+\text{SIRP}\alpha^+$ MNPs or $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ and $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{\text{hi}}$ cells in $\text{HLADR}^+\text{SIRP}\alpha^+$ MNPs (Figure S3A, B, C, D and E). Remarkably, the $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ cells remained the predominant $\text{HLADR}^+\text{SIRP}\alpha^+$ cell subset in CD colon, regardless the parameters used for stratification of CD patients, with the exception of colonic tissue from CD patients with penetrating B3 disease, in which the average frequency of $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ was slightly reduced.

Collectively, these observations indicate that one particular CD14^+ subpopulation, the $\text{CD64}^{\text{hi}}\text{CD163}^{-\text{dim}}$ cells, accumulates in inflamed CD colon in proportions that correlate with disease severity regardless of treatment history, demographics and disease classification.

A.3.3. CD64^{hi}CD163^{-dim} CELLS ARE THE MAJOR CONTRIBUTORS TO IL-23 AND IL-1 β SECRETION BUT NOT TNF- α IN INFLAMED CD COLON.

Building on the previous report of TNF- α and IL-1 β production being restricted to SIRP α ⁺ cells in inflamed CD colon (Baba et al., 2013), we examined which of CD14⁺CD64^{hi} cell subset expressed pro-inflammatory cytokines *ex vivo* (Figure 3). Frequencies of TNF- α -producing cells were higher in CD64^{hi}CD163^{hi} cells between non-inflamed and inflamed colonic tissues ($P < 0.05$), undetectable or low in CD64^{hi}CD163^{-dim} and CD64^{-dim}CD163^{-dim} cells, and observed in only 2/15 patients in the CD64^{-dim}CD163^{hi} cells (Figures 3A and Figure S4A). In contrast, the percentages of IL-23-producing-cells were significantly more abundant in CD64^{hi}CD163^{-dim} and CD64^{hi}CD163^{hi} cells in inflamed mucosal samples ($P < 0.001$ in 13/15 patients and $P < 0.05$ in 9/15 patients, respectively) while their frequencies were lower in the two CD64^{-dim} subpopulations. Despite the fact that both CD14⁺CD64^{hi} subpopulations produced IL-1 β , only IL-1 β -producing CD64^{hi}CD163^{-dim} cells were significantly enriched in inflamed versus non-inflamed mucosal samples (CD64^{hi}CD163^{-dim}, $P < 0.02$; CD64^{hi}CD163^{hi}, $P = 0.4$), and detected at variable but low frequencies in CD64^{dim} cells. IL-6 levels were highly variable in CD14⁺CD64^{hi} subsets across the different tissue states tested, and higher in CD64^{hi} compared to CD64^{-dim} cells. Furthermore, when considering the increased frequencies of HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs in inflamed colon, TNF- α -producing CD64^{hi}CD163^{hi} cells were more frequent than TNF- α -producing CD64^{hi}CD163^{-dim} cells ($P < 0.004$). Conversely, IL-23- ($P < 0.0005$) and IL-1 β - ($P < 0.03$) producing CD64^{hi}CD163^{-dim} cells were higher than CD64^{hi}CD163^{hi} cells in CD45⁺ cells (Figure 3B). Treatment including biologics did not influence the frequencies of cytokine-producing cells in either of the CD14⁺CD64^{hi} subsets (Figure S4B). We further examined the expression of anti-inflammatory cytokine IL-10 in

the two CD14⁺CD64^{hi} subsets (Figure S4C). The percentage of IL-10-producing cells as well as IL-10 expression per cell were higher in CD64^{hi}CD163^{hi} relative to CD64^{hi}CD163^{-dim} cells in inflamed colon ($P<0.002$). Finally, single IL-23 or IL-1 β -producing cells predominated in CD64^{hi}CD163^{-dim} when compared to CD64^{hi}CD163^{hi} cells in 3/4 patients examined (Figure 3C and Figure S4D).

Overall, these results highlight that among the 4 HLADR⁺SIRP α ⁺ MNP subsets, the CD64^{hi}CD163^{-dim} cells accumulate in greater proportions in inflamed CD mucosa and are thus the major contributor to IL-23 and IL-1 β . CD64^{hi}CD163^{hi} cells represent the major TNF- α or IL-10-producing cells in inflamed colon.

A.3.4. COLONIC CD64^{hi}CD163⁻ (P3) CELLS SKEW AUTOLOGOUS CD4⁺ T CELLS TOWARDS TH17/TH1 RESPONSES IN CD PATIENTS.

We next asked whether and how the colonic CD14⁺ subsets influenced the Th17/Th1 profile of autologous CD4⁺ T cells in CD patients. To this end, we simultaneously purified from inflamed CD colon, CD4⁺ T cells that were depleted of CD25⁺ regulatory T cells as well as CD14⁺CD64^{hi} subpopulations at the two extremes of CD163 expression spectrum (i.e. CD163⁻ and CD163^{hi}), thus excluding the CD163^{dim} cells (Figure 4A). Noteworthy, within the CD163^{-dim} subpopulation, the CD163⁻ cells remained the predominant subpopulation that significantly infiltrated the inflamed colon while the frequency of CD163^{dim} cells did not increase relative to paired non-inflamed sites (Figure S5A). Furthermore, the frequency of CD163⁻ but not CD163^{dim} cells correlated with the endoscopic disease severity ($P<0.0002$, $r=0.46$, Spearman test). The two highly purified CD14⁺CD64^{hi} subsets were hereafter named P3 (CD163⁻) and P4 (CD163^{hi}) cells with P3 cells displaying a kidney shaped nucleus and a reduced cell size when compared to P4 cells, that exhibited typical M ϕ morphology with vacuoles (Figure S5B). The intermediate

CD14^{-dim}CD64^{dim} (P1) and the triple negative CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells (P2) were morphologically heterogeneous populations and therefore not further examined in functional studies.

Data in figure 4B indicated that in the context of co-culture with P3 cells was a significantly greater proportion of IFN- γ ⁺IL-17⁺ and IFN- γ ⁻IL-17⁺ cells in colonic CD4⁺ T cells observed ($P < 0.002$), with no effect on IFN- γ ⁺IL-17⁻ T cells. The low yield of P4 cells, which represented on average less than 0.2% of HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs in CD45⁺ cells (Figure 1E), precluded performing more than 3 co-cultures experiments. However, the P4-M ϕ -like cells did not appear to augment memory intestinal Th17, Th17/Th1 or Th1 responses.

Noteworthy, colonic CD4⁺ T cells contained higher frequencies of cells displaying phenotypes associated with Th1 (CCR6⁻CXCR3⁺) and Th17/Th1 (CCR6⁺CXCR3⁺) in inflamed mucosa when compared to their mesenteric lymph node (MLN) counterparts (Figure 4C). In contrast, Th17 (CCR6⁺CXCR3⁻) cells represented more than 25% of CD4⁺ T cells in inflamed MLNs and less than 10% in inflamed CD colon ($P < 0.001$; Figure 4C). In this context, we further asked whether CCR6⁺CXCR3⁻CD62L^{low}CD4⁺ (Th17 T_{EM}) MLN cells that recently migrated to the colon could be readily shaped by P3 cells to acquire a Th17/Th1 cytokine profile. To this end, Th17 T_{EM} were purified from either MLN or colon and co-cultured with colonic P3 cells. Th17/Th1, Th17 but not Th1, responses were significantly augmented by P3 cells in CCR6⁺CXCR3⁻ T_{EM} cells (Figure 4D). Note that the minor colonic CCR6⁺CXCR3⁻ T_{EM} subset comprised increased frequencies of single IFN- γ -producing cells (~50%), relative to their MLN (~2%) counterpart. Finally, P3 cells increased the frequency of IL-6⁺TNF- α ⁻ ($P < 0.03$) and IL-6⁺TNF- α ⁺ ($P < 0.03$) cells in CCR6⁺CXCR3⁻ T_{EM} cells (Figure S6).

Collectively, P3 cells shift Th17 towards a Th17/Th1 profile while contribute to further augment the local Th17 response.

A.3.5. CD64^{hi}CD163⁻ (P3) CELLS PROMOTE COLONIC TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES IN AN IL-1B-DEPENDENT MANNER IN CD PATIENTS.

We next investigated some of the mechanisms by which P3 cells, along with the IL-1 β and IL-23 they secrete, can govern mucosal Th17 and Th17/Th1 profile. Neutralizing IL-1 β function in P3/CD4⁺ T cell co-cultures inhibited Th17 and Th17/Th1 responses elicited by P3 cells ($P < 0.03$) (Figure 5A). Accordingly, addition of recombinant IL-1 β to purified colonic CD4⁺ T cells significantly increased the frequency of IFN- γ ⁻IL-17⁺ ($P < 0.002$), IFN- γ ⁺IL-17⁺ ($P < 0.002$) but not IFN- γ ⁺IL-17⁻ cells (Figure 5B), along with enhancing IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , and IL-6 secretion in the culture supernatant (Figure 5C). The presence of IL-23 augmented the percentage of IFN- γ ⁻IL-17⁺ ($P < 0.04$) and IFN- γ ⁺IL-17⁺ ($P < 0.03$) in mucosal CD4⁺ T cells. In contrast, IL-12 addition decreased IFN- γ ⁻IL-17⁺ ($P < 0.007$) while increasing IFN- γ ⁺IL-17⁻ cells ($P < 0.04$) (Figure 5D) along with IFN- γ , GM-CSF and IL-6 production (Figure 5E). Noteworthy, the opposite IL-17 expression in colonic CD4⁺ T cells stimulated by either recombinant IL-23 or IL-12 (Figures 5D and 5E), which both share the IL-12p40 chain, reflects the lack of significant inhibition of Th17 responses when adding neutralizing anti-IL-12p40 mAb to CD4⁺ T/P3 cells co-cultures (Figure 5F).

Taken collectively, IL-1 β secreted by the P3 cells, as well as IL-23, contribute towards amplifying a potential pathogenic Th17 signature in CD mucosa.

A.3.6. UNSUPERVISED SINGLE CELL RNA-SEQUENCING (SCRNASEQ) INDEPENDENTLY SEGREGATES CLUSTERS ENRICHED IN P3 OR P4 CELLS.

To further assess whether P3 and P4 cells indeed represent molecularly distinct subpopulations, we performed unsupervised scRNAseq analyses according to the gating strategy depicted in Figure 6A. Since this experimental approach aimed to comprehensively sample all the MNPs defined by the HLADR⁺SIRP α ⁺ gate, single cells isolated from inflamed colonic mucosa of three CD patients were thus sorted from 5 overlapping gates consisting of P3, CD64^{hi}CD163^{dim} (Px), P4 as well as P1 and P2, which collectively capture the full spectrum of HLADR⁺SIRP α ⁺MNPs, and then profiled using a modified version of Smart-Seq2 protocol (Villani and Satija, 2017). Unbiased clustering analyses of all HLADR⁺SIRP α ⁺ single cells revealed 6 general clusters (Figure 6B). The single cell identity making up each cluster was reported in Table S2. Clusters E and F consisted of a majority of P3 and P4 cells respectively, a significant enrichment over a random assortment of cells into clusters ($P < 0.01$ for both comparisons; chi-square test) (Figure 6B). Thus, the remaining cells comprised in clusters E and F originated from sorting gates Px and P1 that were designed to capture likely transitioning population (Figure 6A). More precisely, cluster E comprised 50% P3, 32% Px and 11% P1 while cluster F comprised 50% P4, 17% Px and 13% P1. These two clusters were enriched in CD14-expressing cells with cluster F expressing higher CD14 levels than cluster E (Figure S7A and Table S3), corroborating the data observed at the protein level in the two CD64^{hi} subsets ($P < 0.05$; Figure S7B). Collectively, these observations support the concept that CD163 effectively stratified two CD14⁺CD64^{hi} subpopulations.

As shown in Figure 6C and Table S3, cluster A encompassed a subpopulation of the P2 gate bearing pDC markers (e.g. *BCL11A*, *TCF4*, *LILRA4*, *VEGFB*), while genes in cluster B (e.g. *SPIB*, *LTB*) and C (e.g. *CD1C*, *SLC38A1*) characterized conventional DCs, and contained most

of the remaining P2 along with P1 cells (Figure 7). While cluster D also expressed myeloid cell markers (*NLRP12*, *LRRC2*, *CCDC88B*), these cells were best defined by their general down-regulation of several genes associated with the ubiquitin-proteasome system (UPS) (e.g. *PSMA6*, *PSMB1*, *UBE2L6*) (Figure S7C). Clustering analysis was consistent across the three CD patients profiled and allowed the identification of additional discriminating markers beyond CD163 that could be used to isolate cells for the functional analyses. Examples of markers for cluster E (enriched for P3 cells) included *TREMI*, *FCAR*, *FCNI*, *IL1RN* and *FPRI*, while those for cluster F (enriched for P4 cells) included *CD163L1*, *MERTK*, *CD209*, *MRC1* and a set of complement genes (e.g., *C2*, *CIQA*, *CIQB*, *CIQC*) (Figure 8).

Together, single cell RNA-sequencing analyses empowered a finer cellular classification of the HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs, showing the existence of six clusters in CD inflamed colon and potentially identified new discriminative markers for P3 and P4 cells.

A.3.7. TREM⁺CD209⁻MERTK⁻ (P3/B) CELLS PROMOTE COLONIC TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES IN CD PATIENTS.

Our subsequent analyses focused on the newly identified surface markers that were differentially expressed in cells included in clusters E and F. Single cells expressing *TREMI* and *FCAR* predominated in cluster E, while *MRC1*, *MERTK* and *CD209*-expressing cells were observed in cluster F (Figure 9A). In fact, TREM1 and CD89 (*FCAR*), as well as CD206 (*MRC1*), CD209 and MERTK protein expression was validated as P3 and P4 cells markers respectively (Figure 9B), with TREM1⁺CD209⁻MERTK⁻ (P3/b) cells expressing P3 (CD64^{hi}CD163⁻) phenotype and TREM⁻CD209⁺MERTK⁺ (P4/b) cells expressing P4 (CD64^{hi}CD163^{hi}) phenotype (Figure 9C). Colonic P3/b and P4/b cells were next purified following the gating strategy b when compared to strategy a used to isolate P3 cells (Figure 9D).

P3/b, but not P4/b cells, augmented Th17 and Th17/Th1 but not Th1 responses ($P < 0.03$ and $P < 0.04$, respectively) in autologous CD4⁺T cells (Figure 9E), corroborating the function of P3 cells (Figure 4). The low frequency of P4/b, like P4, cells, limited the study of their function to only 2 out of 6 experiments. Interestingly, P3/b and P3 cells along with IL-1 β significantly up-regulated the mean fluorescence intensity of IL-17 (IL-17 MFI) ($P < 0.03$, $P < 0.004$, $P < 0.03$, respectively) in colonic IFN- γ ⁺IL-17⁺ but not IFN- γ ⁻IL-17⁺ CD4⁺T cells, highlighting an increase in IL-17 expression in Th17/Th1 cells only (Figure 9F).

Collectively, scRNAseq analyses identified new discriminative markers, confirming the existence of one HLADR⁺SIRP α ⁺ subpopulation, namely the inflammatory monocyte-like CD14⁺CD64^{hi}CD163⁻TREM1⁺CD209⁻MERTK⁻ cells that promoted Th17 and Th17/Th1 responses in inflamed colon of CD patients.

A.4. FIGURES

Figure 1

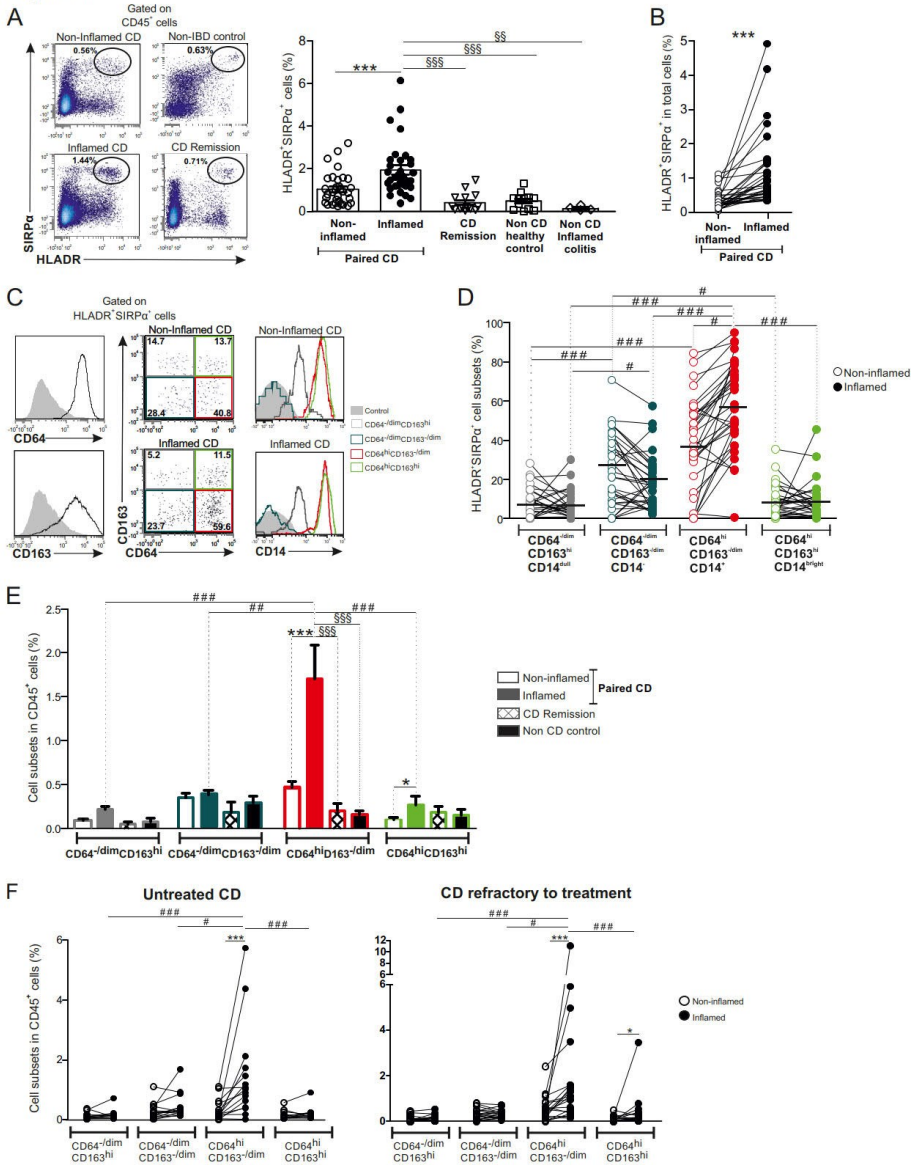
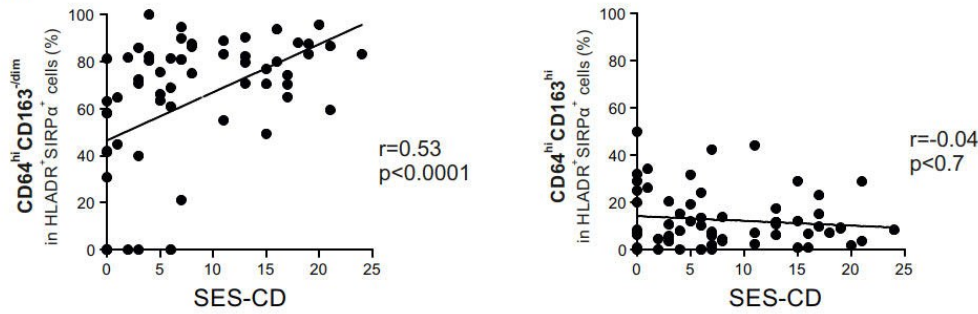


FIGURE A.4.1. FREQUENCIES OF CD14⁺CD64^{hi}CD163^{-/DIM} CELLS IN INFLAMED COLON OF CD PATIENTS

(A) Percentage of colonic HLADR⁺SIRPα⁺ cells after gating on CD45⁺ LPMC in active CD patients ($n=36$) (paired non-inflamed and inflamed samples, Wilcoxon signed rank test); CD in remission ($n=15$) and non-CD (healthy, $n=12$; colitis, $n=4$) patients (Mann-Whitney test). (B) Percentage of HLADR⁺SIRPα⁺ cells in total cells in active CD patients ($n=36$, Wilcoxon signed rank test). (C) HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs stained for CD64 and CD163 expression, representative histograms with isotype control mAbs (left panels). HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs subdivided according to intensity of CD64 and CD163 expression into 4 MNPs subpopulations; representative dot plots (middle panels) and CD14 expression (right panels). (D) Frequencies of the 4 MNPs (CD64^{dim}CD163^{hi}, CD64^{dim}CD163^{-dim}, CD64^{hi}CD163^{dim}, CD64^{hi}CD163^{hi} cells) in HLADR⁺SIRPα⁺ cells in paired non-inflamed and inflamed CD patients ($n=36$, Friedman test). (E) Percentage of the 4 MNPs in CD45⁺ cells in paired non-inflamed and inflamed CD patients ($n=36$), CD in remission ($n=15$) and non-CD control ($n=12$) patients (Wilcoxon signed rank, Mann-Whitney and Friedman tests). (F) Frequencies of the 4 MNPs in CD45⁺ LPMC in paired non-inflamed and inflamed tissues in untreated CD patients ($n=15$, left panel) and those refractory to treatment ($n=21$, right panel) (Wilcoxon signed rank and Friedman tests). For A, E and F, $P<0.01$ threshold for significance in Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney test to account for test multiplicity.

Figure 2

A



B

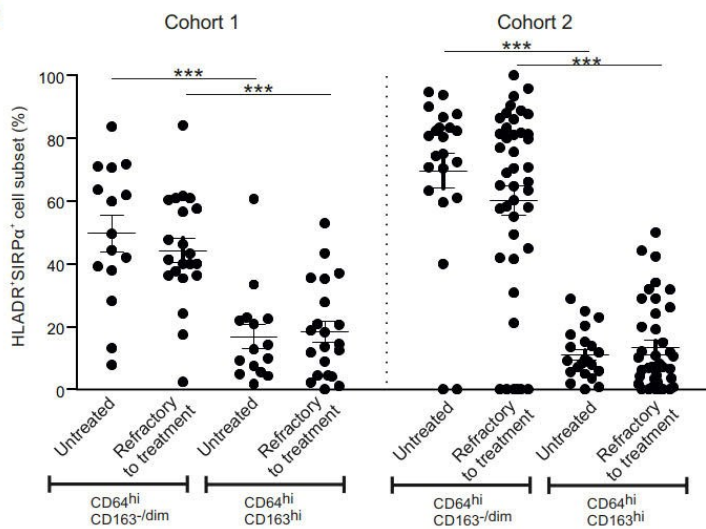


FIGURE A.4.2. FREQUENCIES OF CD14⁺CD64^{hi}CD163^{-/DIM} CELLS CORRELATE WITH DISEASE SEVERITY

(A) Correlation between the percentage of CD64^{hi}CD163^{-/dim} (left panel) and CD64^{hi}CD163^{high} cells (right panel) and the endoscopic score of disease severity (inflamed colon of active CD patients, SES-CD>3, $n=46$; healed colon of CD in remission SES-CD≤2, $n=15$) (Spearman's rank correlation test). (B) Frequencies of CD64^{hi}CD163^{-/dim} and CD64^{hi}CD163^{hi} cells in the two treated or untreated independent cohorts examined (cohort 1, $n=36$ and cohort 2, $n=61$). Wilcoxon signed rank test and Mann-Whitney test were used. $P<0.01$ threshold for significance to account for test multiplicity.

Figure 3

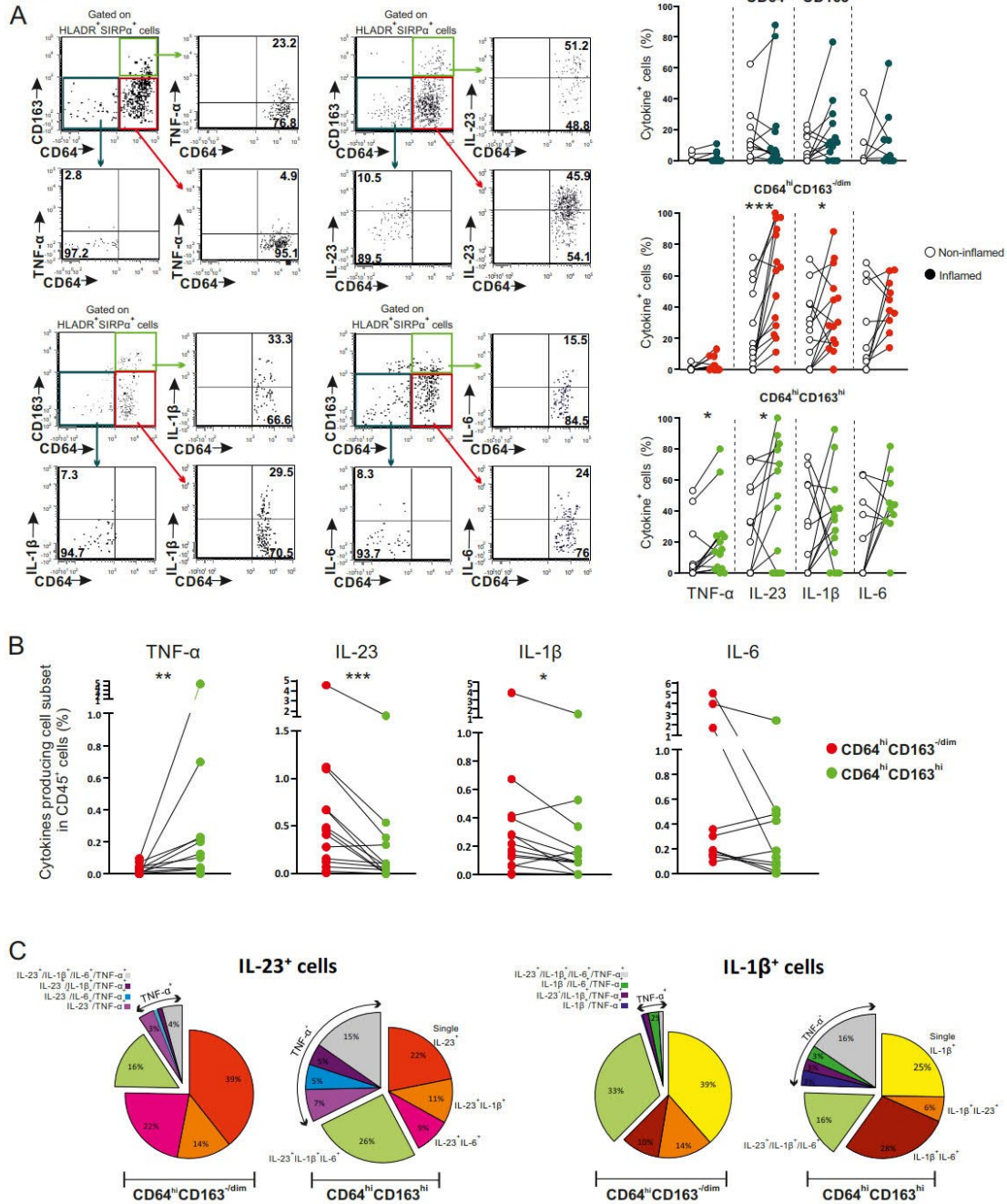


FIGURE A.4.3. CD64^{hi}CD163^{dim} CELLS ARE THE MAJOR CONTRIBUTORS TO IL-23 AND IL-1B SECRETION BUT NOT TNF-A IN INFLAMED CD COLON

(A) Frequencies of TNF- α ($n=13$), IL-23 ($n=15$), IL-1 β ($n=14$) and IL-6 ($n=11$) -producing cells among CD64^{dim}CD163^{dim}, CD64^{hi}CD163^{dim} and CD64^{hi}CD163^{hi} cells in paired non-inflamed and inflamed CD colon. Dot plots are one representative experiment in inflamed colon. (B) Frequencies of cytokine-producing CD64^{hi}CD163^{dim} and CD64^{hi}CD163^{hi} subsets in CD45⁺ cells in inflamed colon: TNF- α ($n=13$), IL-23 ($n=15$), IL-1 β ($n=14$), and IL-6 ($n=11$). (C) Co-expression of IL-1 β , IL-6, IL-23p19 and TNF- α in the two CD14⁺CD64^{hi} subsets in inflamed CD mucosa ($n=4$): proportion of single, double, triple and quadruple producing-cells among IL-23⁺ (left panels) and IL-1 β ⁺ cells (right panels). **A and B**, Wilcoxon signed rank test.

Figure 4

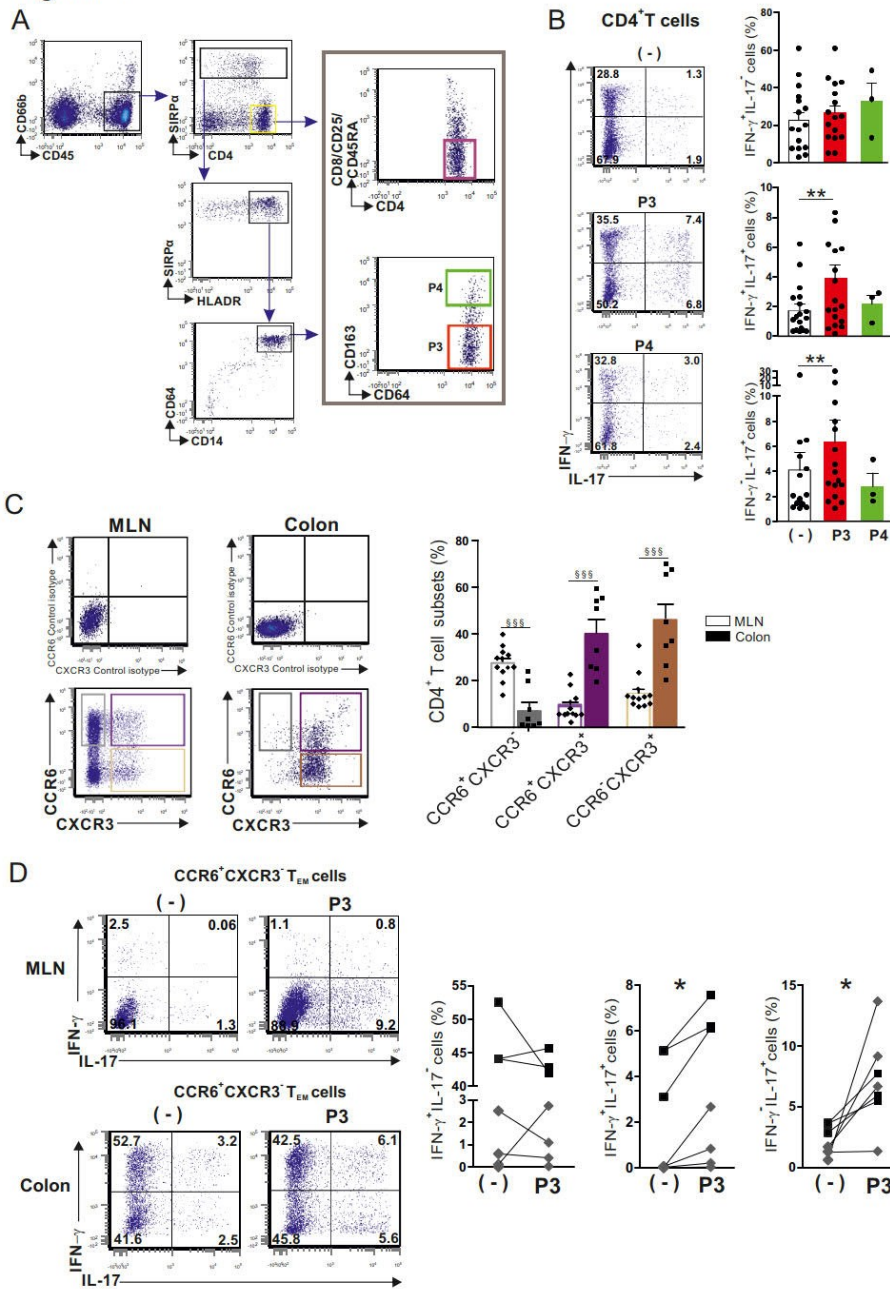


FIGURE A.4.4. CD64^{HI}CD163⁻ (P3) CELLS SHAPE AUTOLOGOUS CD4⁺ T CELLS TOWARDS A TH17/TH1 PROFILE

(A) Gating strategy for sorting CD4⁺ T cells (purple gate), P3 (red gate) and P4 (green gate) cells in inflamed CD colon. (B) P3 and P4 cells were co-cultured with autologous colonic CD4⁺ T cells for 6 days. IL-17/IFN- γ expression was measured using intracytoplasmic staining after gating on CD3⁺ T cells (P3, $n=16$; P4, $n=3$) (Wilcoxon signed rank test). (C) Distribution of CCR6⁺CXCR3⁻ (Th17), CCR6⁺CXCR3⁺ (Th17/Th1), CCR6⁻CXCR3⁺ (Th1) cells in MLN ($n=8$) and colon ($n=12$) of CD patients (Mann-Whitney test). (D) CCR6⁺CXCR3⁻ CD62^{low}CD4⁺ cells isolated from MLN (diamond, $n=4$) or inflamed CD colon (square, $n=3$) were co-cultured with autologous P3 cells for 6 days. IL-17 and IFN- γ expression assessed using intracytoplasmic staining after gating on CD3⁺ T cells (Wilcoxon signed rank test).

Figure 5

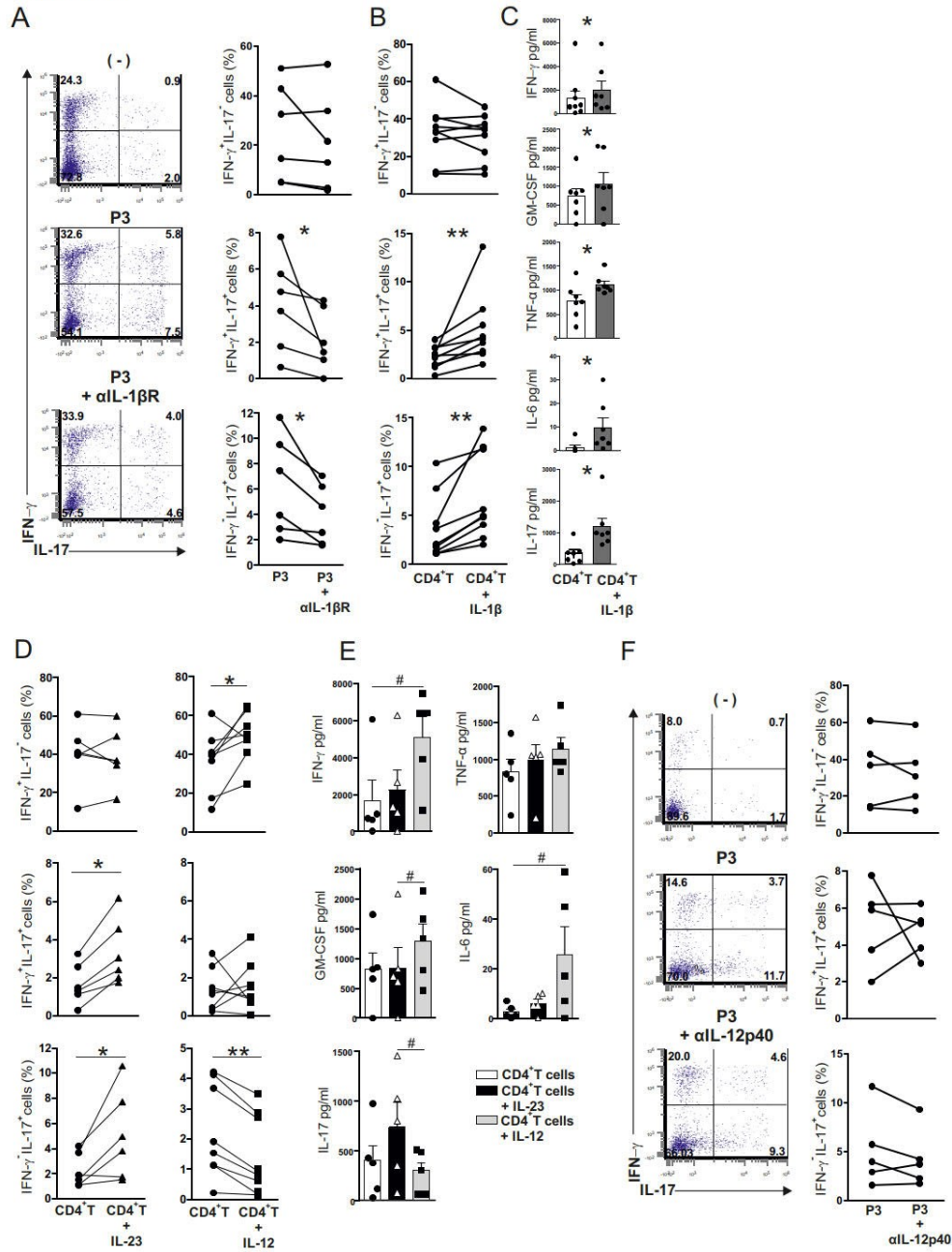


FIGURE A.4.5. CD64^{HI}CD163⁻ (P3) CELLS AUGMENT COLONIC TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES IN AN IL-1 β -DEPENDENT MANNER

CD4⁺ T cells, P3 and P4 cells were purified from inflamed CD colons as in figure 4A. CD4⁺ T cells were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 beads and: (A) co-cultured with P3 cells in the presence or absence of α IL-1 β R; (B and C) cultured with or without IL-1 β ; (D and E) cultured with or without IL-23 or IL-12; (F) co-cultured with P3 cells in the presence or absence of α IL-12p40. A (n=6), B (n=10), D (n=7) and F (n=5): intracytoplasmic IL-17/IFN- γ expression after gating on CD3⁺ T cells. C (n=7) and E (n=5): multiplex dosage in the culture supernatant. A to D and F, Wilcoxon signed rank test; E, Friedman test.

Figure 6

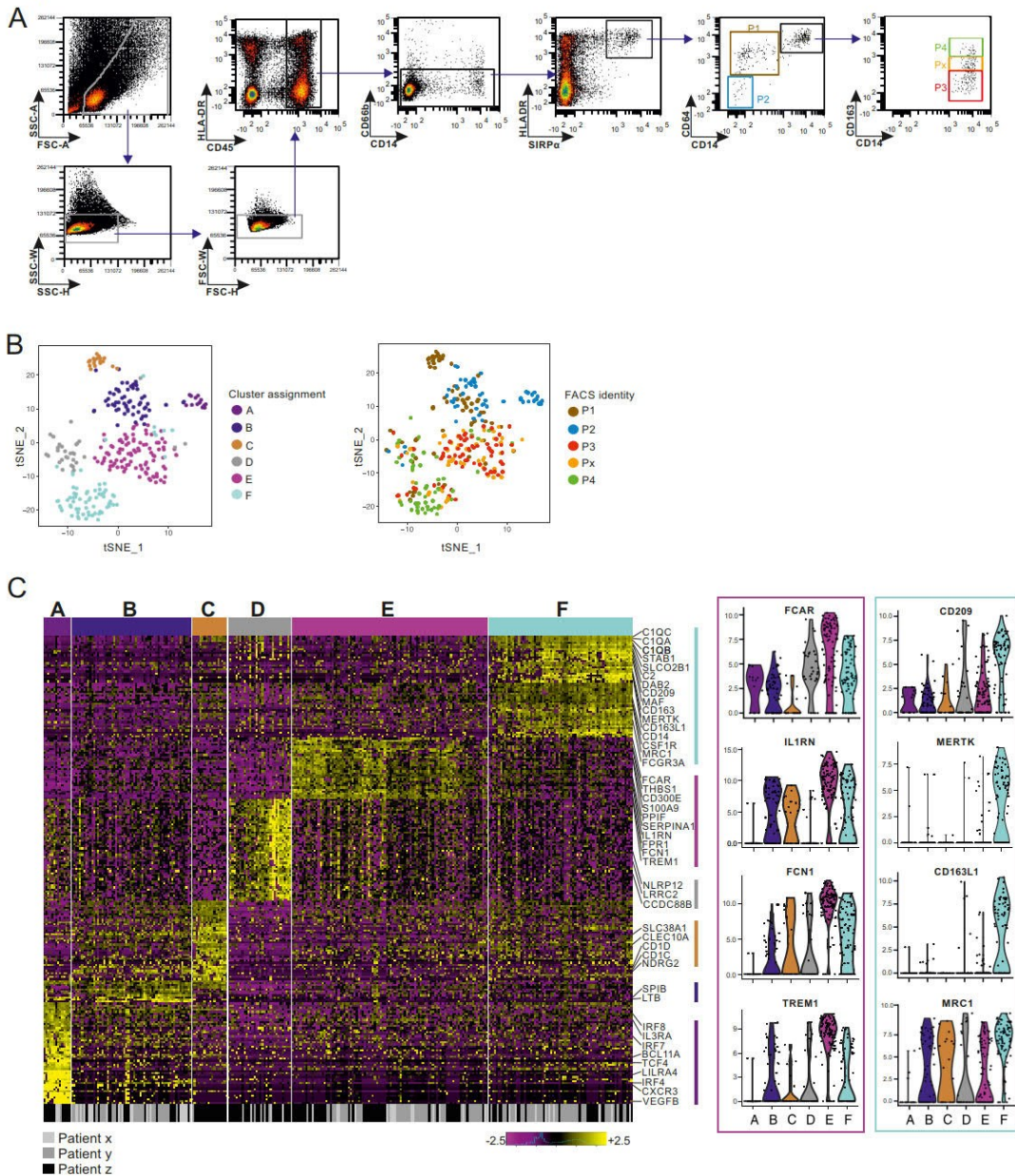


FIGURE A.4.6. SCRNASEQ ANALYSIS OF HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs IN INFLAMED CD COLON

(A) Gating strategy to capture the entire HLADR⁺SIRPα⁺ cell population for scRNAseq analysis. Single cells were sorted across overlapping gates labeled as P1 (brown), P2 (blue), P3 (red), Px (orange), and P4 (green) from 3 patients. (B) t-SNE visualization of isolated single HLADR⁺SIRPα⁺ cells from all five gates ($n=294$ cells that passed QC), colored by cluster assignment (left) and FACS identity (right). (C) Heatmap reports scaled expression (log₂(TPM+1) (Transcripts Per Million) values) of discriminative gene set (AUC cutoff ≥ 0.75 ; average log fold change expression difference ≥ 1.2) for each cluster defined. Heatmap color scheme is based on z-score distribution from -2.5 (purple) to 2.5 (yellow). Color legend at the top of the heatmap indicates the unbiased cluster assignment as defined in panel B and color legend at the bottom of the heatmap indicates the CD patient identity ($n=3$; labelled “x”, “y”, and “z”). Violin plots illustrate gene expression level distribution of discriminating surface marker genes (y-axis, (log₂(TPM+1))) across each of the six identified clusters (x-axis).

Figure 7

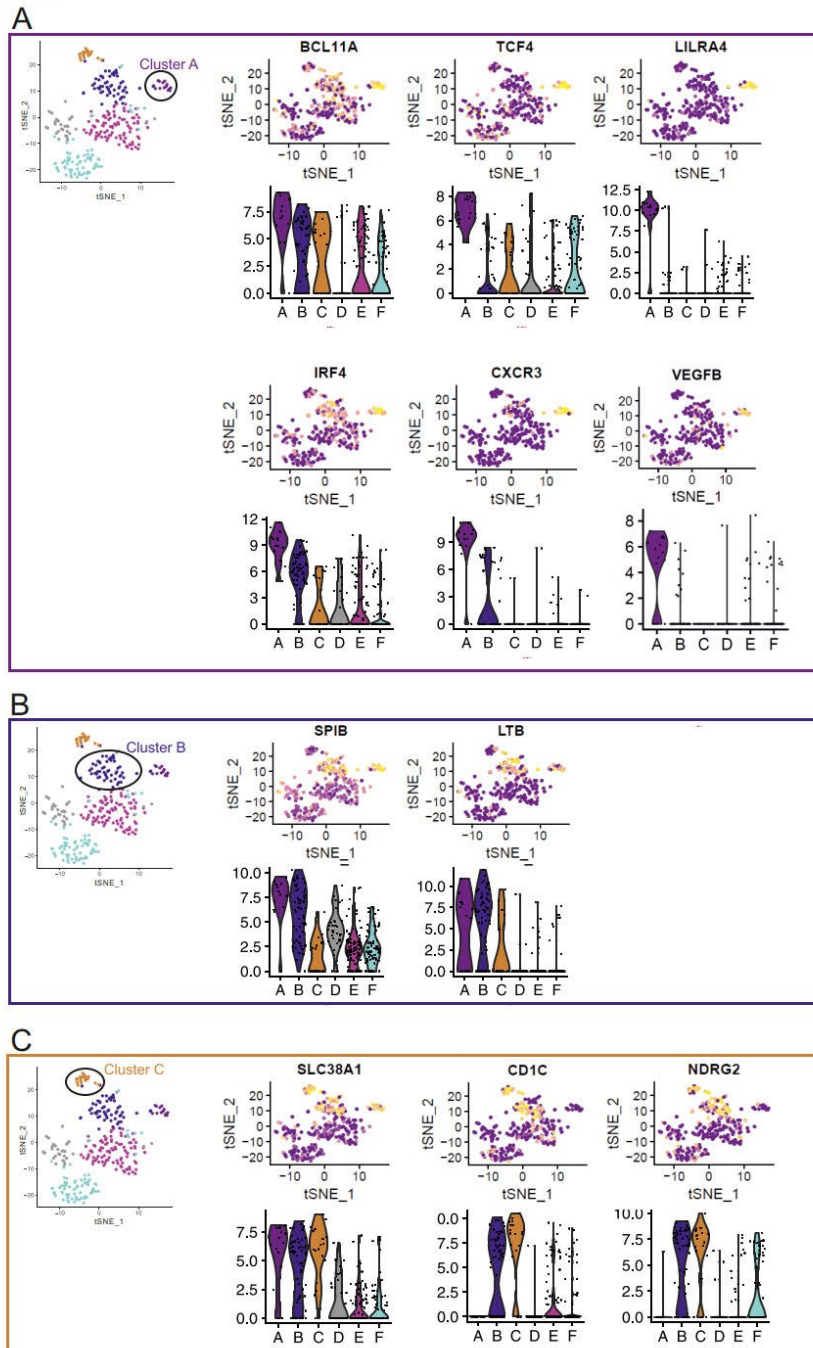
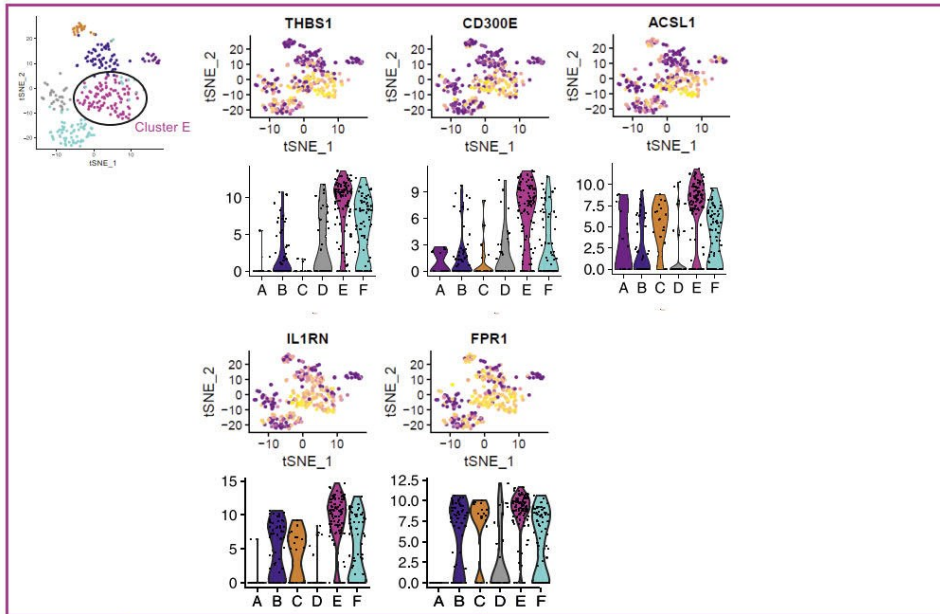


FIGURE A.4.7. GENE EXPRESSION OF DISCRIMINATING GENES OF CLUSTER A, B AND C

Feature plots of key discriminating genes expressed in particular single cell cluster, consisting of the *t*-SNE plot from Figure 6B on which is overlaid the gene expression level of selected markers for cluster A, B, and C. Color scheme is according to log₂(TPM+1) expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression. Violin plots illustrate expression level distribution of discriminating surface marker genes (y-axis, log₂(TPM+1)) across each of the six identified clusters (x-axis). Genes overexpressed in (A) cluster A, (B) cluster B and (C) cluster C are depicted.

Figure 8

A



B

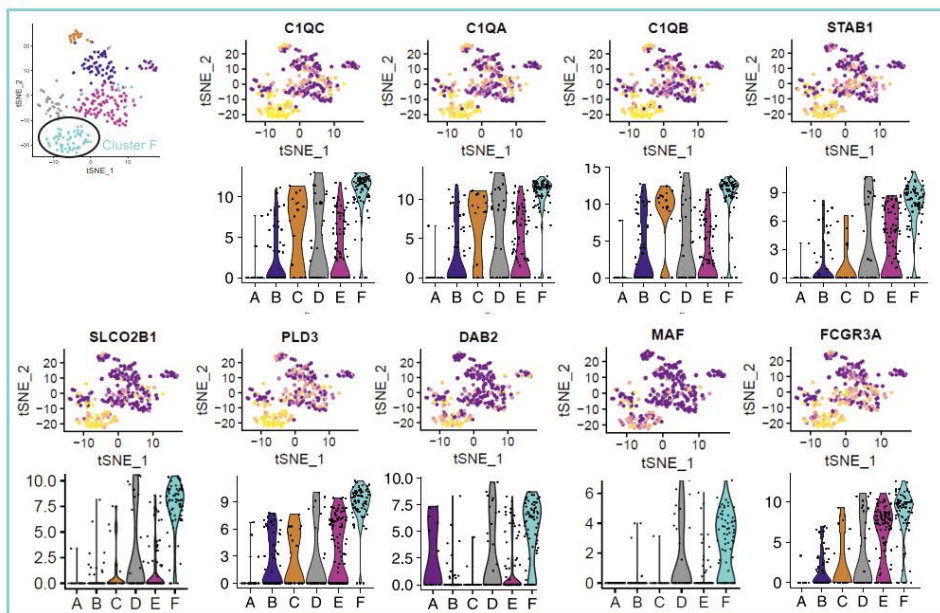


FIGURE A.4.8. GENE EXPRESSION OF SELECTED DISCRIMINATING GENES OF CLUSTER E AND F

Feature plots of key discriminating genes expressed in particular single cell cluster, consisting of the t-SNE plot from Figure 6B on which is overlaid the gene expression level of selected markers for cluster E and F. Color scheme is according to $\log_2(\text{TPM}+1)$ expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression. Violin plots illustrate expression level distribution of discriminating surface marker genes (y-axis, ($\log_2(\text{TPM}+1)$)) across each of the six identified clusters (x-axis). Genes overexpressed in (A) cluster E and (B) cluster F are depicted in feature plots and associated violin plots.

Figure 9

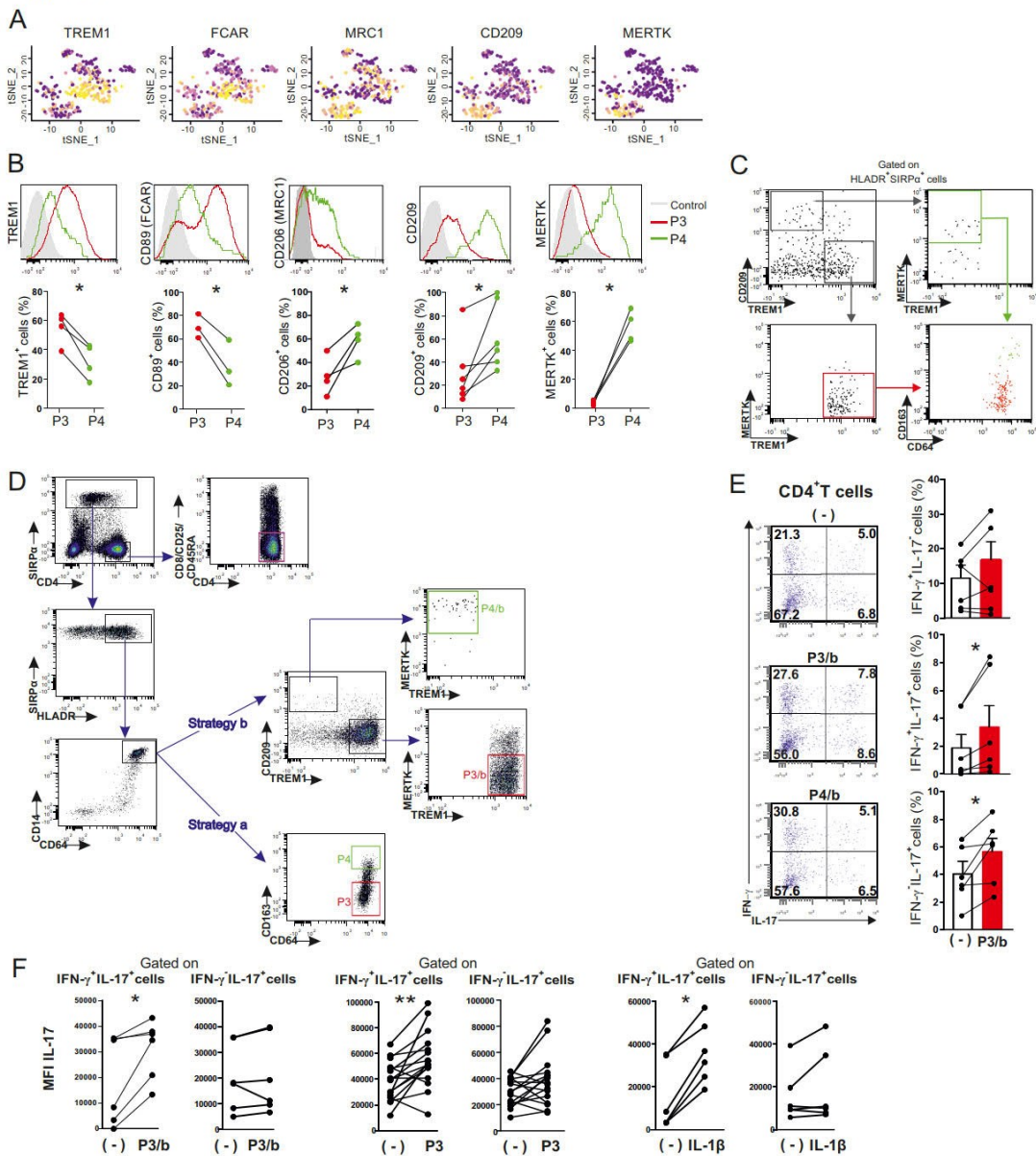


FIGURE A.4.9. FUNCTIONAL VALIDATION OF P3 AND P4 CELLS USING THE NEWLY IDENTIFIED PHENOTYPE BY SCRNA-SEQ

(A) Feature plots of key discriminating genes consisting of the *t*-SNE plot from Figure 6B on which is overlaid the gene expression level of selected markers genes (TREM-1, FCAR, MCR1, CD209, and MERTK) for cluster E and F. Color scheme is according to $\log_2(\text{TPM}+1)$ expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression. (B) TREM1 ($n=4$) and CD89 ($n=3$), CD206 ($n=4$), CD209 ($n=6$) and MERTK ($n=4$) protein expression in the two $\text{CD}14^+\text{CD}64^{\text{hi}}\text{CD}163^+$ subsets after gating on $\text{HLADR}^+\text{SIRP}\alpha^+$ cells. (C) $\text{TREM}1^+\text{CD}209^-$ MERTK $^-$ cells display P3 ($\text{CD}64^{\text{hi}}\text{CD}163^+$) phenotype and $\text{TREM}1^+\text{CD}209^+\text{MERTK}^+$ cells show P4 ($\text{CD}64^{\text{hi}}\text{CD}163^{\text{hi}}$) markers. Shown is one representative experiment among four. (D) Gating strategy for isolation of $\text{CD}4^+$ T cells and MNPs: strategy b ($\text{TREM}1^+\text{CD}209^-\text{MERTK}^-$, P3/b and $\text{TREM}1^+\text{CD}209^+\text{MERTK}^+$, P4/b) in comparison to strategy a, as depicted in figure 4. (E) Representative dot plots of $\text{CD}4^+$ T cells co-cultured with autologous colonic P3/b ($n=6$) and P4/b ($n=2$) cells for 6 days (left panels); IL-17/IFN- γ expression measured via intracytoplasmic staining after gating on $\text{CD}3^+$ T cells (right panels). (F) Mean fluorescence intensity of IL-17 in colonic $\text{CD}4^+$ T cells co-cultured for 6 days with autologous P3/b ($n=6$), P3 ($n=16$) or in the presence of IL-1 β ($n=6$). B, E and F, Wilcoxon signed test.

Figure S1

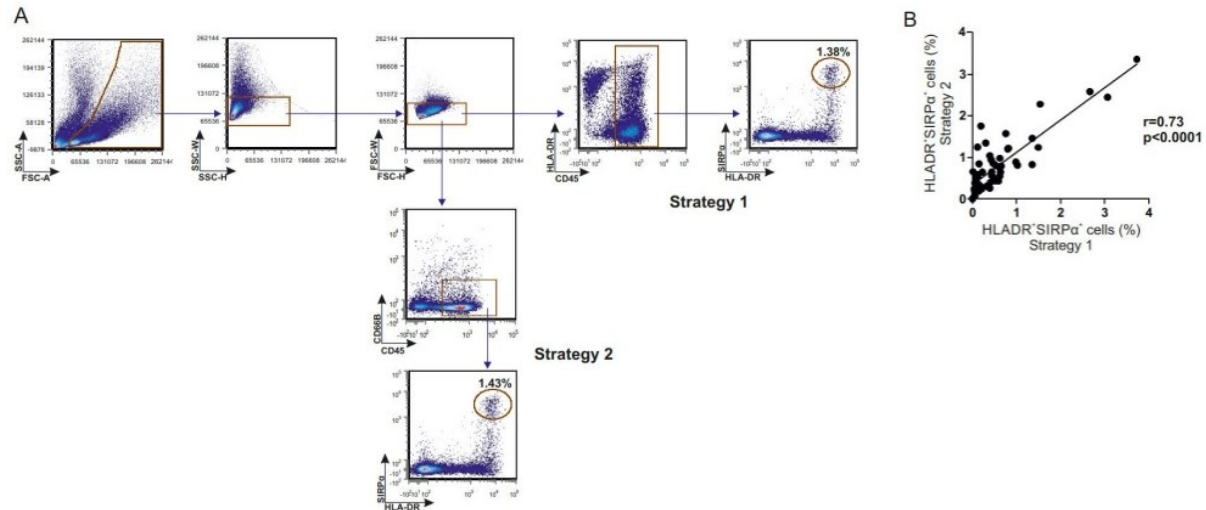


FIGURE A.4.S1. FIRST STEPS OF GATING STRATEGIES FOR STAINING OF HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs IN INFLAMED CD COLON

(A) First steps of gating strategies for staining and sorting of HLADR⁺SIRP α ⁺MNPs, showing exclusion of dead cells and doublet cells. Two gating strategies were employed to exclude neutrophils, either by excluding SSC^{high}FSC^{int} cells only (strategy 1, applied for staining and morphology) or SSC^{high}FSC^{int} and CD66b⁺ cells (strategy 2, applied for MNP/T cell co-culture and single cell RNA sequencing). (B) Correlation of percentage of HLADR⁺SIRP α ⁺ cells quantified according to strategy 1 and strategy 2 ($n=52$, Spearman test).

Figure S2

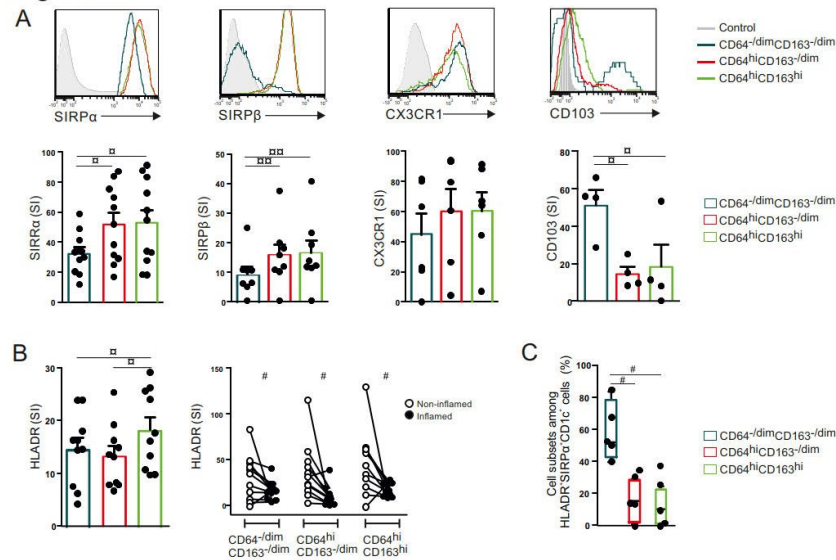


FIGURE A.4.S2. PHENOTYPE OF CD64^{-DIM}CD163^{-DIM}, CD64^{HI}CD163^{-DIM}, CD64^{HI}CD163^{HI} CELLS IN INFLAMED COLON

(A) SIRP α ($n=11$), SIRP β ($n=8$), CX3CR1 ($n=6$) and CD103 ($n=4$) expression in CD64^{-dim}CD163^{-dim} (cyan), CD64^{hi}CD163^{-dim} (red), CD64^{hi}CD163^{hi} cells (green), depicted by a representative histogram and staining index. (B) HLADR expression in CD64^{-dim}CD163^{-dim}, CD64^{hi}CD163^{-dim}, CD64^{hi}CD163^{hi} cells, depicted by staining index ($n=11$). (C) Whisker plot (median, min to max) showing the distribution of CD64^{-dim}CD163^{-dim}, CD64^{hi}CD163^{-dim}, CD64^{hi}CD163^{hi} cells among HLADR⁺SIRP α ⁺CD1c⁺ cells ($n=5$). A and B, Repeated measures Anova; B and C, Friedman test.

Figure S3

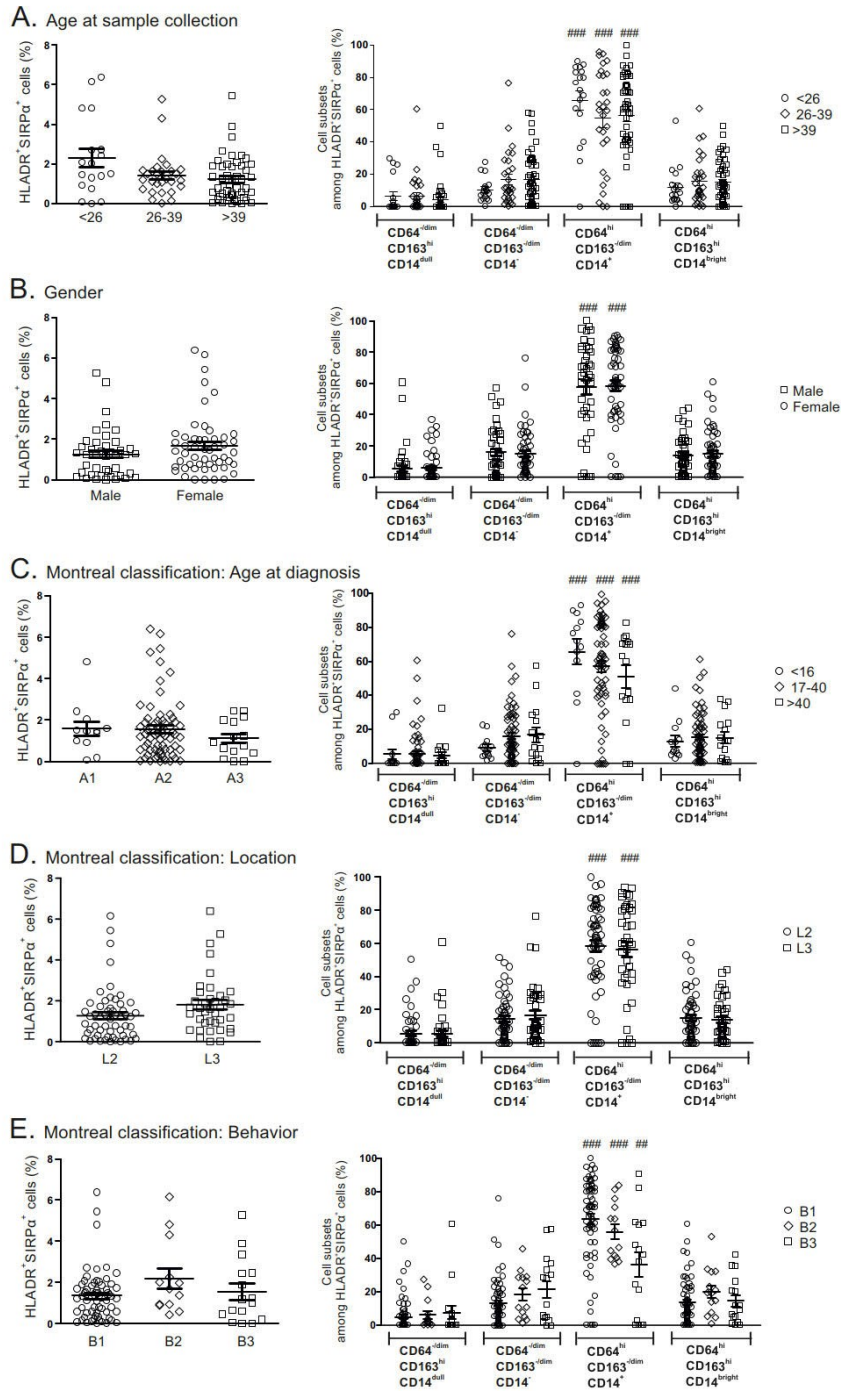


FIGURE A.4.S3. THE CD64^{hi}CD163^{-DIM} CELLS REMAINED THE PREDOMINANT HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs IN CD COLON REGARDLESS DEMOGRAPHICS AND CLINICAL CLASSIFICATION OF CD PATIENTS

Frequencies of HLADR⁺SIRPα⁺ MNPs (left panels) and 4 HLADR⁺SIRPα⁺ MNP subsets (right panels) in combined cohort 1 (inflamed tissue, $n=36$) and cohort 2 ($n=61$). CD patients were stratified using **(A)** age at sample collection; **(B)** gender and, Montreal classification: **(C)** age at diagnosis (A1, A2 and A3), **(D)** disease location (L2 and L3), **(E)** disease behavior (B1, B2 and B3). **A to E**, left panels, Wilcoxon signed rank test or Kruskal-Wallis test; right panels, Hashtags above the CD64^{hi}CD163^{-DIM} cells indicate that frequencies of these cells were significantly different when compared to the other 3 HLADR⁺SIRPα⁺ MNP subsets in each subgroup of patients stratified as shown in left panels.

Figure S4

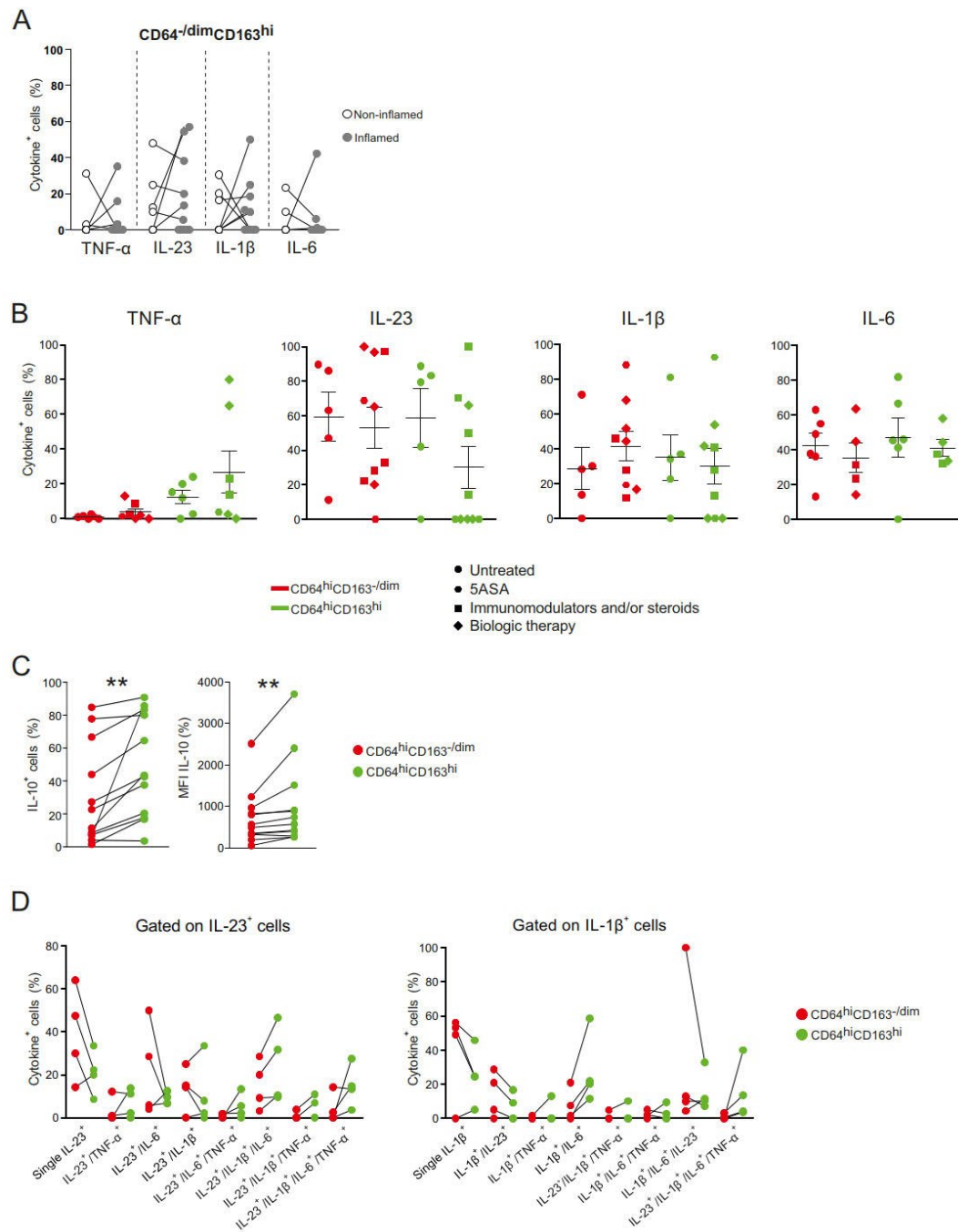


FIGURE A.4.S4. CYTOKINE EXPRESSION IN HLADR⁺SIRPA⁺ MNPS SUBSETS

(A) Frequencies of TNF- α ($n=13$), IL-23 ($n=15$), IL-1 β ($n=14$) and IL-6 ($n=11$) -producing cells among CD14^{dull}CD64^{dim}CD163^{hi} cells in paired non-inflamed and inflamed CD colon. (B) Frequencies of TNF- α ($n=13$), IL-23 ($n=15$), IL-1 β ($n=14$) and IL-6 ($n=11$) -producing cells among CD14⁺CD64^{hi} cells in inflamed CD colon, stratified according treatment. (C) Frequencies of IL-10 ($n=12$) -producing cells (left panel) and expression (right panel) in CD64^{hi}CD163^{-dim} and CD64^{hi}CD163^{hi} cells in inflamed CD colon. (D) Co-expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-23p19 in IL-23p19⁺ and IL-1 β ⁺ CD14⁺CD64^{hi} subset in inflamed CD mucosa ($n=4$): frequencies of single, double, triple and quadruple producing-cells among cells. **A and B**, Wilcoxon signed rank test; **D**, Kruskal-Wallis test.

Figure S5

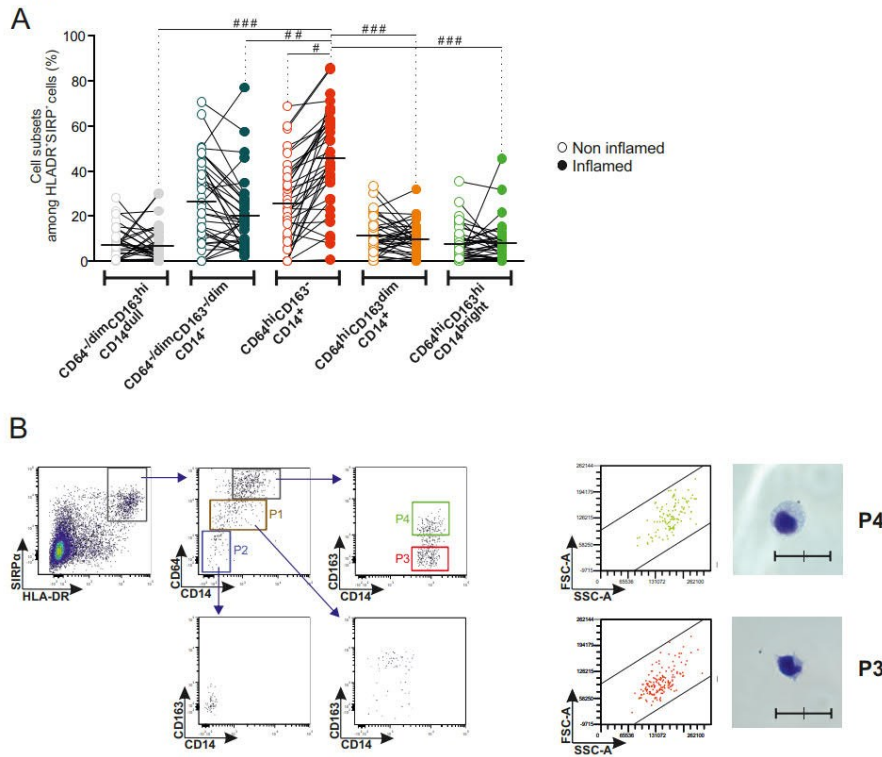


FIGURE A.4.S5. FREQUENCIES OF MONOCYTE-LIKE CD14⁺CD64^{hi}CD163⁺ CELLS AUGMENTS RELATIVE TO MACROPHAGE-LIKE CD14⁺CD64^{hi}CD163^{hi} CELLS IN INFLAMED CD COLON

(A) Frequencies of MNPs among HLADR⁺SIRPα⁺ cells in paired non-inflamed and inflamed CD patients ($n=36$, Friedman test). (B) Morphology of P3 and P4 cells. Strategy to identify P1, P2, P3 and P4 gates in HLADR⁺SIRPα⁺ cells according to CD14, CD64 and CD163 expression. Cell size and morphology of FACS sorted P3 and P4 cells in inflamed CD colon. Bar=20μm. One representative experiment out of 3 is shown.

Figure S6

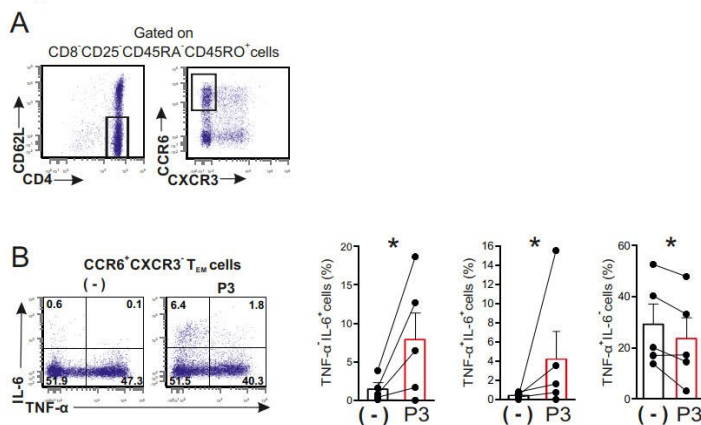


FIGURE A.4.S6: P3 CELLS INCREASE THE FREQUENCIES OF IL-6⁺TNF-α⁻ AND IL-6⁺TNF-α⁺ CD4⁺ T MUCOSAL T CELLS

(A) Gating strategy for sorting CD8⁺CD25⁻CD45RA⁻CD45RO⁺CD62L^{low}CCR6⁺CXCR3⁻ CD4⁺T cells from MLNs of CD patients. (B) CCR6⁺CXCR3⁻ CD4⁺T cells were co-cultured with or without autologous colonic P3 cells for 6 days ($n=5$). TNF-α and IL-6 expression was assessed using intracytoplasmic staining after gating on CD3⁺ cells (Wilcoxon signed rank test).

Figure S7

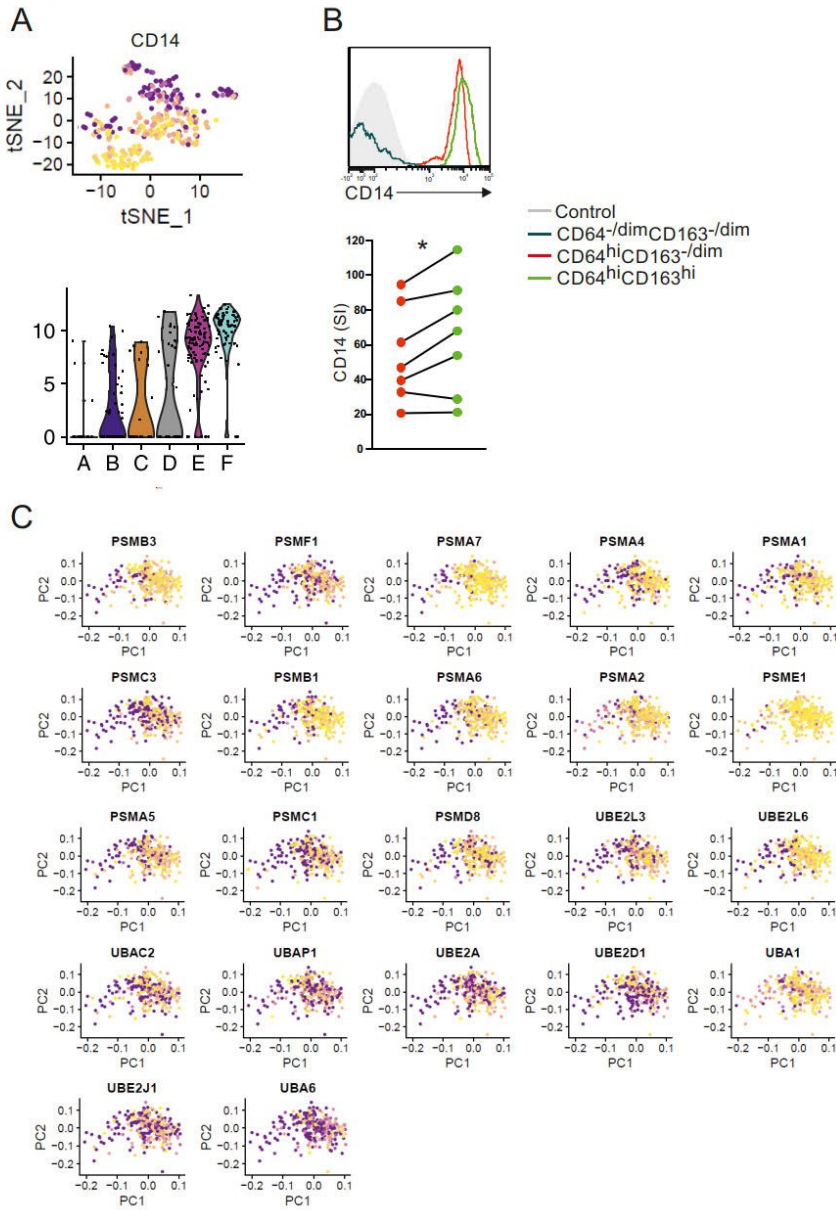


FIGURE A.4.S7. CD14 EXPRESSION AT MOLECULAR AND PROTEIN LEVELS, AND GENES EXPRESSION OF UBIQUITIN-PROTEASOME SYSTEM

(A) Gene expression level of CD14 overlaid on the *t*-SNE plot from Figure 5B. Color scheme is according to \log_2 (TPM+1) expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression. Violin plots illustrate expression level distribution of CD14 (y-axis, \log_2 (TPM+1)) across each of the six identified clusters (x-axis). (B) CD14 expression ($n=7$) in CD64⁻/dimCD163⁻/dim, CD64^{hi}CD163⁻/dim, CD64^{hi}CD163^{hi} cells, depicted by a representative histogram and staining index. Wilcoxon signed rank test. (C) Feature plots of genes of the ubiquitin-proteasome system that are commonly down-regulated in cells from cluster D, selected based on the criteria that the average log fold change is less than -0.5. Upon removing PC1 and PC5 outlier clusters (see supplementary methods section) and re-analyzing remaining single cells in principal component space, PC1 seemed to best capture the cell identity of cells comprised by cluster D being those with the lowest PC loading in PC1 space. Color scheme is according to \log_2 (TPM+1) expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression.

Figure S8

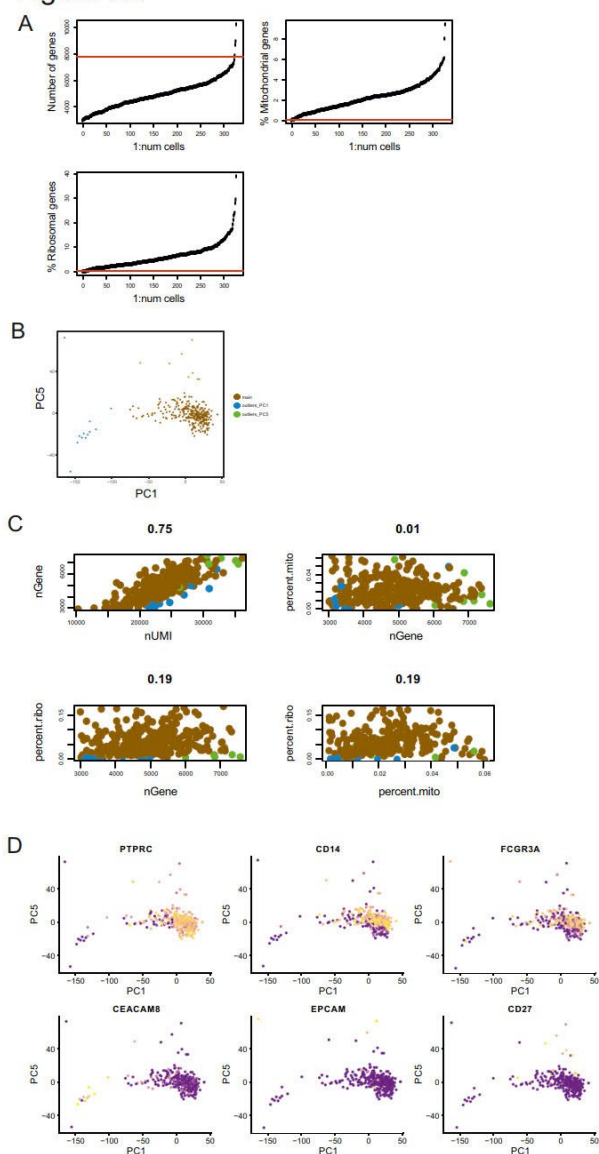


FIGURE A.4.S8. QUALITY FILTERS AND IDENTIFICATION OF OUTLIER CELLS IN SCRNASEQ DATA

(A) Quality control (QC) filters included number of genes, percent mitochondrial and percent ribosomal genes detected in each cell. The threshold for each QC filters is delineated by the red horizontal line present in each plot. (B) Principal component analysis (PCA) identification of outlier cells that were excluded from downstream analyses. Cells in blue were identified as outlier in PC1 and correspond to granulocyte (see Figure S5D), while cells in green are outliers defined by PC5 and correspond to lymphocytes. (C) Number of genes, percent mitochondrial and percent ribosomal genes detected in each cell across the main 3 categories defined in panel A: main cells (brown), PC1 outliers (blue) and PC5 outliers (green). nGene corresponds to number of genes. The value reported at the top of every plot is the Pearson correlation coefficient. (D) Gene expression level distribution of key markers across outlier cells in scRNAseq data: PCA depicted expression level of selected genes by outlier cells of landmark genes. Granulocyte contaminating cells were identified as expressing low PTPRC (encoding CD45) and no CD14, but high levels of CEACAM8 (encoding CD66b, key granulocyte marker). Epithelial contaminating cells were identified as expressing low to no PTPRC and no CD14, but high levels of EPCAM. Contaminating lymphocytes were identified as cells not expressing CD14 but expressing high levels of CD27. Color scheme is according to $\log_2(\text{TPM}+1)$ expression value, with color gradient from purple (low) to yellow (high) expression.

A.5. DISCUSSION

Several attempts to characterize the phenotype and function of HLADR⁺CD14⁺ MNPs infiltrating inflamed CD mucosa highlight their potential heterogeneity (Baba et al., 2013; Bernink et al., 2015; Kamada et al., 2008; Longman et al., 2014; Magnusson et al., 2016; Ogino et al., 2013; Thiesen et al., 2014). In the present study, we identified two functionally distinct HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64^{hi} MNPs that differentially accumulate in inflamed CD colon and further characterized their transcriptomic profile using scRNAseq. Firstly, the frequencies of CD163^{-dim} subpopulation, which was the major contributor of IL-1 β and IL-23 but not TNF- α , and more particularly the CD163⁻ cells significantly augmented in inflamed CD colon when compared to CD163^{hi} cells that did not accumulate and represented the predominant TNF- α -producing cell subset. The CD14⁺CD163⁻ subpopulation appeared to be part of the inflammatory landscape of CD since these cells did not infiltrate the paired non inflamed CD colon or the colonic tissue of patients with infectious or drug-induced colitis. Notably, similar frequencies of HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁻ cells were detected in inflamed and non-inflamed colonic CD mucosa, unlike previous report of increased numbers of SIRP α ⁺CD11b⁺CD14⁻ *bona fide* cDC2s in the mucosa of patients with hyperemic epithelium (Watchmaker et al., 2014). Secondly, highly purified CD163⁻ (P3) cells that morphologically resemble “monocyte-like cells”, but not CD163^{hi} (P4) cells resembling M Φ , promoted memory Th17 into Th17/Th1 responses in an IL-1 β -dependent manner. Thirdly, scRNAseq revealed that P3 and P4 cells displayed a molecularly distinct signature. Finally, since our present findings further indicated that the percentage of CD163⁻ cells significantly correlated with SES-CD in an independent cohort of patients, we propose that mucosal P3 cells are associated with pathogenicity in CD.

The P3 cells appeared functionally distinct from the previously described CD14⁺CD163^{low} cells (Ogino et al., 2013). As such, healthy, non-inflamed and inflamed CD colon comprise equal proportion of HLADR^{bright}CD14⁺CD163^{low} and CD163^{high} cells while HLADR^{dim}CD14⁺CD163^{low} cells were detected but not quantified in inflamed mucosa relative to healthy mucosa (Ogino et al., 2013). In apparent contradiction with that study and our present findings, immunohistochemical analysis indicates that CD163-expressing cells accumulate in areas of active inflammation in IBD colon (Franze et al., 2013). Furthermore, Ogino et al. provide evidence that only the HLADR^{bright}CD163^{low} or CD163^{hi} but not the HLADR^{dim}CD163^{low} cells polarize allogeneic naïve peripheral blood CD4⁺ T cells and induce their differentiation into IL-17- or IFN γ - producing T cells in a IL-1 β /IL-6, IL-23 and TGF β -dependent manner (Ogino et al., 2013), corroborating earlier observations using unfractionated CD14⁺ MNPs (Kamada et al., 2009). The role of IL-1 β , IL-6 and TGF β in human Th17 cell polarization is well established whereas IL-23 only promotes Th17 cell expansion (Stadhouders et al., 2018). Noteworthy, the frequencies of naïve CD4⁺ T cells are extremely low in intestinal mucosa (Granot et al., 2017) and these two studies did not investigate the propensities of CD14⁺ MNPs to regulate colonic memory Th17 and Th17/Th1 responses, and thus to drive intestinal inflammation.

Here, we report that highly purified P3 cells, which are the predominant IL-1 β and IL-23-producing CD14⁺ subset in the inflamed colon, augmented mucosal effector Th17/Th1 cell responses with pathogenic potential. This effect was mediated by IL-1 β without excluding the implication of IL-23. Several lines of evidence argue for a key role of IL-1 β and IL-23 in driving CD. First, IL-1 β levels correlate with disease activity in CD patients (Casini-Raggi et al., 1995) and increases prior to disease relapse (Schreiber et al., 1999). Second, IL-1 β up-regulates IL-23

receptor on pathogenic T cells (Kleinschek et al., 2009), and vice versa, IL-23 augments IL-1 β receptor on T cells (Coccia et al., 2012). Third, IL-23 promotes gut inflammation in experimental colitis (Maxwell et al., 2015). Finally, IL-1 β favors the accumulation and survival of colonic IL-17-secreting cells in a T cell-dependent model of colitis (Coccia et al., 2012). This pro-survival function of IL-1 β on intestinal effector T cells might represent one of the mechanisms that governed the increased frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁻ T cells observed in our study. Nonetheless, P3 cells as well as IL-1 β also augmented IL-17 expression per cell. In fact, drugs aiming to impair the effects of IL-1 β , such as IL-1 receptor antagonist (Anakinra), have been used in very early onset IBD patients, including chronic granulomatous disease and patients with IL-10 receptor mutations (Shouval et al., 2016b). Furthermore, some authors (Opipari and Franchi, 2015) proposed that blocking IL-1 β could be beneficial in patients carrying *ATG16L1* or *NOD2* mutations, two genes associated with increased risk of CD. However, IL-1 β blockade could trigger or worsen IBD (Hugle et al., 2017). Yet, ongoing clinical trials indicate that IL-23 blockade appears to be beneficial in patients with CD (Sands et al., 2017).

TNF- α , which is abundantly produced by local effector T cells, still represents the major target in the therapeutic management of patients with CD (de Souza and Fiocchi, 2016). We show here that frequencies of TNF- α -producing CD64^{hi}CD163^{hi} cells were significantly higher when compared to CD64^{hi}CD163^{-dim} cells that expressed very low levels of TNF- α . Although approximately 30% of CD patients were refractory to TNF- α antagonists in our cohort, treatment with biologics only or in combination with immunosuppressive drugs did not deplete either CD64^{hi}CD163^{-dim} cells, CD64^{hi}CD163^{hi} cells or TNF- α , IL-1 β and IL-23-producing cells. Nonetheless, TNF- α , like IL-1 β and IL-23, may exert a dual role in the intestinal mucosa. While TNF- α has pro-inflammatory properties, notably via interactions between membranous TNF- α

on the surface of CD14⁺MNPs and TNFR2 expressed on T cells that results in T cell survival, low levels of TNF- α may directly contribute to the maintenance of the epithelial cell barrier integrity (Billmeier et al., 2016). IL-1 β as well as IL-23 participate in maintaining the integrity of gut epithelial barrier at least through the role they play on IL-22 secretion by ILC3 (Longman et al., 2014). However, the protective function of ILC3 and IL-22 is also controversial since ILC3 drive experimental colitis through IL-1 β and IL-23- producing gut resident macrophages and IL-22 (Bauche et al., 2018; Buonocore et al., 2010; Eken et al., 2014). Collectively, targeting the IL-1 β pathway could be considered in the therapeutic arsenal for the management of CD, though caution should be exercised as the protective role of IL-1 β in the intestine could limit the safety of using IL-1 β pathway antagonists.

We further present evidence that P3 but not P4 cells might be implicated in the shift of Th17 cells towards Th17/Th1 profile. Although it would be very valuable to increase the number of experiments that compare P3 and P4 as well as P3/b and P4/b functionalities, the frequencies of these rare M ϕ -like cells (P4 and P4/b), and thus their yield, are very low in inflamed mucosa, precluding their purification in sufficient numbers from fresh biopsies to perform co-cultures experiments. Furthermore, surgical samples from CD patients heavily treated (multiple therapeutic failure) results in low cell recovery. Nonetheless, P4 cells that morphologically and molecularly resemble M ϕ , did not accumulate or correlate with SES-CD, and were superior to inflammatory monocyte-like P3 cells in their propensity to express TNF- α and IL-10 in inflamed CD mucosa. Thus, P4 cells most likely do not drive intestinal memory Th17 responses corroborating M ϕ function in tumor ascites (Segura et al., 2013).

IL-17 is secreted by intestinal Th17 cells as well as $\gamma\delta$ T cells, both of which participate in mucosal homeostasis (Stockinger and Omenetti, 2017). In that regard, the administration of anti-IL-17 mAb exacerbates colitis in mice (Maxwell et al., 2015) and humans (Hueber et al., 2012). However, IL-17/IFN- γ -secreting CD4⁺ T cells have been described as the pathogenic Th cell subset in the gut of IBD patients (Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014). Th17/Th1 and Th1 cells appear to predominate over Th17 cells in inflamed colon of CD patients, suggesting the plasticity of Th17 cell lineage. P3 cells and IL-1 β not only increased the frequency of IL-17/IFN- γ -secreting cells in colonic CD4⁺T cells, but also promoted their pathogenic signature as shown by increased GM-CSF, TNF- α and IL-6 secretion in memory CD4⁺T cells. In that regard, IL-6 is known to enhance pathogenic T cells survival and promote the development of colonic carcinoma (Punkenburg et al., 2015), which is one of the long-term devastating complications associated with IBD.

Remarkably, unsupervised scRNAseq analysis that capture the entire HLADR⁺SIRP α ⁺ MNP population succeeded in providing finer cellular classification, with unbiased defined single cells clusters being significantly enriched for cells that were isolated according to the pre-defined gating strategy that used presence or absence of CD64, CD14, and CD163 expression. This analysis indicates that P3 and P4 cells, the two extreme subpopulations in CD163 expression spectrum within CD14⁺CD64^{hi} cells that omit the CD163^{dim} (Px), are both transcriptionally and functionally distinct. Interesting biology can be inferred from the discriminating genes for each cell cluster identified by scRNAseq. For example, markers for cluster E (significantly enriched for P3 cells) include *TREMI*, which is a member of the “Triggering Receptors Expressed on Myeloid cells” family, and *FCAR* reported to be highly expressed by unfractionated CD14⁺ MNPs and recently suggested to contribute to IBD pathogenesis (Brynjolfsson et al., 2016;

Kokten et al., 2017; Schenk et al., 2007). *FPRI*, also expressed by cluster E cells, was shown as a player involved in colorectal cancer tumor cell invasion, being also expressed in colorectal epitheliums and tumor infiltrating MNPs (Li et al., 2017b). A recent integrative genomic approach identifies macrophage gene expression as a common signature, which includes *FPRI* among key regulators in IBD (Peters et al., 2017). Cluster F (significantly enriched for P4 cells) classifiers included candidates previously reported to be associated with mature and/or regulatory tissue M ϕ (e.g., *CD209/DC-SIGN*, *MRC1/CD206*, *CD163*, *CD163L1*, and *STAB1*) (Gonzalez-Dominguez et al., 2015; Murray et al., 2014); members of the complement system (e.g. *C2*, *CIQA*, *CIQB*, and *CIQC*) that may play a role in cellular cross-talk and polarization of MNPs; *MERTK* and *Nr1h3/LXR α* , which is expressed on M ϕ and involved with clearance of apoptotic cells (Jakubzick et al., 2017; N et al., 2017) as well as *IDH1*, *FOLR2*, *DNASE2*, *SLCOB21*, *DAB2* and *VSIG4*, expressed by tissue inflammatory M ϕ and *in vitro* generated (M-CSF) M ϕ (Goudot et al., 2017). Furthermore, a more thorough analysis of scRNAseq data of the three patients allowed identification of four additional clusters beside clusters E and F in HLADR⁺SIRP α ⁺ MNPs. Cluster A, B, C were characterized by pDCs (cluster A) and conventional DCs (cluster B and C). Gene expression down-regulation of several members of the UPS distinctively observed in cluster D cells may highlight the presence of non-reactive anergic macrophage phenotype, which has previously been reported in IBD (Hetzenecker et al., 2012). Noteworthy, cross-presenting DCs (cDC1) were not identified as a separate cluster since these cells are HLADR⁺SIRP α ⁻ MNPs and obviously excluded from the captured population that was analyzed.

Importantly, the gating strategy used to initially isolate the P3 and P4 populations for functional studies excluded P1 intermediate as well as Px transitioning cells, which did not accumulate in

the inflamed CD colon. P3 and P4 cell subsets are closely related and, analogous to monocyte-derived cells in mice and humans (Bain et al., 2013; Bujko et al., 2018), could represent two distinct functional phenotypes of a single population displaying a high degree of plasticity, with pro-inflammatory P3 converting towards P_x transitioning cells, and then finally towards more anti-inflammatory P4 M ϕ -like cells. In the context of IBD, inflammation might slow down this maturation process, resulting in the accumulation of pro-inflammatory P3 cells in lesional sites. This hypothesis is currently being investigated, and out of the scope of the present study. Therefore, isolation of cells from each extreme of the spectrum defined by CD163 antigen intensity contributed to studying more “pure” sorted population and ultimately highlighted distinct roles of P3 and P4 cells. Remarkably, this molecular analysis identified novel classifiers beyond CD163 that enabled prospective isolation of TREM-1⁺MERTK⁻CD209⁻ (P3/b), displaying similar functional characteristics to P3 cells.

Based on their phenotype and morphology, the P3 cells (TREM-1⁺CD89⁺CD163⁻CD209⁻CD206⁻MERTK⁻) resemble M ϕ 1 (CD14⁺CD64⁺CD163^{dim}CD206⁻CD209^{dim}MERTK^{dim}), while P4 cells are comparable to M ϕ 4 (CD14⁺CD64⁺CD163^{high}CD206⁺CD209^{high}MERTK^{high}) subset, which are detected in healthy jejunum of patients with pancreatic cancer (Bujko et al., 2018), or to HLADR^{high}CD14⁺CD163^{high}CD209^{high} cells in non-inflamed ileum of CD patients (Bain et al., 2013). However, neither M ϕ 1 nor M ϕ 4 in healthy human mucosa display the transcriptomic signature of P3 or P4 cells found here in inflamed CD colon (Bujko et al., 2018). Interestingly, the human monocyte-like P3 and M ϕ -like P4 cells characterized in the present study shared common genes with murine colonic P1 (*TREMI*) and P4 (*MERTK*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*) CD11b⁺CD64⁺ cells respectively (Schridde et al., 2017).

Taken together, the functional snapshot analysis of HLADR⁺SIRPα⁺ subpopulations in the colonic mucosa over a large cohort of CD patients yielded consistent results, regardless of the genetic background, age, gender and disease states of our cohort, which included patients who were refractory to conventional anti-TNF-α or anti-IL-12p40 therapy. This highlights the broader biological relevance of our observations and the potential contribution of one particular mucosal HLADR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64^{hi} subpopulation (i.e. the TREM-1⁺CD209⁻MERTK⁻CD163⁻ (P3) cells), also identified by its molecular signature, to gut inflammation. Furthermore, we reproducibly showed the effect of P3 cells in promoting intestinal pathogenic Th17 cell profile. Based on our findings, we propose that impairing the accumulation and/or function of pathogenic CD14⁺CD64^{hi}CD163⁻ cells might attenuate ongoing colonic inflammation that have escaped TNF-α and/or IL-23 control, and thus might open avenues for novel therapeutic approaches in CD.

A.6. MATERIALS AND METHODS

Human clinical samples

All participants (n=186) signed informed consent forms that have been approved by the Institutional Ethics Research Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and the Broad Institute of MIT and Harvard. Non-inflamed and inflamed colonic tissues (from the same patient) and mesenteric lymph nodes (MLNs) were obtained from endoscopic biopsies or surgical resections. Five biopsies from non-inflamed and 5 biopsies from inflamed regions of the same patient were collected for staining, except for figure 1E (n=2 biopsies); 10 biopsies were collected from inflamed region for co-culture experiments and scRNA-sequencing. Clinical information of all patients included in Figures 1 to 9 and supplementary figures are shown in Table S4.

Cell isolation and flow cytometry

The colonic mucosa was first processed by enzymatic digestion with DNase I (Roche) and Collagenase D (Roche) followed by mechanical digestion with gentle MACS (Miltenyi Biotec) to isolate lamina propria mononuclear cells (LPMC). Mesenteric lymph nodes (MLNs) were digested mechanically to obtain cellular suspensions (Baba et al., 2013).

Ex vivo isolated LPMC cell suspension were immediately stained for surface markers, then fixed, permeabilized and stained for intracytoplasmic cytokines expression using mAb listed in Table S5. FACS Aria II cell sorter was used for sorting MNP and T cell populations in inflamed CD colon or MLNs. For single cell RNA sequencing (scRNAseq) analysis, single cells were sorted into 96-well full-skirted Eppendorf plates chilled to 4°C, pre-prepared with lysis buffer consisting of 10 µl of TCL buffer (Qiagen) supplemented with 1% β-mercaptoethanol. Single-

cell lysates were sealed, vortexed, spun down at 300 g at 4°C for 1 min, immediately placed on dry ice, and transferred for storage at -80°C.

MNPs and CD4⁺ T cells co-cultures

CD4⁺ T cells (20 to 30 x10³) or CCR6⁺CXCR3⁻CD62L^{low}CD4⁺ effector memory T cells (T_{EM}) (50 x10³) isolated from inflamed CD colon or MLNs were stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 coated beads (Miltenyi Biotec) or soluble anti-CD3 (1µg/ml; Biolegend) respectively, with no expansion in IL-2, and cultured: a) with or without IL-1β (10ng/ml; Peprotech), IL-12 (10ng/ml; Peprotech) or IL-23 (10ng/ml; R&D systems) for 6 days; b) with or without autologous MNP subsets isolated from inflamed colonic mucosa at a 10:1 ratio for 6 days, in the presence of PGN (10µg/ml; Sigma Aldrich) and IgG1 (10µg/ml; Biolegend). Anti-IL-1β receptor (10µg/ml) or anti-IL-12p40 (10µg/ml) mAbs was added to some co-cultures. For all cultures: a) RPMI 1640 medium with 10% fetal calf serum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin was used; b) for intracytoplasmic staining, cells were re-stimulated after 6 days, with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (5ng/ml; Sigma-Aldrich) and ionomycin (500ng/ml; Calbiochem-Behring) for 6 hours in the presence of brefeldin A (1µg/ml; Calbiochem-Behring) for the last 3 hours, then stained with CD3, fixed then permabilized for intracytoplasmic cytokine staining (IL-17, IFN-γ, IL-6, TNF-α) using mAb listed in Table S5.

Multiplex ELISA

IL-17, IFN-γ, IL-6, TNF-α, GM-CSF quantities were measured by multiplex assay (Eve Technologies, Calgary, AB, Canada) in the co-culture supernatants.

Single cell RNA-sequencing - Raw data samples and processing

The 414 sequenced cells consisted of 115 P1, 79 P2, 77 P4, 78 P3, and 65 Px samples (as depicted in Figure 6A) from three patients, with 56 cells from patient x, 128 cells from patient y, and 230 cells from patient z (Figure 6C). The raw sequencing reads were demultiplexed with standard bcl2fastq2 Illumina software (version 2.17.1.14) and aligned to the UCSC hg19 transcriptome with bowtie (version 0.12.7)(Langmead et al., 2009). RSEM (version 1.2.1) was used to quantify gene expression level in transcripts per million (TPM)(Li and Dewey, 2011) and these expression data were log-transformed ($\log_2(\text{TPM}+1)$) before further analysis.

Single-cell expression data analyses were performed with the Seurat R package (version 1.4.0.5) following the strategy described in Villani et al, 2017(Villani and Satija, 2017). The data was visualized in two dimensions by running t-distributed stochastic neighbor embedding (*t*-SNE) on the cell loadings for the first nine principle components. Heatmaps were used to visualize scaled (z-score) gene expression level ($\log_2(\text{TPM}+1)$) of identified markers.

Statistical analysis

Except for scRNAseq data, statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Wilcoxon signed rank test (represented by *) and Mann Whitney test (represented by §) were used. Threshold for significance was adjusted when indicated to account for test multiplicity. Friedman test and Kruskal-Wallis test were employed followed by Dunn's test (represented by #). Repeated measure Anova was employed followed by Bonferroni test (represented by □). For all tests, 1 symbol means $P<0.05$; 2 symbols mean $P<0.01$; 3 symbols mean $P<0.001$. Bar graph data are shown as mean \pm s.e.m. unless otherwise stated. Spearman test was used to assess correlation.

B. IL-12 AND MUCOSAL CD14⁺ MONOCYTES-LIKE CELLS INDUCE IL-8 IN COLONIC MEMORY CD14⁺ T CELLS OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS BUT NOT CROHN'S DISEASE

Laurence Chapuy^{#1}, Marwa Bsat^{#1}, Manuel Rubio¹, Sisi Sarkizova^{2, 3}, Amélie Therrien^{1,4}, Mickael Bouin⁴, Katarzina Orlicka⁴, Audrey Weber⁴, Geneviève Soucy⁴, Alexandra-Chloé Villani^{3,5} and Marika Sarfati^{1*}

¹Immunoregulation Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

²Department of Biomedical Informatics, Harvard Medical School, Boston, MA, USA.

³Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA.

⁴Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

⁵Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

Equal contributors

Published in Journal of Crohn and Colitis, 2019 Jun 15. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz115

B.1. ABSTRACT

CD14⁺ mononuclear phagocytes (MNPs), neutrophils and T cells infiltrate colon in ulcerative colitis (UC). How CD14⁺MNPs shape colonic effector T cell profile remains unclear. Among CD14⁺CD64⁺MNPs, only the pro-inflammatory cytokine-producing CD163⁻ subpopulation accumulated in inflamed UC colon and promoted mucosal IL-1 β -dependent Th17, Th17/Th1 and Th17/Th22 responses. Unsupervised phenotypic analysis of CD14⁺CD64⁺MNPs using FlowSOM algorithm segregated CD163⁻ monocyte-like cells and CD163⁺ macrophages. Unexpectedly, IL-12, IL-1 β and CD163⁻ cells induced the neutrophil-attracting chemokine IL-8 in colonic CD4⁺T cells, which co-expressed IFN- γ and/or IL-17 in UC but not Crohn's disease. The CD163⁻ cells increased the frequency of IL-8⁺IL-17^{+/-}IFN- γ ^{+/-} T cells through IL-1 β and IL-12. Finally, mucosal IL-8⁺ T cells expressed a pathogenic IL-8 profile *ex vivo*, this was promoted

by IL-12 in the mucosa and mesenteric lymph nodes. Collectively, our findings established a link between monocyte-like CD163⁺MNPs, IL-12, IL-1 β and the detection of colonic memory IL-8-producing CD4⁺ T cells, which might all contribute to UC pathogenesis.

B.2. INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is a chronic inflammatory disease of the colon. Epithelial cells, the mucus they produce, the microbiota as well as innate and adaptive immune cells, all contribute to the pathophysiology of the disease. Treatment impairing T cell recruitment to the colonic mucosa advocates for T cells as key players in UC (Feagan et al., 2013). In that regard, UC was first considered a Th2 disease since elevated levels of IL-5 and IL-13 were detected in the colonic mucosa of patients (Christophi et al., 2012; Fuss et al., 2004; Heller et al., 2005). Nonetheless, the view that UC is a type 2 disease distinct from Th1-associated Crohn's disease (CD) - the other common form of inflammatory bowel diseases (IBD) (Neurath et al., 2002a)- has been challenged in the last few years. Firstly, some studies did not note the increased IL-5 and IL-13 expression in the mucosa of UC patients (Biancheri et al., 2014), while others proposed a protective role for IL-13 in pediatric patients with UC (Rosen et al., 2017). Also, two anti-IL-13 monoclonal antibodies failed in improving the outcome of UC patients (Danese et al., 2015; Reinisch et al., 2015). Secondly, the discovery of Th17 brought new insights into the pathophysiology of UC. IL-17 mRNA is enhanced in biopsies from UC mucosa when compared to normal controls (Bogaert et al., 2010; Kobayashi et al., 2008) and IL-17 secretion is augmented in the culture supernatant (CSN) of stimulated lamina propria mononuclear cells (LPMC) of UC patients (Rovedatti et al., 2009). Also, increased numbers of IL-17-secreting CD4⁺T cells are observed in UC mucosa (Globig et al., 2014; Kryczek et al., 2011b; Li et al.,

2016; Rovedatti et al., 2009). Importantly, the role of IFN- γ -producing CD4⁺T cells deserves further attention in UC. IFN- γ mRNA levels are higher in biopsies from UC than control patients (Christophi et al., 2012; Granlund et al., 2013) and IL-17⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ T cells are enriched in inflamed mucosa of patients with UC (Globig et al., 2014; Rovedatti et al., 2009). However, Th17 cell fate towards Th17/Th1 profile is much less studied in UC than CD. In inflamed CD mucosa, IFN- γ mRNA is increased (Christophi et al., 2012; Granlund et al., 2013) and IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Th17/Th1) T cells that accumulate (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014) arise from plastic Th17 cells and participate to the mucosal inflammatory process (Ramesh et al., 2014). The cytokines that drive the shift from Th17 towards Th17/Th1 cells have been described in CD. CD161⁺CD4⁺ T cells isolated from patients with CD express IL-23R, and produce IL-17 and IFN- γ under IL-23 stimulation (Kleinschek et al., 2009). Moreover, Ramesh et al showed that IL-23 increased the percentage of IFN- γ ⁺IL-17⁺CD4⁺ T cells, particularly in MDR1⁺IL-23R⁺ Th17/Th1 population isolated from the blood of healthy donors (Ramesh et al., 2014). Recombinant IL-12, that shares a common IL-12p40 chain with IL-23, increases IFN- γ expression while decreasing IL-17 in Th17 clones isolated from the mucosa of patients with CD (Annunziato et al., 2007). Although IL-12 augments IFN- γ secretion in the CSN of CD3 and CD28-stimulated LPMC from CD and UC patients (Kobayashi et al., 2008), the regulation of mucosal Th17, Th17/Th1 and Th1 responses remain to be fully investigated in UC.

IL-23, IL-12 and IL-1 β are pro-inflammatory cytokines, which are produced by mononuclear phagocytes (MNPs). Currently, MNPs are classified as dendritic cells (DCs), macrophages (M ϕ), inflammatory monocytes and/or monocyte-derived cells (Guilliams and van de Laar, 2015). In the mucosa of patients with UC, a population expressing the monocyte marker CD14 has been

reported (Kamada et al., 2008); they are considered as M ϕ or monocyte-derived cells (Baba et al., 2013; Thiesen et al., 2014). Also, Magnusson et al. described the accumulation of a HLADR^{dim}CD64⁺ subset in the inflamed mucosa of UC patients compared to normal controls (Magnusson et al., 2016). These mucosal MNPs express CD14, secrete the pro-inflammatory cytokines TNF- α , IL-23, IL-1 β and IL-6 and drive naïve T cell polarization towards Th17 and Th1 phenotypes (Kamada et al., 2009; Kamada et al., 2008). Nonetheless, the impact of mucosal CD14⁺ MNPs on effector memory CD4⁺T cell response remains to be investigated in UC.

IL-8 is a chemokine, expressed by a variety of cells in the gut mucosa, notably monocytes, M ϕ , endothelial and epithelial cells, fibroblast as well as neutrophils (Beck et al., 2016). A few reports have shown that circulating T cells isolated from healthy adults and cord blood secrete IL-8 (Gibbons et al., 2014), (Akhade and Qadri, 2015; Gasch et al., 2014). IL-8 itself might induce IL-8 in human CD4⁺ T cells (Gesser et al., 1995). This cytokine attracts neutrophils that are key players in UC pathogenesis (Bennike et al., 2015), (Mitsuyama et al., 1994), (Beck et al., 2016). In the present study, we examined whether and how the CD14⁺ MNPs that infiltrate the mucosa of patients with UC and produce IL-1 β , IL-12 and IL-23, control autologous colonic Th17, Th17/Th1 and Th1 responses. Unexpectedly, our data further revealed that the pro-inflammatory CD14⁺ monocyte-like subpopulation, that did not express CD163 and accumulated in inflamed colonic UC mucosa, augmented IL-8 expression in colonic CD4⁺ T cells, an effect that was partly mediated by IL-1 β and IL-12 produced by these cells. Accordingly, we further reported that recombinant IL-1 β but not IL-23 stimulated primary mucosal CD4⁺ T cells to produce IL-8 while IL-12 promoted a IL-8 pathogenic Th profile.

B.3. RESULTS

B.3.1. IL-1B PROMOTES TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES IN CD4⁺T CELLS ISOLATED FROM INFLAMED COLON OF UC PATIENTS.

IL-23 and IL-12, two cytokines sharing IL-12p40 chain, are key cytokines in Th17/Th1-associated CD pathogenesis (Annunziato et al., 2007; Kleinschek et al., 2009; Ramesh et al., 2014). Here, we first evaluated how IL-23 and IL-12 regulated the Th17, Th17/Th1 and Th1 profile of CD4⁺T cells isolated from the inflamed colon of UC patients. As expected, IL-12 augmented the frequency of single IFN- γ -producing CD4⁺T cells (Th1) ($p < 0.002$) and decreased the frequency of single IL-17-producing CD4⁺T cells (Th17) ($p < 0.006$). However, the percentages of Th17 and double IL-17/IFN- γ -producing CD4⁺T cells (Th17/Th1) were not modulated by IL-23 (Figure 1). It has been reported that IL-1 β regulated human pathogen-specific Th17 cells (Zielinski et al., 2012). Our data further showed that IL-1 β significantly increased Th17 ($p < 0.0002$) and Th17/Th1 ($p < 0.0002$), but not Th1 responses in all UC patients examined (Figure 1). Thus, IL-1 β , but not IL-23 or IL-12, promoted a Th17 and Th17/Th1 profile in mucosal CD4⁺T cells in UC.

B.3.2. HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁻ CELLS SELECTIVELY ACCUMULATE IN INFLAMED UC MUCOSA.

CD14⁺ MNPs are a cellular source of IL-1 β , IL-12 and IL-23 in inflamed gut mucosa (Kamada et al., 2008). Previous report showed that HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs accumulated in inflamed compared to non-inflamed colonic mucosa of patients with CD (Baba et al., 2013). We here examined whether MNPs with a similar phenotype infiltrated the UC mucosa. The frequencies of HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs were higher in inflamed relative to paired non-inflamed colonic mucosa ($n=31$), as well as to colon of UC patients in remission ($n=8$) and non-IBD control ($n=4$) ($p < 0.0007$, $p < 0.007$, $p < 0.009$, respectively; Figure 2a). In inflamed UC mucosa,

more than 95% of HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs expressed CD14 (Figure 2b). To assess heterogeneity of the HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺ population, these cells were further stratified according to CD64 and CD163 expression. CD163 is a scavenger receptor expressed on human gut Mφ whereas CD64 (the Fc-gamma receptor 1) has been reported to be an inflammatory DC or Mφ marker in chronic inflammatory disorders in humans (Jakubzick et al., 2017; Segura and Amigorena, 2013). With this strategy, CD14⁺CD64⁺ cells were subdivided according to the intensity of CD163 expression (Figure 2c). Data revealed that CD163⁻, but not CD163^{dim} nor CD163⁺, cells accumulated in inflamed when compared to paired non-inflamed UC colon ($p<0.0001$) and were detected in low frequencies in the healed mucosa of UC patients in endoscopic remission and control patients ($p<0.01$ and $p<0.008$ respectively; Figure 2d). In conclusion, the CD163⁻ cells are the predominant HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺ MNP subpopulation that infiltrates inflamed UC mucosa.

B.3.3. HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺ CD163⁻ AND CD163⁺ CELLS EXPRESS IL-1β, IL-12, IL-23 BUT LESS IL-10 RELATIVE TO CD163⁺ CELLS.

Next, we analyzed cytokine expression in colonic CD163⁺ or CD163⁻ subpopulations. The frequencies of IL-1β, IL-12p40 and IL-23-producing cells were augmented in inflamed relative to paired non-inflamed UC mucosa in CD163⁻ ($p<0.008$; $p<0.004$, $p<0.5$) and CD163⁺ cells ($p<0.04$; $p<0.02$, $p<0.03$) (Figure 3a). Furthermore, the amount of pro-inflammatory cytokine expression per cell (MFI) was similar in CD163⁻ and CD163⁺ cells both in non-inflamed and inflamed tissues (Figure 3b). Since colonic CD163⁺ macrophages are known to produce IL-10 (Gonzalez-Dominguez et al., 2015; Ogino et al., 2013), we further examined IL-10 expression in CD163⁻ and CD163⁺ cells (Figure 3c). We showed that, unlike pro-inflammatory cytokine secretion, the amount of IL-10 per cell was higher in CD163⁺ relative to

CD163⁻ cells in inflamed and non-inflamed mucosa ($p<0.002$ and $p<0.005$) while the percentage of IL-10-producing cells was higher in CD163⁺ when compared to CD163⁻ cells in non-inflamed mucosa only ($p<0.04$) (Figure 3c). Overall, both CD163⁻ and CD163⁺ cells produce IL-1 β , IL-12p40 and IL-23. However, considering the relative distribution of these 2 cell subpopulations, with increased proportion of CD163⁻ relative to CD163⁺ cells within CD14⁺CD64⁺ MNPs (Figure 3a, middle panel), the former was the major contributor to pro-inflammatory cytokine production in the inflamed mucosa. In contrast, CD163⁺ cells produce more IL-10 relative to CD163⁻ cells.

B.3.4. MUCOSAL CD163⁻ BUT NOT CD163⁺ MNPs FAVOR AUTOLOGOUS TH17/TH1 AND TH17/TH22 RESPONSES IN AN IL-1 β -DEPENDENT MANNER IN INFLAMED UC PATIENTS.

We next asked whether and how the CD163⁻ and CD163⁺ MNPs from inflamed tissue regulate autologous memory Th17, Th17/Th1 and Th1 responses. To this end, we simultaneously purified CD4⁺ T cells, CD163⁻ and CD163⁺ MNPs from colonic biopsies, thus excluding the intermediate CD163^{dim} cells and co-cultured the cells for 6 days (Figure S1). Remarkably, CD163⁻, but not CD163⁺, MNPs favored the emergence of Th17 ($p<0.0001$) and Th17/Th1 ($p<0.0001$), but not Th1 cells (Figure 4a). We further explored the mechanisms underlying the facilitating activity of colonic CD163⁻ cells on Th17 and Th17/Th1 responses. The frequencies of IL-17⁺IFN- γ ⁻ and IL-17⁺IFN- γ ⁺ T cells were decreased, by adding a monoclonal antibody (mAb) that neutralizes IL-1 β function to the CD163⁻ plus CD4⁺ T cells co-cultures ($p<0.05$ and $p<0.01$, respectively, Figure 4b). However, the Th17 and Th17/Th1 responses were not influenced by anti-IL-12p70 mAb that selectively blocked IL-12 (Figure 4b). Similarly, elevated frequencies of IL-17⁺IL-22⁻ ($p<0.0001$) and IL-17⁺IL-22⁺ ($p<0.002$) cells observed in CD4⁺ T cells co-cultured with CD163⁻ cells, were reduced when neutralizing IL-1 β function ($p<0.05$ and $p<0.01$

respectively; Figure 4c and 4d). These data indicated that only CD163⁻ MNPs promoted a Th17, Th17/Th1 or Th17/Th22 profile in an IL-1 β -dependent manner, corroborating our observations in recombinant IL-1 β -stimulated CD4⁺ T cells cultures (Figure 1).

B.3.5. IL-12 PROMOTES AN IL-8 PATHOGENIC PROFILE IN MUCOSAL CD4⁺ T CELLS IN UC PATIENTS.

Accordingly, we examined whether IL-1 β induced a pathogenic Th17 signature in UC colon. IL-17 production was significantly increased ($p < 0.004$) by IL-1 β , in the culture supernatant of *in vitro* activated colonic CD4⁺ T cells while IL-12, but not IL-23 augmented IFN- γ ($p < 0.004$) (Figure 5a), confirming the data of intracellular IL-17 and IFN- γ expression. However, IL-12 but not IL-1 β increased TNF- α , GM-CSF and IL-6 secretion ($p < 0.04$; $p < 0.004$; $p < 0.02$ respectively), corroborating a potential CD4 T cell pathogenic profile (Figure 5b). By serendipity, the multiplex cytokine assay revealed that mucosal CD4⁺ T cells produced the neutrophil-attractive chemokine IL-8 in response to IL-12 ($p < 0.004$) and IL-1 β ($p < 0.004$) but not IL-23 (Figure 5c). We next verified IL-8 expression at the single cell level using intracytoplasmic staining and observed that both IL-12 and IL-1 β augmented the frequency of IL-8⁺CD4⁺ T cells in UC ($p < 0.002$ and $p < 0.007$ respectively) (Figure 5d). Phenotypic analysis of IL-8⁺CD4⁺ T cells in UC patients showed that the majority of these cells expressed $\alpha 4$, while $\beta 7$ and CD103 expression was barely detectable in all culture conditions (Figure S2a). CCR6, a Th17 associated-surface marker, as well as CD69, a surface marker expressed by activated T cells or tissue resident memory T cells, but not CXCR3 (Th1 surface marker), were expressed on IL-8-producing T cells (Figure S2b). IL-12 significantly decreased the proportion of CCR6 and CD69 positive cells in IL-8⁺CD4⁺ T cells ($n=4$; $p < 0.01$, $p < 0.04$ respectively) while the percentage of IL-8⁺ cells expressing CCR6 augmented in the presence of IL-1 β ($n=4$, $p < 0.04$).

We next examined *ex vivo* IL-8 expression in colonic CD4⁺ T cells using freshly isolated cells from inflamed mucosa (Figure 5e). A significant proportion (40%) of the IL-8-producing cells co-expressed pro-inflammatory cytokines. More precisely, 14% of IL-8⁺ cells co-produced GM-CSF, 20.2% co-produced TNF- α , 8.6% co-produced IL-6, 2.1% co-produced IFN- γ and 4.7% co-produced IL-17. Noteworthy, IL-8 could not be detected in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Figure S3). Taken together, IL-8 expression is augmented by IL-12 and IL-1 β in mucosal CD4⁺ T cells. The detection of IL-8⁺CD4⁺ T cells co-producing GM-CSF, TNF- α , IL-6, IFN- γ or IL-17 *ex vivo* in inflamed UC colon highlights their pathogenic profile and potential biologic relevance *in vivo*.

B.3.6. IL-12 PROMOTES TH8 AND TH8/TH1 WHEREAS IL-1 β FAVORS TH8/TH17 AND TH8/TH17/TH1 RESPONSES IN COLON OF UC PATIENTS.

We further showed that recombinant IL-1 β and IL-12 regulated Th8/Th17, Th8/Th1 and Th8/Th17/Th1 responses. The frequencies of IL-8⁺IL-17⁺ ($p < 0.002$) and IL-8⁺IL-22⁺ CD4⁺ T cells was increased by IL-1 β while IL-12 augmented IL-8⁺IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells ($p < 0.003$) (Figure 6a). More precisely, IL-1 β augmented the proportion IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ (named hereafter Th8/Th17) and IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺ (named hereafter Th8/Th17/Th1) cells ($p < 0.004$ and $p < 0.009$, respectively; Figure 6b), regardless of their IL-22 expression (Figure S4). The frequency of IL-8⁺IFN- γ ⁺IL-17⁻ (named hereafter Th8/Th1) cells was increased by IL-12 ($p < 0.0002$; Figure 6b), irrespective of IL-22 expression (Figure S4). Furthermore, IL-12 increased the frequency of single IL-8⁺IFN- γ ⁻IL-17⁻IL-22⁻CD4⁺ T cells (named hereafter Th8) that was not regulated by IL-1 β ($p < 0.03$; Figure 6c). Taken together, IL-1 β favored Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 whereas IL-12 promoted Th8/Th1 and Th8 responses in UC colon.

B.3.7. IL-12 PROMOTES A TH8 PATHOGENIC PROFILE IN EFFECTOR MEMORY TH17 CELLS IN MESENTERIC LYMPH NODES IN UC PATIENTS.

Since mucosal CD4⁺ T cells emigrate from mesenteric lymph nodes (mLNs) to gut tissue, we also examined the ability of IL-12 and IL-1 β to regulate IL-8 expression in mLNs before their recruitment to colon. Similar to mucosal CD4⁺ T cells, IL-1 β augmented the Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 responses ($p < 0.05$ and $p < 0.05$, respectively), while IL-12 increased Th8/Th1 and Th8/Th17/Th1 responses ($p < 0.03$ and $p < 0.05$, respectively) in mLN CD4⁺ T cells (Figure 7a and 7b). To further examine the contribution of Th17 and Th1 cells to the increased IL-8 production in response to IL-1 β or IL-12, we purified effector memory (CD62L^{low}) CD4⁺ T cells according to CCR6⁺CXCR3⁻ and CCR6⁻CXCR3⁺ expression, which displayed a Th17 T_{EM} and Th1 T_{EM} cytokine profile, respectively (Figure 7a). Only in cultures with Th17 T_{EM}, but not Th1 T_{EM}, was an increase in IL-8 expression observed under the influence of IL-1 β or IL-12 ($p < 0.007$ and $p < 0.008$, respectively) (Figure 7c). Finally, similar to its effect on mucosal CD4⁺ T cells (Figure 5), IL-12 favored a pathogenic IL-8 profile in mLN Th17 T_{EM} as shown by co-expression of pro-inflammatory cytokines ($p < 0.05$; Figure 7d). In conclusion, these data suggest that IL-12 induced a shift of Th17 T_{EM} towards pathogenic Th8/Th1 cells while Th8/Th17 cells were promoted by IL-1 β in mLN.

B.3.8. MUCOSAL CD163⁻, BUT NOT CD163⁺, MNPS AUGMENT IL-8 EXPRESSION IN THE COLONIC CD4⁺ T CELLS OF UC BUT NOT CD PATIENTS.

Finally, we examined the ability of CD163⁻ cells to regulate IL-8 expression. CD163⁻ cells increased the frequency of IL-8-producing CD4⁺ T cells ($p < 0.0009$; Figure 8a). Interestingly, the enhanced IL-8 expression appeared to be restricted to UC since it was not observed in co-cultures of autologous colonic CD163⁻ and CD4⁺ T cells isolated from CD patients (Figure 8a). Notably, no IL-8 expression was detected *ex vivo* in colonic CD4⁺ T cells isolated from CD

patients nor was it increased in co-cultures with autologous colonic CD163⁻ cells or in response to IL-1 β or IL-12 (Figure S5a, S5b and S5c). Furthermore, CD163⁻ but not CD163⁺ cells increased the frequency of IL-8⁺IL-17⁺ and IL-8⁺IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells in UC patients ($p < 0.0004$ and $p < 0.0009$, respectively; Figure 8b). Also, the IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻ (Th8/Th17) ($p < 0.02$), IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Th8/Th17/Th1) ($p < 0.0007$) and IL-8⁺IFN- γ ⁺IL-17⁻ (Th8/Th1) ($p < 0.02$) responses were augmented by CD163⁻ cells (Figure 8c, left panels), independent of the expression of IL-22 (Figure S6a). However, the frequency of single IL-8⁺IFN- γ ⁻IL-17⁻IL-22⁻ CD4⁺ T cells (Th8) was not increased by CD163⁻ cells (Figure S6b). Finally, we explored some of the mechanisms that governed the ability of CD163⁻ cells to increase IL-8 expression in mucosal CD4⁺T cells in UC. When IL-1 β function was neutralized, Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 responses were not augmented by CD163⁻ cells (Figure 8c, right panels). Combined IL-1 β and IL-12 blockade significantly inhibited Th8/Th1 ($p < 0.02$) and Th8/Th17/Th1 responses ($P < 0.009$), which were not reduced by adding anti-IL-12p70 mAb alone (Figure 8c, right panels). Taken collectively, mucosal CD163⁻ MNPs augmented IL-8 expression by colonic CD4⁺ T cells in UC but not CD mucosa, promoting Th8/Th17 and Th8/Th17/Th1 responses through their secretion of IL-1 β and Th8/Th1 responses via IL-1 β and IL-12 production.

B.3.9. UNSUPERVISED MULTI-COLOR FLOW CYTOMETRY ANALYSIS REVEALS THAT CD163⁻ AND CD163⁺ MNPs FORM DISTINCT CLUSTERS RELATED TO MONOCYTE-LIKE AND MACROPHAGE CELL POPULATIONS RESPECTIVELY.

The heterogeneity of CD14⁺CD64⁺ MNPs was further assessed using multi-color FACS analysis (inflamed mucosa of $n=4$ UC patients) and t -distributed stochastic neighbor embedded (t -SNE) analysis, a dimensionality reduction algorithm (Figure 9a). Expression feature t -SNE plots of CD163, CD16, CD206 and CD209 expression identified a cluster, which was distinct from the CD163^{-dim} cluster best defined by CD11b, CCR2 expression and low FSC-cell size.

Noteworthy, feature plot of CLEC5A expression appeared to cluster with a minor fraction of CD11b-expressing cells. To evaluate which markers were driving the CD163⁻ and CD163⁺ cell-specific signature, the flow cytometry data was next analyzed using an unsupervised self-organizing map (FlowSOM) method (Figure 9b, 9c, 9d and 9e). The five clusters identified using FlowSOM were visualized in the *t*-SNE plot of concatenated HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ cells (Figure 9b). Two CD163⁻ clusters were best identified using CD11b and CD206 expression marker with the major one (blue: 47.7%) expressing CD11b at the highest and CD206 at the lowest intensity, and vice versa for the minor one (green: 6%), relative to the other three clusters. The CD163^{dim} clusters were clearly defined as CD209^{dim}CD206^{dim} (purple: 11.1%) or CLEC5A^{bright}TREM⁺ (red: 3.5%) cells. Elevated relative expression of CD14, CD64, MERTK, CD209, CD206 and CD16 but low CD11b expression identified the CD163⁺ cluster (yellow: 31.6%). Heatmap further indicated that CD163⁺ population clustered apart from CD163⁻ and CD163^{dim} populations (Figure 9c). FlowSOM minimal spanning tree clustered CD14⁺CD64⁺ MNPs in different nodes of variable sizes that reflect the number of cells per node, with star charts displaying different intensities of co-expressed surface markers as well as defining relationships between nodes (Figure 9d). This unsupervised data set analysis showed that CD163⁻CD206⁻CD209⁻MERTK⁻CLEC5A⁻TREM^{dim}HLADR^{dim}CD14⁺CD16⁺CCR2⁺CD11b^{bright} cells (blue) represented a major cell population that progressively acquired CD163, MERTK, CD209, CD206 and down-regulated CD11b and CCR2 (yellow). Noteworthy, analysis of a second panel of surface markers that included 3 additional markers (CD169, TIM4 and CD4) and 12 common markers revealed that CD163⁺ cells were further subdivided into CD11b⁻CD169⁺TIM4⁺CD4⁺ and CD11b^{dim}CD169⁻ and TIM4⁻ cells (Figure 9e). The CD14⁺CD64⁺ MNPs were next purified at the extreme end of the spectrum of CD163 expression, according to

the gating strategy that was originally selected to quantify CD163⁻ and CD163⁺ subsets in the UC mucosa in Figure 2d, to assess their morphology (Figure S7). The CD163⁻ cells displayed a kidney shape nucleus while the CD163⁺ cells resembled typical M ϕ with vacuoles and a large cell size, corroborating our multi-color FACS analysis. Collectively, the CD14⁺CD64⁺ MNP subpopulation that accumulates in inflamed UC mucosa is best defined as CD163⁻CD206⁻CD209⁻MERTK⁻CLEC5A⁻TREM^{dim}HLADR^{dim}CCR2⁺CD11b^{bright} monocyte-like pro-inflammatory cells, while the minor CD163⁺ cells are CD209⁺CD206⁺ MERTK⁺ M ϕ .

B.4. FIGURES

Figure 1

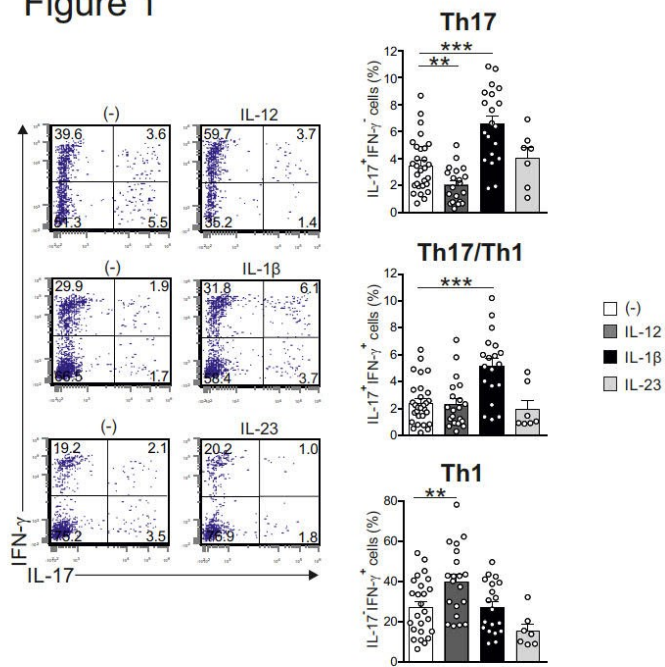


FIGURE B.4.1. IL-1 β INCREASES TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES IN UC PATIENTS

Percentage of mucosal CD4⁺T cells expressing IL-17 and/or IFN- γ after 6 days culture under stimulation with recombinant IL-12 (n=19), IL-1 β (n=18) or IL-23 (n=7). Wilcoxon signed rank test, p<0.01 threshold for significance to account for test multiplicity.

Figure 2

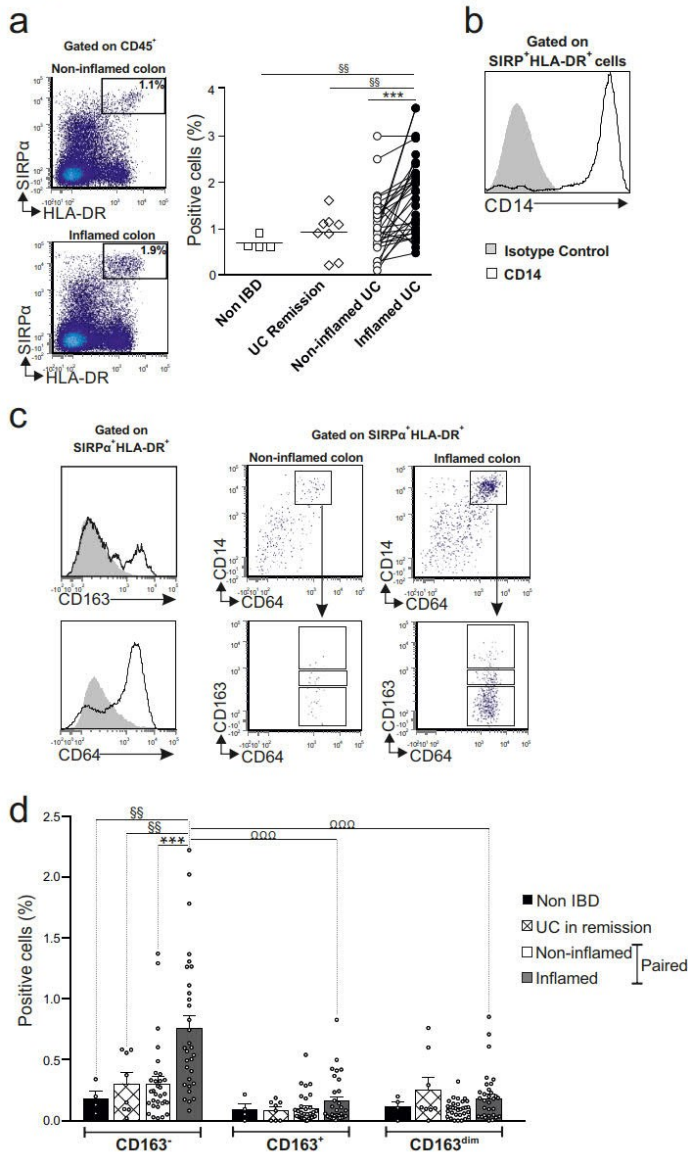


FIGURE B.4.2. HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPS ACCUMULATE IN INFLAMED UC MUCOSA

a) Percentage of HLA-DR⁺SIRPα⁺ cells among CD45⁺ intestinal lamina propria mononuclear cells (LPMC): cell distribution in non-IBD control (n=4), UC in remission (n=8) and paired non-inflamed and inflamed UC patients (n=31). **b**) CD14 expression on HLA-DR⁺SIRPα⁺ cells. **c**) HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺ MNPs subdivided according to CD64 and CD163 expression. **d**) Frequencies of CD163⁻, CD163⁺, CD163^{dim} cells among CD45⁺LPMC in non-IBD control (n=4), UC in remission (n=8), and paired non-inflamed and inflamed UC patients (n=31). **a** and **d**, Wilcoxon signed rank test (*), Mann-Whitney test (§) and Friedman test with Dunn's post test (Ω). p<0.01 threshold for significance to account for test multiplicity.

Figure 3

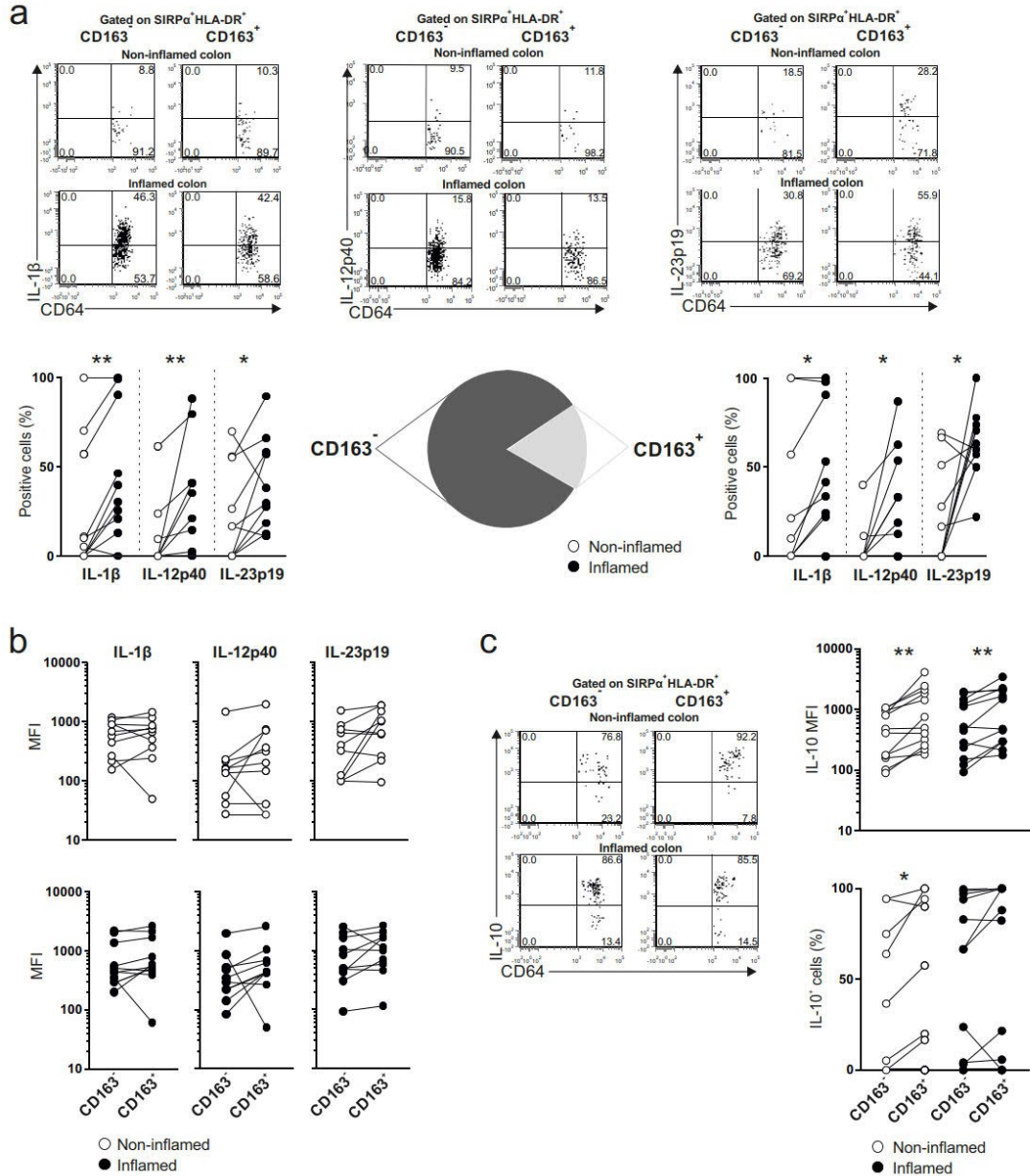


FIGURE B.4.3. HLA-DR⁺SIRPα⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPS PRODUCE IL-1β, IL-12P40 AND IL-23 BUT LESS IL-10 RELATIVE TO CD163⁺ CELLS
a) Frequencies and **b)** MFI of IL-1β (n=10), IL-12p40 (n=10) and IL-23p19 (n=10) producing cells among CD163⁻ and CD163⁺ MNPs in non-inflamed and inflamed UC. Pie displays the relative frequency of CD163⁻ and CD163⁺ cells in inflamed UC mucosa among CD14⁺CD64⁺. **c)** Frequencies and MFI of IL-10 (n=12) producing-cells among CD163⁻ and CD163⁺ MNPs in non-inflamed and inflamed UC mucosa. **a to c,** Wilcoxon signed rank test.

Figure 4

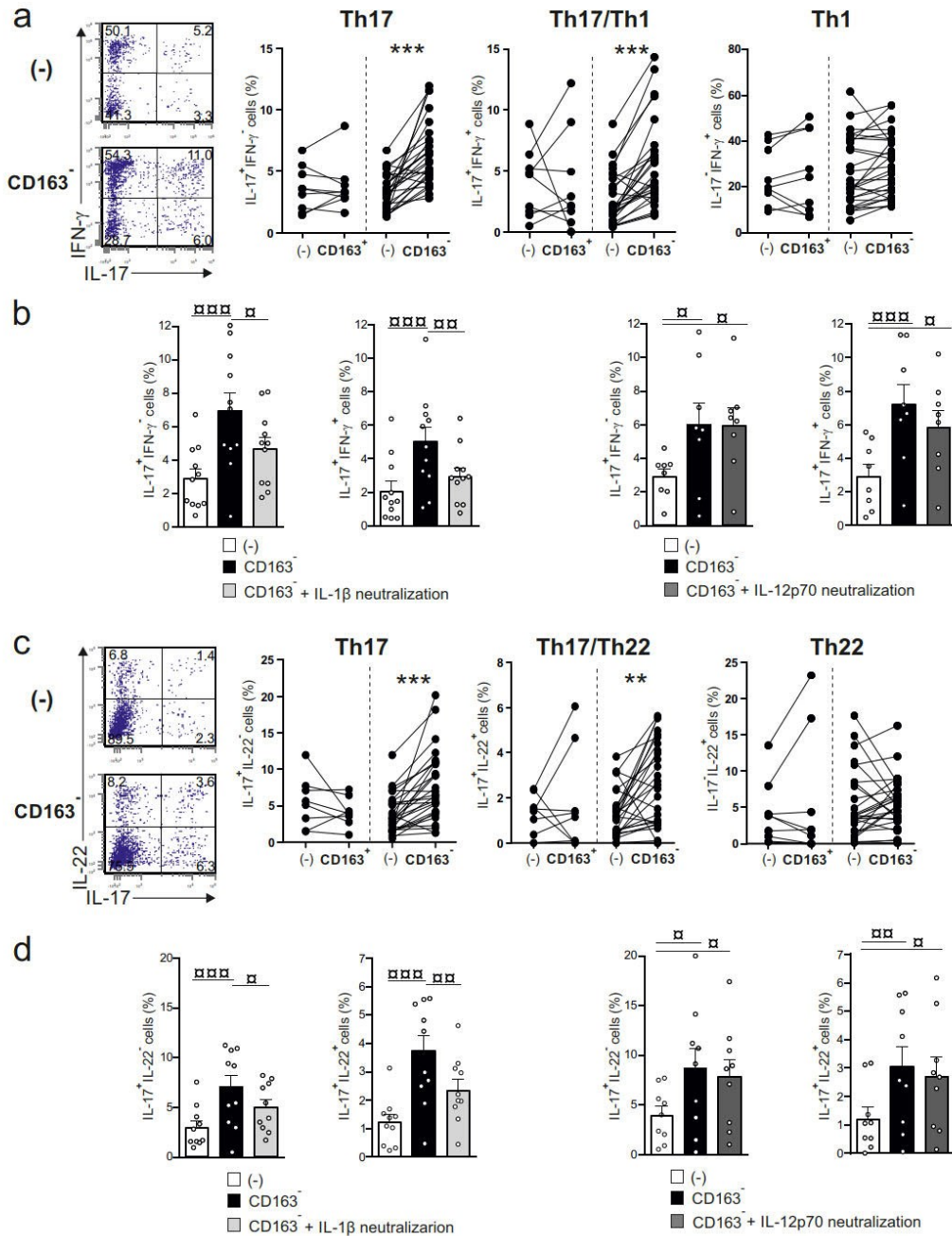


FIGURE B.4.4. CD163⁻ BUT NOT CD163⁺ MNPS PROMOTE TH17, TH17/TH1 AND TH17/TH22 RESPONSES IN AN IL-1 β -DEPENDENT MANNER IN UC PATIENTS

CD4⁺ T cells isolated from inflamed UC colon were co-cultured with or without autologous mucosal CD163⁺ (n=9) or CD163⁻ (n=27) cells, in the absence or presence of α IL-1R (n=6), α IL-1 β (n=5) or α IL-12p70 mAbs (n=8), then stained for intracytoplasmic **a and b**, IL-17/IFN- γ , as well as **c and d**, IL-17/IL-22 expression.

a and c, Wilcoxon signed rank test (*); **b and d**, Repeated measures Anova with Bonferroni's multiple comparison post test (α).

Figure 5

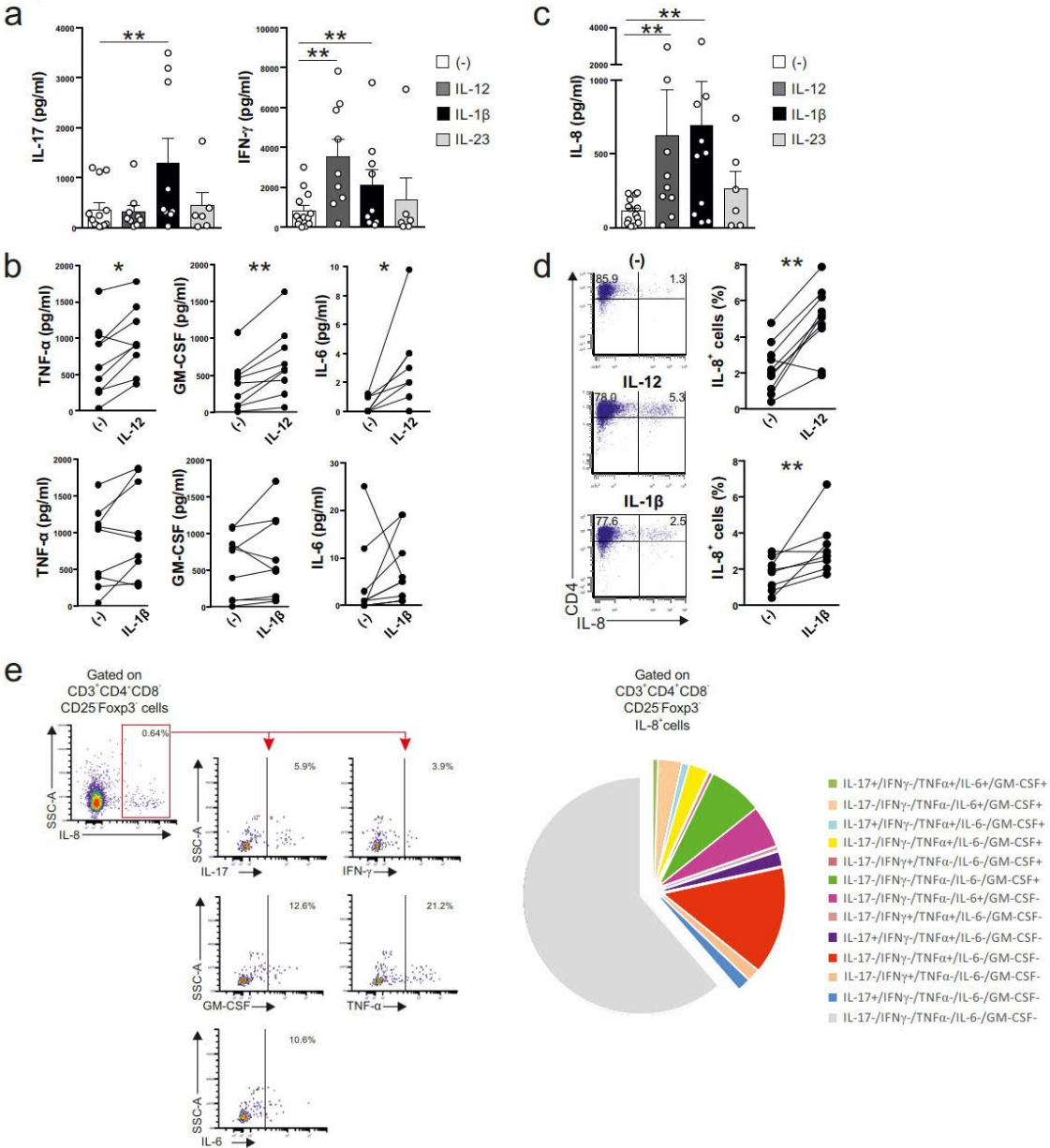


FIGURE B.4.5. IL-1 β AND IL-12 FAVOR IL-8 EXPRESSION IN MUCOSAL CD4⁺ T CELLS IN UC PATIENTS

UC mucosal CD4⁺ T cells were cultured with recombinant IL-12 (n=9), IL-1 β (n=9) or IL-23 (n=4 to 6) for 6 days. **a**) IL-17 and IFN- γ , **b**) TNF- α , GM-CSF, IL-6 and **c**) IL-8 secretion were measured in the culture supernatant. **d**) Percentage of IL-8⁺CD4⁺T cells after culture of UC mucosal CD4⁺T cells with recombinant IL-12 (n=10) and IL-1 β (n=8) for 6 days. **e**) Ex vivo stimulation of LPMC with PMA-ionomycin in the presence of brefeldin A for 4 hours (n=6), **left panel**, Percentage of IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-6 positive cells among CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-8⁺ T cells; **right panel**, Pie chart depicting the co-expression of IL-17, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α and IL-6 in CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-8⁺ T cells. **a** to **d**, Wilcoxon signed rank test; for **a** and **c**, p<0.01 threshold for significance to account for test multiplicity.

Figure 6

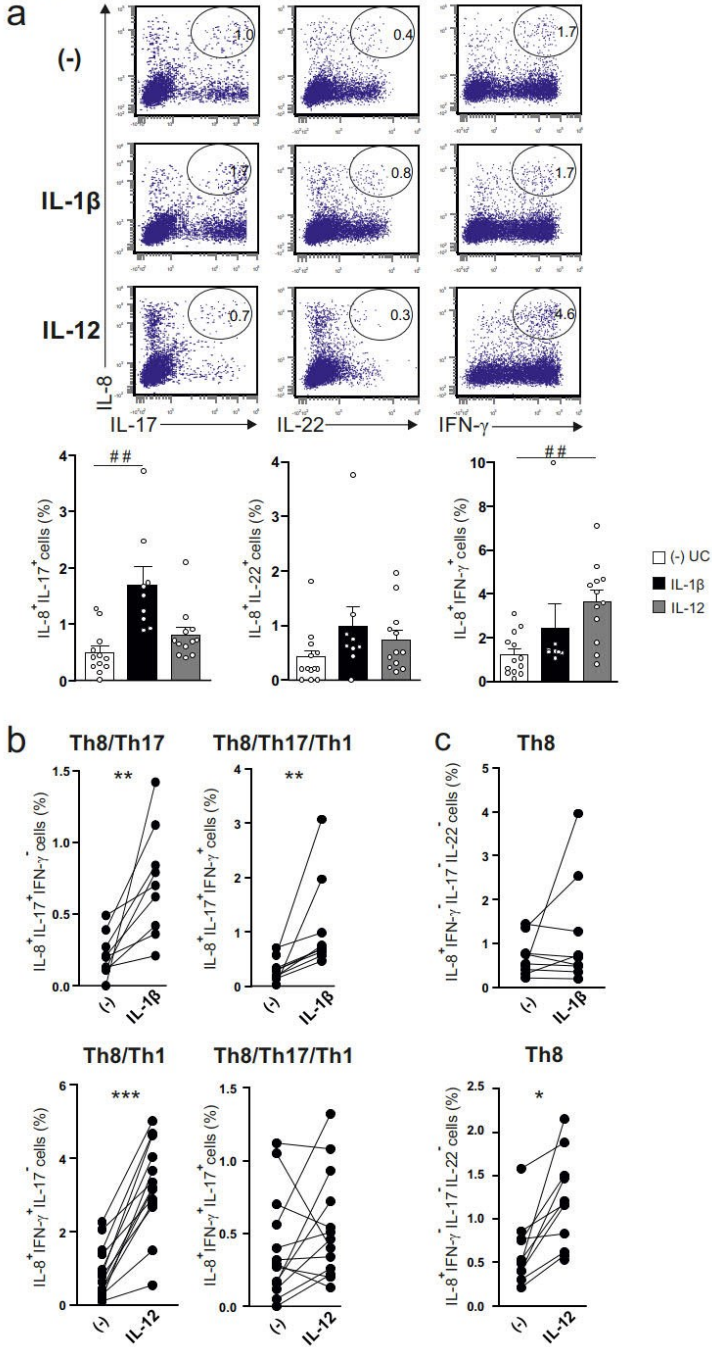


FIGURE B.4.6. IL-1 β FAVORS TH8/TH17 AND TH8/TH17/TH1 WHILE IL-12 PROMOTES TH8 AND TH8/TH1 RESPONSES IN UC PATIENTS

a to c, Percentage of IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺IL-22⁺ T cells after 6 days culture of UC mucosal CD4⁺T cells with recombinant IL-1 β (n=9) or IL-12 (n=12). **a**, Kruskal-Wallis test with Dunn's post test (#); **b and c**, Wilcoxon signed rank test (*).

Figure 7

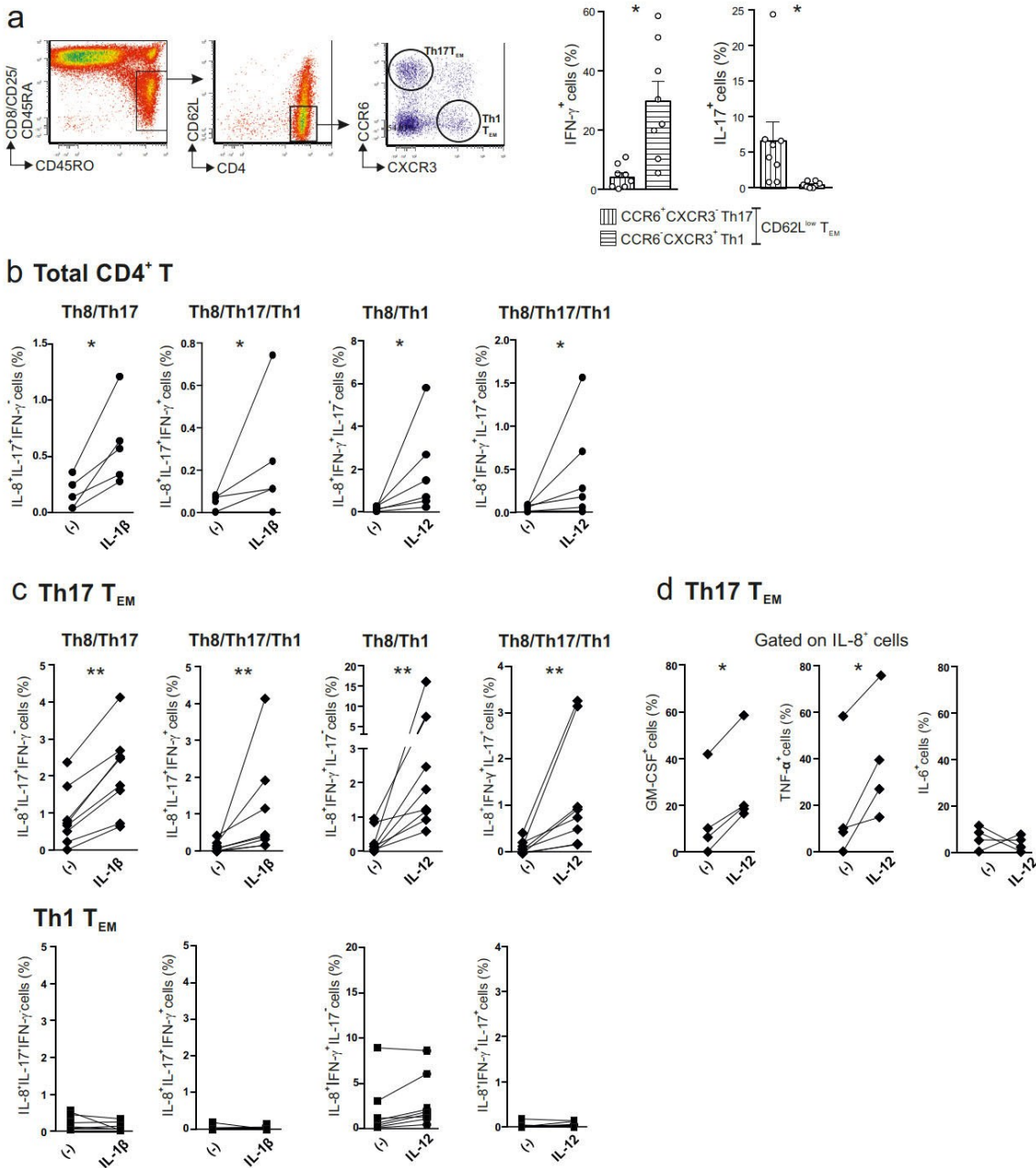


FIGURE B.4.7. IL-1 β AND IL-12 FAVOR IL-8 RESPONSES IN TH17 CELLS ISOLATED FROM MLNs OF UC PATIENTS

a) Gating strategy for sorting CD4⁺ T cells, Th17 T_{EM} (CD62L^{low}CCR6⁺CXCR3⁻) and Th1 T_{EM} (CD62L^{low}CCR6⁻CXCR3⁺) cells from mLNs of UC patients. Ex vivo intracytoplasmic staining for IFN- γ and IL-17 expression after PMA-ionomycin stimulation in the presence of brefeldin A for 4 hours. Wilcoxon signed rank test. **b-c**) Percentage of IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁻ after 6 days culture of **b**) total CD4⁺T cells with recombinant IL-1 β (n=5) or IL-12 (n=6); **c**) Th17 or Th1 T_{EM} with recombinant IL-1 β (n=8) or IL-12 (n=8). **d**) Percentage of GM-CSF⁺, TNF- α ⁺ and IL-6⁺ T cells among IL-8⁺ T cells after 6 days culture of Th17 T_{EM} with recombinant IL-12 (n=4). **a to d**, Wilcoxon signed rank test.

Figure 8

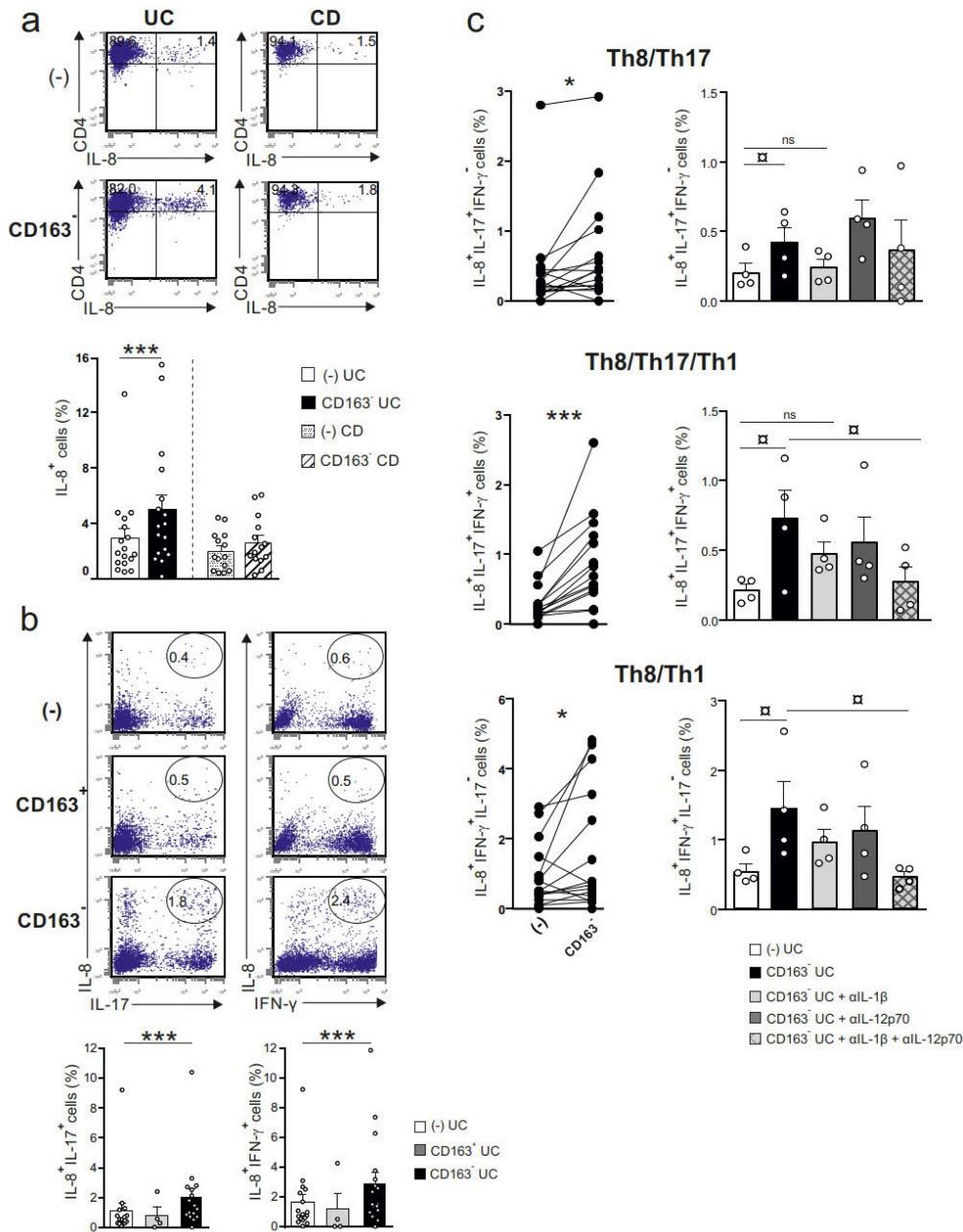


FIGURE B.4.8. CD163⁺ MNPs INCREASE IL-8 EXPRESSION IN COLONIC CD4⁺T CELLS IN UC BUT NOT CD PATIENTS

CD4⁺T cells isolated from inflamed UC or CD colons were co-cultured with or without **a**) autologous mucosal CD163⁻ cells (n=17 UC, n=14 CD) and stained for IL-8 intracytoplasmic expression; **b**) autologous mucosal CD163⁺ (n=4) or CD163⁻ cells (n=17) and stained for IL-8, IL-17 and IFN- γ intracytoplasmic expression; **c**) autologous CD163⁻ cells (n=17), in the absence or presence of α IL-1 β (n=4) and/or α IL-12p70 mAbs (n=4), and stained for IL-8, IL-17 and IFN- γ intracytoplasmic expression. **a, b, c (left panel)**, Wilcoxon signed rank test (*); for b, p<0.01 threshold for significance to account for test multiplicity. **c (right panel)**, Repeated measures Anova with Bonferroni's multiple comparison post test (#).

Figure 9

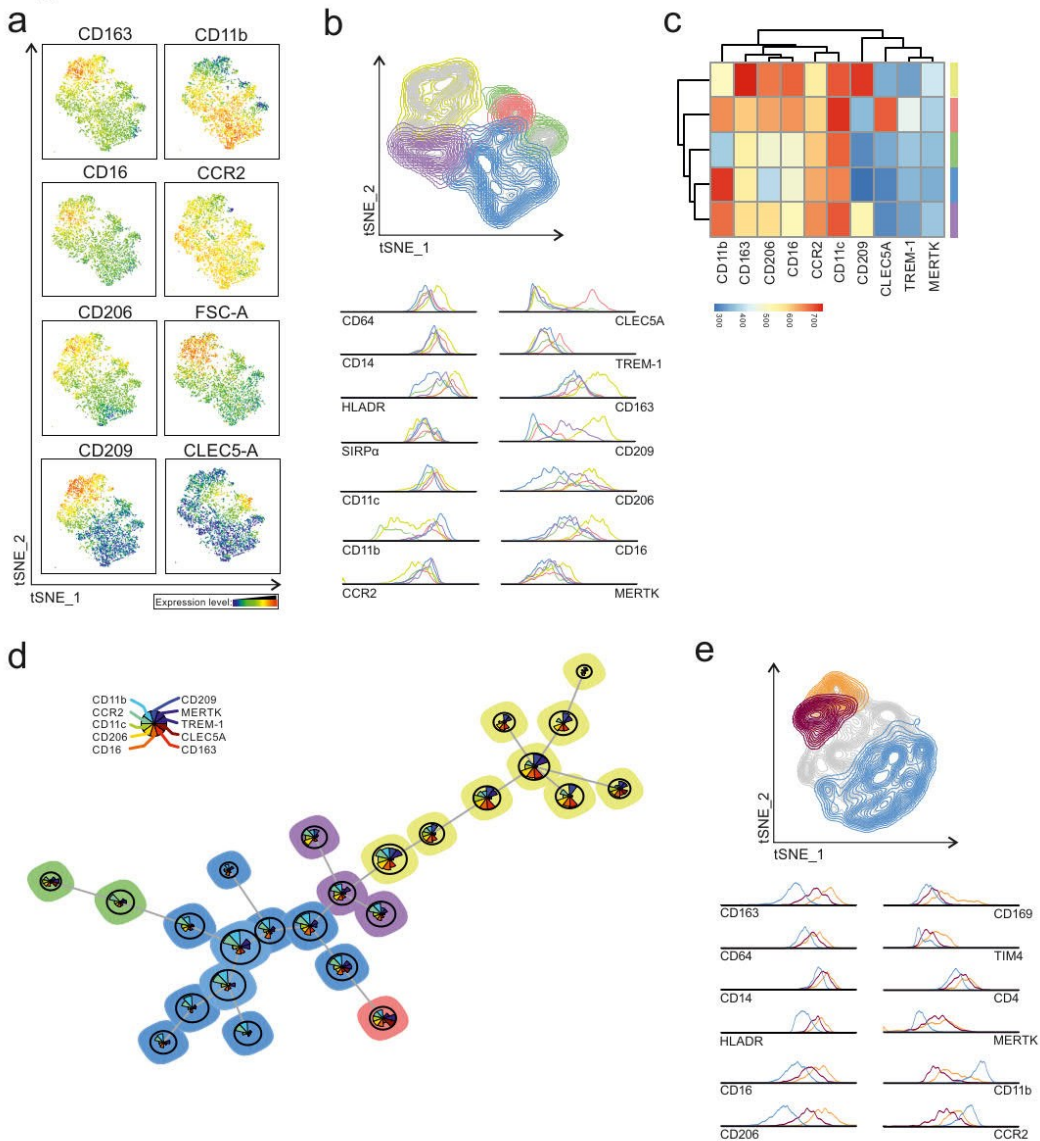


FIGURE B.4.9. UNSUPERVISED ANALYSIS OF THE PHENOTYPE OF HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ MNPs IN INFLAMED UC MUCOSA

LPMC from 4 UC patients were stained with a panel of 15 surface markers. Concatenated file from the 4 patients were subjected to unsupervised clustering analysis. **a**) Expression feature plot of the depicted surface markers in HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ cells, using t-SNE algorithm. **b** to **d**) FlowSOM analysis of HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ cells based on expression data; **b**) affiliation of cells to 5 clusters identified in FlowSOM, indicated by color coding and visualized in t-SNE plot; surface marker expression levels depicted by histograms; **c**) heatmap of mean surface marker expression of the 5 individual clusters; **d**) cells were clustered into 25 nodes and depicted as a minimal spanning tree, with color coding indicating the 5 identified clusters. Circle size are proportional to the number of cells represented in each node and triangle size in star charts depicts the mean intensities of each marker for all cells assigned to the node (color legend on the left). **e**) LPMC from the same 4 UC patients were stained with another panel of 15 surface markers, only differing for CD169, TIM4 and CD4. Concatenated file of HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ cells from the 4 UC patients were subjected to FlowSOM analysis. Affiliation of cells to 3 out of 5 clusters identified in FlowSOM indicated by color coding and visualized in t-SNE plot; surface marker expression levels depicted by histograms.

Figure S1

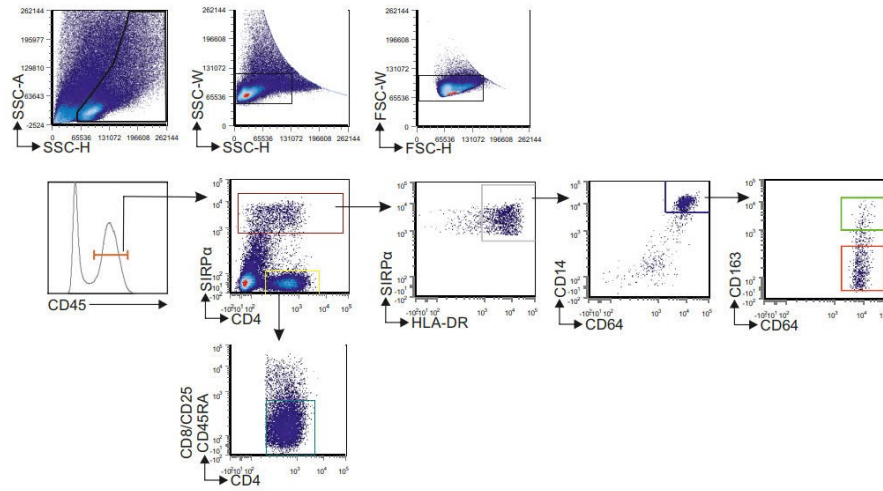


FIGURE B.4.S1. GATING STRATEGY FOR SORTING CD163⁻ AND CD163⁺ MNPS AND CD4⁺ T CELLS IN INFLAMED UC MUCOSA

Figure S2

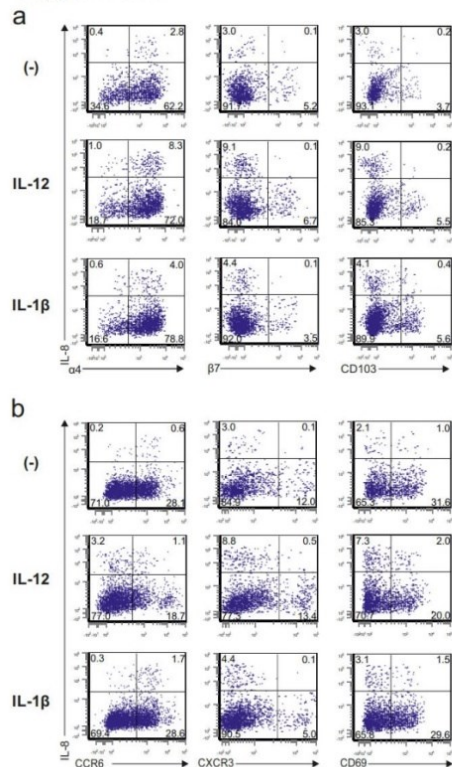


FIGURE B.4.S2. PHENOTYPE OF IL-8-EXPRESSING CD4⁺ T CELLS

Representative dot plots of **a)** IL-8, $\alpha 4$, $\beta 7$, CD103 and **b)** IL-8, CCR6, CXCR3 and CD69 co-expression on UC colonic CD4⁺ T cells after 6 days culture with or without IL-12 or IL-1 β (n=4).

Figure S3

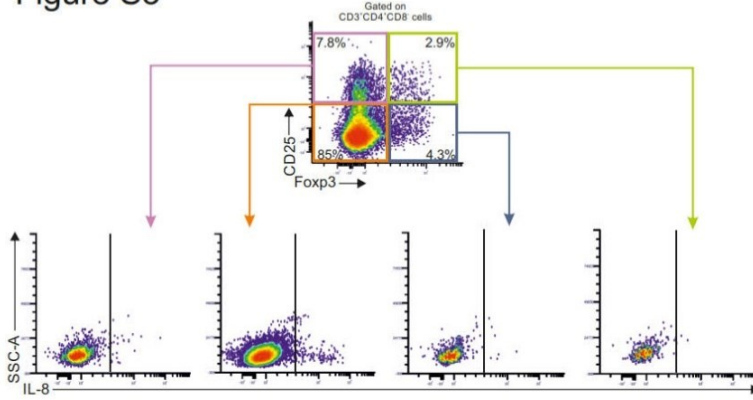


FIGURE B.4.S3. IL-8 EXPRESSION BY COLONIC CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T CELLS

Intra-cytoplasmic IL-8 expression in colonic CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells after stimulation with PMA-ionomycin in the presence of brefeldin A for 4 hours (representative dot plot of 6 UC patients).

FIGURE B.4.S4. IL-1 β AND IL-12 PROMOTES IL-8 EXPRESSION IRRESPECTIVE OF IL-22 EXPRESSION

Percentage of IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺IL-22⁺ T cells after 6 days culture of mucosal CD4⁺T cells from UC patients with recombinant IL-1 β (n=8) or IL-12 (n=11 UC). Wilcoxon signed rank test.

Figure S4

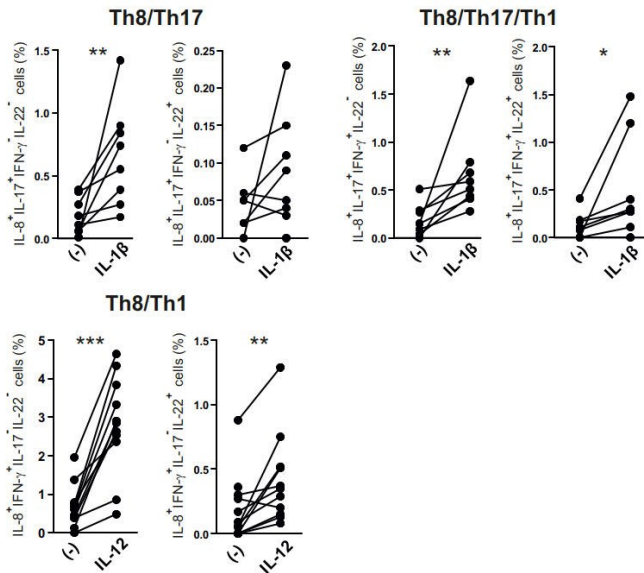


FIGURE B.4S4. IL-1 β AND IL-12 PROMOTES IL-8 EXPRESSION IRRESPECTIVE OF IL-22 EXPRESSION.

Percentage of IL-8⁺IL-17⁺IFN- γ ⁺IL-22⁺ T cells after 6 days culture of mucosal CD4⁺ T cells from UC patients with recombinant IL-1 β (n=8) or IL-12 (n=11 UC). Wilcoxon signed rank test.

Figure S5

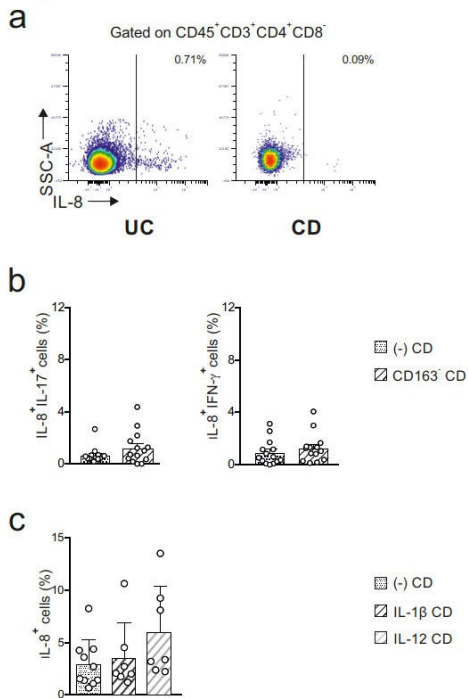


FIGURE B.4.S5. CD163⁻ MNPS DID NOT INCREASE IL-8 EXPRESSION BY CD4⁺ T CELLS IN THE COLON OF CD PATIENTS.

a) LPMC from inflamed UC and CD mucosa were stimulated for 4 hours with PMA-ionomycin in the presence of Brefeldin A, then stained for IL-8 expression. **b)** CD4⁺ T cells and CD163⁻ cells were purified from inflamed CD colon (n=14) according to the gating strategy depicted in figure S2. CD4⁺ T cells and MNPs were co-cultured for 6 days and stained for IL-8, IL-17 and IFN- γ expression. Wilcoxon signed rank test. **c)** CD4⁺ T cells purified from inflamed CD colon were cultured for 6 days with or without IL-1 β (n=7) or IL-12 (n=7) and stained for IL-8 expression. Wilcoxon signed rank test.

Figure S6

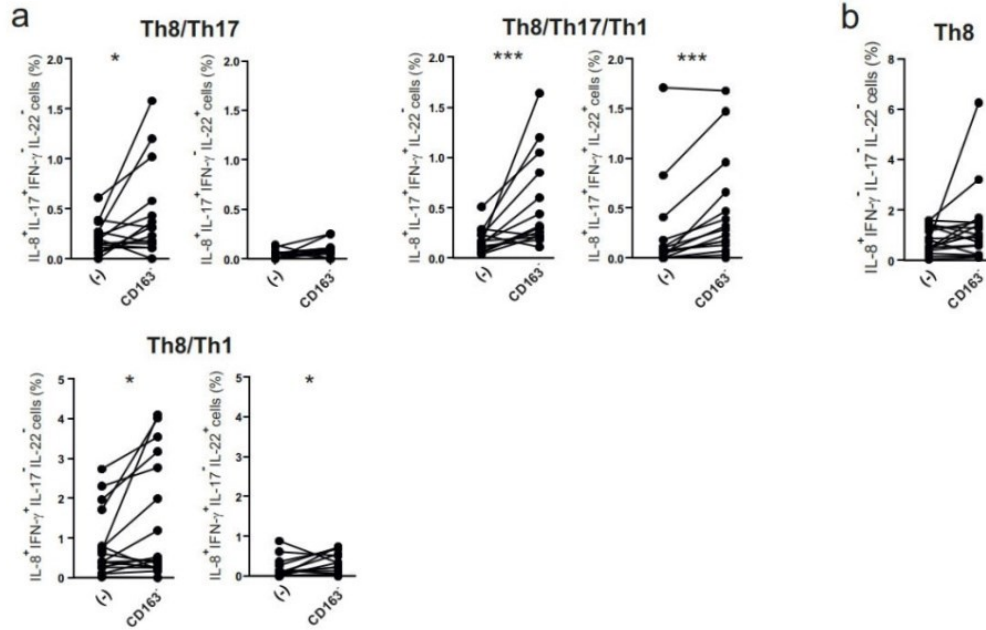


FIGURE B.4.S6. CD163⁺ MNPS INCREASE IL-8 EXPRESSION, IRRESPECTIVE OF IL-22 EXPRESSION, IN UC COLONIC CD4⁺ T CELLS. CD4⁺ T cells isolated from inflamed UC colon were co-cultured with or without CD163⁺ cells (n=17) for 6 days and stained for IL-8, IL-17, IFN- γ , and IL-22 intracytoplasmic expression. Wilcoxon signed rank test.

Figure S7

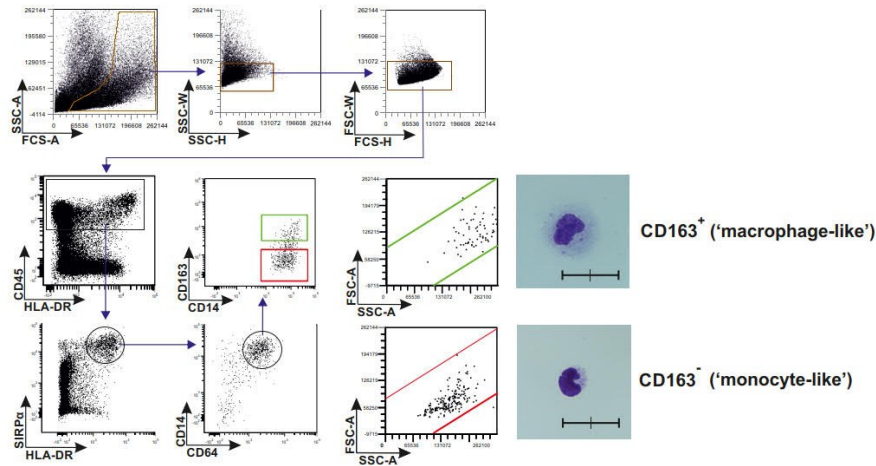


FIGURE B.4.S7. MORPHOLOGY OF CD163⁻ AND CD163⁺ CELLS Gating strategy for sorting CD163⁻ and CD163⁺ cells, cell size and morphology (bar=20 μ m).

B.5. DISCUSSION

The novel and unexpected findings of the present study provided evidence that colonic CD14⁺CD163⁻ monocyte-like cells, the IL-1 β and IL-12p40 they produce, promoted IL-8 expression in autologous memory mucosal CD4 T cells in UC but not CD patients. Notably, IL-8⁺CD4 T cells that co-expressed GM-CSF, TNF- α , IFN γ , IL-6 and IL-17, were detected *ex vivo* in inflamed colon and, after *in vitro* culture of mLN Th17 T_{EM} with IL-12. These observations highlight the concept that tissue IL-8-expressing T cells displaying a pathogenic profile might participate to the development and/or perpetuation of UC. The accumulation of CD14⁺ MNP has been detected in the inflamed mucosa of IBD patients (Kamada et al., 2008),(Baba et al., 2013). Nonetheless, their functional heterogeneity in the context of inflammation remains unclear. We here showed that HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺ cell population, and more precisely CD163⁻, but not CD163^{dim} or CD163⁺, cells accumulated in inflamed UC mucosa while decreasing in healed mucosa of UC patients in remission. Only CD163⁻ cells promoted IL-8 expression together with IL-17 and/or IFN- γ in autologous colonic memory CD4⁺ T cells. In the context of CD163⁻/T cell co-cultures, the augmented Th17, Th17/Th1, Th17/Th22 and Th8/Th17 responses were IL-1 β -dependent, while impairment of Th8/Th1 responses required combined IL-1 β and IL-12 blockade. Accordingly, we showed that recombinant IL-1 β increased Th17, Th17/Th1, Th8/Th22 and Th8/Th17 whereas IL-12 promoted Th8/Th1 in mucosal CD4⁺T cells. In that regard, IL-1 β promotes the survival of Th17 cells in murine IBD (Coccia et al., 2012).

UC shares several genetic, clinical, histological and immunologic features with CD (Ungaro et al., 2017), which are both T cell-mediated diseases (Globig et al., 2014; Li et al., 2016). Nonetheless, these two diseases represent distinct entities (Iboshi et al., 2014) (Christophi et al., 2012; Haberman et al., 2014), as highlighted in our present study. Mucosal UC and CD CD4⁺T

cells displayed differential responses to IL-23, a key player in Th17 pathogenicity in CD. More precisely, we showed that CD4⁺T cells isolated from UC colon did not increase their IL-17 nor IFN- γ secretion in response to IL-23, while we and others reported that IL-23 increased mucosal Th17 and Th17/Th1 responses in CD (Chapuy L, 2018; Ramesh et al., 2014). The absence of IL-23 response in UC could not be attributed to the loss of IL-23 receptor (IL-23R) on the surface of mucosal CD4⁺T cells, since Kobayashi et al demonstrated that colonic CD4⁺T cells express *IL-23R* mRNA in both UC and CD (Kobayashi et al., 2008). Unexpectedly, CD163⁻ cells facilitated IL-8 expression in UC but not CD. IL-8 expression could not be detected *ex vivo* in colonic CD4⁺ T cells, and was not significantly augmented in response to IL-1b or IL-12 in CD patients. Since IL-1 β induces potential pathogenic profile (TNF- α , GM-CSF and IL-6) in colonic CD4⁺ T cells in CD but not UC (Chapuy L, 2018), we therefore propose that distinct IL-8 responses observed between UC and CD likely result from disease-specific differences in T cells rather than a difference intrinsic to CD163⁻ cell function, which warrants further investigation.

MNPs play a critical role in the maintenance of gut homeostasis, orchestrating the dialogue between innate and adaptive immunity (Grainger and Konkel, 2017). Morphology and phenotypic studies of CD163⁻ and CD163⁺ cells attempted to relate the nature of these two functionally distinct CD14⁺CD64⁺ subpopulations to intestinal CD14⁺ MNPs and their murine counterparts previously identified under inflammatory or homeostatic conditions (Bain et al., 2013). Firstly, the human CD163⁻ cells displayed a monocyte-like shape and thus could not be considered as M ϕ . These cells resemble human inflammatory CD64⁺ DCs detected in synovial fluid of rheumatoid arthritis (RA) patients (Segura et al., 2013) or tissue Ly6C⁺CD64⁺ inflammatory monocytes in murine colon (Grainger et al., 2013). Secondly, in colitic mice and ileal CD, extravasated inflammatory monocyte-derived cells (P1) best defined as CD11c^{-/dim},

CD11b^{dim/+}, CD14⁺, CD64^{low}, SIRP-a⁺, MHC classII⁻ cells progressively develop into mature CD11c⁺⁺, CD11b⁺, CD14⁺⁺, CD64⁺⁺, SIRP-a⁺, MHC classII⁺⁺⁺ (P4) macrophages, unless the maturation process is interrupted under inflammatory conditions (Bain et al., 2013). Thus, human colonic CD163⁻ cells could represent a distinct CD14⁺ monocyte-like subpopulation, which accumulates in inflamed UC mucosa and displays a similar degree of plasticity. Unsupervised FlowSOM algorithm suggested that recruited monocytes (CD206⁻CD209⁻MERTK⁻CLEC5A⁻TREM^{dim}HLADR^{dim}CD14⁺CD16⁺CCR2⁺CD11c⁺CD11b^{bright}CD163⁻ cells) progressively acquired CD163, MERTK, CD209, CD206 and down-regulated CD11b and CCR2. In that regard, we recently characterized in inflamed CD colon, two CD14⁺ populations using single cell RNA profiling and demonstrated that inflammatory monocyte-like (TREM⁺CD206⁻CD209⁻CD163⁻) are distinct from TREM⁻CD206⁺CD209⁺MERTK⁺CD163⁺ macrophages at the molecular level. Like in UC, the CD163⁻ and not the CD163⁺ accumulate in lesional sites, in proportion that correlates with disease severity (Chapuy L, 2018). Finally, CD163⁻ cells might be related but still distinct from CD14⁺CLEC5A⁺CD209⁻CD11b⁺CD11c⁺ cells, which are potential drivers of chronic intestinal inflammatory response (Gonzalez-Dominguez et al., 2015). In fact, CD163⁻ cells clustered apart from the CLEC5A^{bright}TREM⁺ cells, which together with CD209^{dim}CD206^{dim} cells might represent transitioning CD163^{dim} cells. The latter were excluded from our functional studies. Regarding CD163⁺ cells, they displayed a M ϕ morphology and thus resemble M ϕ 3 or M ϕ 4 subsets that are also derived from recruited monocytes in human jejunum at homeostasis (Bujko et al., 2018). As opposed to M ϕ 1 or M ϕ 2 precursors that expressed CD11c in healthy small intestine, M ϕ 3 or M ϕ 4 are not CD11c (Bujko et al., 2018). However, CD11c expression was not a discriminative surface marker between CD163⁻ and CD163⁺ cells since it was expressed at high intensity in both subsets in inflamed UC mucosa, corroborating the

phenotype of CD14⁺ MNPs in human inflamed colon (Bernardo et al., 2018; Gonzalez-Dominguez et al., 2015). Furthermore, we here showed that CD163⁺ M ϕ included a subset of TIM4⁺CD4⁺ cells which were not yet reported in humans but recently defined as tissue resident M ϕ in mice (De Schepper et al., 2018; Shaw and Houston, 2018). The TIM4⁺CD4⁺CD163⁺ M ϕ subpopulation co-expressed CD169; CD169⁺ M ϕ phenotype contribute to monocyte recruitment in mice (Asano et al., 2015).

Overall, our data indicate that CD163⁻ inflammatory monocyte-like cells promote Th8/Th17, Th8/Th17/Th1 and Th8/Th1 responses through the pro-inflammatory cytokines they produced. We thus propose to refer to these cells as “monocytes-derived effector cells (MDEC)”. Conversely, the CD163⁺ cells might be considered anti-inflammatory, regulatory M ϕ and/or “post-inflammatory” M ϕ since these cells produced more IL-10 while expressing similar amount of pro-inflammatory cytokines as compared to MDEC (CD163⁻ cells). Furthermore, CD163⁺ cells did not accumulate in inflamed UC colon or regulate Th17, Th17/Th1 and IL-8 expression in colonic CD4⁺ T cells. In fact, inflammatory CD16⁺ M ϕ , unlike inflammatory DCs, do not produce IL-23 or regulate memory T cell responses in ascites of cancer patients (Segura et al., 2013).

IL-8 is a potent chemoattractant for neutrophils (Bruno et al., 2015; Fonseca-Camarillo and Yamamoto-Furusho, 2013; Mitsuyama et al., 1994), which play an important role in the pathophysiology of IBD. Increased *IL-8* mRNA expression has been detected in the inflamed mucosa of IBD patients and levels of IL-8 expression correlate with endoscopic severity in UC (Mitsuyama et al., 1994). However, the cellular source of IL-8 includes neutrophils, MNPs, and possibly T cells in IBD mucosa (Brandt et al., 2000). In chronic lesions, IL-8 is predominantly detected in CD3⁺ cells over neutrophils using immunofluorescence technique arguing for a role

of T cell derived-IL-8 in the perpetuation of the disease (Brandt et al., 2000). In a rat model of colitis, IL-8 levels increased before the influx of neutrophils (Harada et al., 1994), supporting the concept that IL-8-producing T cells could be implicated at the early phase of the disease. Some studies have demonstrated the production of IL-8 by circulating T cells isolated from healthy adult and cord blood (Gibbons et al., 2014),(Akhade and Qadri, 2015; Gasch et al., 2014). The detection of high levels of IL-8 in neonatal T cells suggests that T cell priming has occurred *in utero* (Gibbons et al., 2014). However, polarizing conditions to differentiate naïve T cells into IL-8-producing cells remain unknown. Human circulating activated Th17 clones directly attract neutrophils through IL-8 release while Th17/Th1 clones increase neutrophil activity (Pelletier et al., 2010). We here showed that primary Th17 T_{EM} but not Th1 T_{EM} cells isolated from mLNs expressed IL-8, which was augmented in response to IL-1 β in UC patients. Interestingly, IL-1 β correlates with IL-8 levels in UC mucosa (Mitsuyama et al., 1994). However, addition of IL-1 β does not increase the percentage of IL-8⁺ cells in circulating TCR-stimulated CD4⁺ T cells (Gasch et al., 2014). Furthermore, IL-12 promoted the emergence of IL-8⁺IFN- γ ⁺IL-17⁻ T cells in mLN Th17 T_{EM}, which suggests Th17 plasticity towards Th8/Th1 profile. IL-12 augmented IL-8 together with TNF- α and GM-CSF in mLN Th17 T_{EM}, highlighting a potential pathogenic Th8 profile in disease tissue. In that regard, IL-8⁺GM-CSF⁺CD4⁺ T cells are detected in skin lesions (Keller et al., 2005). Notably, very low frequencies of IL-8/TNF- α or IL-8/GM-CSF co-producing cells were reported in polyclonally stimulated CD4 T cells in human newborn (Gibbons et al., 2014). Noteworthy, flagellin, which is abundant in the colon, reportedly up-regulates IL-8 production in human newborn CD4⁺ T cells (Gibbons et al., 2014). Finally, circulating IL-8⁺Foxp3⁺CD25⁺ T cells with a dual suppressive and inflammatory phenotype that promotes pro-inflammatory cytokine production and neutrophil attraction were reported in UC

inflamed mucosa (Kryczek et al., 2016). Since we could not detect *ex vivo* IL-8 expression in Foxp3⁺CD25⁺ T cells in inflamed UC mucosa, these T cells were not included in our gating strategy that exclusively analyzed CD4⁺CD25⁻ T cells.

Finally, currently approved therapeutic approaches and ongoing clinical trials using anti- α 4 β 7 or α E β 7 integrin mAbs in UC patients are aiming to impair T cell recruitment to inflamed mucosa (Feagan et al., 2013). However, unlike Th17, Th17/Th1 and Th9 cells (Zundler et al., 2017), colonic IL-8⁺ T cells appeared to be α 4 β 7 or α E β 7 negative since these cells expressed α 4 but not β 7 integrin. Data suggest that intestinal inflammatory IL-8⁺ T cells might utilize α 1 for their tissue recruitment (Rivera-Nieves et al., 2005).

In conclusion, colonic CD14⁺CD163⁻ MDECs producing IL-1 β and IL-12p40, and their propensity to augment IL-8 expression in tissue T cells, might all participate to an amplification loop that maintains and perpetuates gut inflammation in UC. Nevertheless, the potential pathogenic role of colonic effector T cells producing IL-8 *in vivo* (Walana et al., 2018), notably in attracting neutrophils and thus altering epithelial barrier integrity, warrants further investigations in UC.

B.6. MATERIALS AND METHODS

Human clinical samples

All participants signed informed consent form that has been approved by the Institutional Ethics Research Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Non-inflamed and inflamed colonic tissues (from the same patient) and mesenteric lymph nodes (mLNs) were acquired from surgical resections or endoscopic biopsies. Patient recruitment was based on clinical, endoscopic and histological criteria (Table 1). UC patients presented with bloody stools, diarrhea, and abdominal pain. Endoscopically, they presented a continuous inflammation, extending from the rectum to the colon. CD patients presented with diarrhea, weight loss or abdominal pain. Endoscopically, the mucosa was eroded and exhibited patchy inflammation, deep ulcers and/or strictures. Histologically, the architecture of the crypts was disturbed; the mucosa was infiltrated by mono or polynuclear cells, with or without pathognomonic granuloma in the case of CD patients. No histological data or bacteriological infections suggested a differential diagnosis. Remission of the disease was assessed on the basis of endoscopic criteria. Control biopsies were obtained from patients undergoing a screening colonoscopy. Clinical information is shown in table 1.

Cell purification

The intestinal mucosa, from biopsies or surgical samples, was first processed by enzymatic digestion with DNase I (Roche, Basel, Switzerland) and Collagenase D (Roche, Basel, Switzerland) followed by mechanical digestion with gentle MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) to isolate lamina propria mononuclear cells (LPMC). The mLNs were digested mechanically to obtain cellular suspensions, as previously reported (Baba et al., 2013).

Cell staining

LPMC were stained using monoclonal antibodies listed in table 2 and analyses were performed with FCS Express 6 software, RUO, except for 15 color stainings that were analyzed using Flowjo v10.5, linked to R.3.5.1 software. Unsupervised analyses were performed using *t*-SNE (*t*-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) and FlowSOM (Flow cytometry data using self-organizing map)(Van Gassen et al., 2015) algorithms, in Flowjo. The data were manually gated on single viable CD45⁺HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ cells, and all gated cells were subjected to analysis. The cells were assigned to a self-organizing map, automatically segregating cells into 5 clusters and visualizing data in four ways: a) cell affiliation in 5 clusters visualized in *t*-SNE plot; b) surface markers expression level visualized by histograms; c) relative mean intensities depicted according color gradient in heatmap; d) assignment of cells to the self-organizing map with a 5x5 grid, resulting in 25 nodes, depicted as a minimal spanning tree, built to visualize similar nodes in branches. Concatenated file from 4 UC patients as well as each individual file were analyzed separately with *t*-SNE and FlowSOM algorithm. FlowSOM algorithm was run 5 times to insure reproducibility of the results.

Cell sorting

Human CD4⁺CD8⁻CD45RA⁻CD25⁻ mucosal T cells and HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ MNPs co-expressing or not CD163 were sorted at the same time to perform co-culture experiments. HLADR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺ MNPs co-expressing or not CD163 were sorted to analyze cell morphology. mLN CD4⁺CD45RO⁺CD62L^{low}CD8⁻CD45RA⁻CD25⁻ effector memory T cells (T_{EM}) that were stratified into CCR6⁺CXCR3⁻ (Th17 T_{EM}) and CCR6⁻CXCR3⁺ (Th1 T_{EM}) were sorted for culture with IL-1 β and IL-12 and *ex vivo* PMA ionomycin stimulation. Sortings were

performed using FACS Aria II cell sorter. Data were analyzed using FACS Diva 6 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

In vitro MNP/T-cell co-cultures

Total CD4⁺T cells, depleted in CD8⁺ cells, CD25⁺regulatory T cells and CD45RA⁺naïve T cells were purified from inflamed colon. T cells were stimulated with anti-CD3/CD28 coated beads (Miltenyi Biotec) and a) cultured with or without IL-1 β (10ng/ml, R&D system), IL-12 (20ng/ml, R&D system) or IL-23 (10ng/ml, R&D system) for 6 days; or b) co-cultured with autologous MNP subsets purified from inflamed colonic mucosa, at a 10:1 ratio for 6 days, in the presence of PGN (10 μ g/ml). For some experiments, anti-IL-1 β receptor (10 μ g/ml), anti-IL-1 β (10 μ g/ml) or anti-IL12p70 (10 μ g/ml, R&D system) mAbs were added to the co-cultures.

Total CD4⁺CD8⁻CD45RA⁻CD25⁻ T cells, Th17 T_{EM}, Th1 T_{EM}, purified from mLNs, were co-cultured in the presence of anti-CD3/CD28 coated beads, with or without IL-1 β (10ng/ml) or IL-12 (20ng/ml) for 6 days.

For all cultures: a) RPMI 1640 medium with 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin was used; b) for intracytoplasmic staining, cells were restimulated after culture, with PMA and ionomycin for 6 hours in the presence of brefeldin A for the last 3 hours, then fixed and stained with mAbs (CD3, IL-17, IFN- γ , IL-8, IL-22, IL-6, TNF- α , GM-CSF, as listed in table 2); c) IL-17, IFN- γ , IL-6, TNF- α , GM-CSF, IL-8 release were measured by multiplex assay (Eve Technologies, Calgary, AB, Canada) in the culture supernatants.

Cytokine expression

Ex vivo isolated LPMC were immediately stained for CD45, HLA-DR, CD172 α (SIRP α), CD64 and CD163, in the absence of BrefeldinA, then fixed/permeabilized and stained for intracytoplasmic cytokine expression (IL-1 β , IL-10, IL-12p40 and IL-23).

Freshly isolated LPMC were cultured with PMA and ionomycin for 4 hours, in the presence of brefeldin A, then fixed and stained for CD45, CD3, CD4, CD8 and CD25. Intra-cytoplasmic expression of Foxp3, IL-8, IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, GM-CSF was evaluated after permeabilization. Co-expression of IL-17A, TNF- α , IFN- γ , IL-6, GM-CSF was evaluated in CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD25⁻Foxp3⁻IL-8⁺ cells.

Freshly purified Th1 T_{EM} and Th17 T_{EM} were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for 4 hours, in the presence of brefeldin A, then stained for intracytoplasmic IFN- γ and IL-17 expression.

Morphology

For morphological studies, FACS-sorted MNPs were cytopun and stained according to the Wright Stain procedure. Leica DM4000B microscope, equipped with Leica DFC300FX camera was used to visualize the tissue sections.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-tailed Wilcoxon signed rank test (represented by *) and Mann Whitney test (represented by §) were used. Friedman test was employed followed by Dunn's test (represented by Ω). Threshold for significance was adjusted when indicated to account for test multiplicity. Kruskal-Wallis test was employed followed by Dunn's test (represented by #). Repeated measure

one way Anova was employed followed by Bonferroni test (represented by \square). For all tests, 1 symbol means $P < 0.05$; 2 symbols mean $P < 0.01$; 3 symbols mean $P < 0.001$. Bar graph data are shown as mean \pm s.e.m.

C. HIGH DIMENSIONAL PHENOTYPIC MAPPING AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES IN MESENTERIC LYMPH NODES REVEAL DIFFERENCES BETWEEN ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE

Laurence Chapuy¹, Marwa Bsati¹, Manuel Rubio¹, François Harvey², Vinicius Motta³, Frank Schwenter⁴, Ramses Wassef⁴, Carole Richard⁴, Colette Deslandres⁵, Bich N. Nguyen⁶, Geneviève Soucy⁶, Nir Hacohen⁷, Jorge Fritz⁸, Alexandra-Chloé Villani^{7, 9}, Heena Mehta¹ and Marika Sarfati¹

¹Immunoregulation Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

²Department of Biomedical Informatics, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, QC, Canada.

³McGill Goodman research center, McGill University, Montréal, QC, Canada and Fluidigm Canada Inc., Ontario, Canada

⁴Digestive Surgery Department, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

⁵Division of Gastroenterology, Hepatology & Nutrition, Department of Pediatrics, CHU Sainte-Justine, Université de Montréal, QC, Canada.

⁶Pathology Department, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

⁷Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA.

⁸Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, Canada, H3A 2B4.

⁹Center for Immunology and Inflammatory Diseases, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA.

Published in Journal of Crohn and Colitis, 2019 sept. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjz156

C.1. ABSTRACT

Background & Aims: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are distinct forms of inflammatory bowel diseases (IBD). Heterogeneity of HLA-DR⁺SIRPα⁺ mononuclear phagocytes (MNPs), including macrophages (MΦ), monocytes and dendritic cells (DCs) was reported in healthy and inflamed gut tissue but not yet investigated in mesenteric lymph nodes (MLNs) of IBD patients. We aimed to uncover the landscape of HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNP subpopulations in MLNs.

Methods: Cell distribution, morphology, immune function, transcriptomic (RNAseq) and high dimensional protein expression profiles (CyTOF) of CD14⁻ and CD14⁺ HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs were examined in MLNs of UC (n=14), CD (n=35) and non-IBD (n=12) patients.

Results: MLNs of UC and not CD were characterized by increased frequencies of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs, with some displaying Mφ morphology and phagocytic capacity. In CD, the proportion of CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells augmented relative to CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells and, included DCs which drove naive T cell proliferation, Th1 polarization and Th17 T_{CM} plasticity. Gene expression profile corroborated the nature of DCs best defined by *BTLA*, *SERPINF*, *IGJ*, and indicated that CD163⁺ MNPs expressed a mixed monocyte-Mφ profile (*CD163*, *SEPP1*, *MARCO*, *MAFB*, *CD300E*, *THBS* and *S100A9*). CyTOF analysis further revealed the heterogeneity and differential distribution of CD14⁻ and CD14⁺ HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs in UC and CD. CD14⁻CD64⁻CD163⁻ DCs, included CD123⁺ cells that predominated over conventional DCs while CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs comprised MARCO^{hi}CD68^{hi}HLA-DR^{hi} Mφ and MARCO⁻CD68^{dim}HLA-DR^{dim} monocyte-like cells, whose proportion was increased in UC relative to CD.

Conclusions: Complementary high-dimensional protein and transcriptomic analysis of MNPs in MLNs might shed light into differences between immunopathogenesis of UC and CD.

C.2. INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the two most predominant forms of inflammatory bowel diseases (IBD). Several factors contribute to IBD development including genetic predisposition, environmental triggers, gut dysbiosis, and immune dysfunction (Zhang and Li, 2014). Priming of naïve T cells, and education of memory T cells to home to gut tissue occur in mesenteric lymph nodes (MLNs) through interactions with mononuclear phagocytes (MNP) (Cerovic et al., 2013; Esterhazy et al., 2016). Furthermore, MLNs are essential for induction of oral tolerance and prevention of microbial dissemination under homeostatic conditions (Esterhazy et al., 2016; Voedisch et al., 2009).

In mice, MLNs that drain the small intestine and colon are anatomically segregated (Houston et al., 2016; Veenbergen et al., 2016). Three CD14⁻ dendritic cell (DC) populations have been reported in the small intestine and draining MLNs (Cerovic et al., 2013; Joeris et al., 2017; Richter et al., 2018; Schlitzer et al., 2013; Scott et al., 2015). BATF3/IRF8-dependent CD103⁺CD11b⁻SIRPα⁻CX3CR1⁻CLec9a⁺CD141⁺XCR1⁺ (CD103⁺cDC1), IRF4-dependent CD103⁺CD11b⁺SIRPα⁺CX3CR1^{low} (CD103⁺cDC2), and CD103⁻CD11b⁺CCR2⁺ (CD103⁻cDC2) cells. DC populations in the gut upregulate the expression of CCR7 and HLA-DR, and migrate to MLNs where they join resident HLA-DR^{low} cDC1 and cDC2 populations (Cerovic et al., 2015; Schlitzer et al., 2013). Functionally, migratory CD103⁺ cDC1 and CD103⁺ cDC2 can present orally-derived antigens, induce the polarization of naive T cells into regulatory FoxP3⁺ T cells, and imprint CCR9 and α4β7 homing molecules on T cells in a retinoid acid dependent fashion (Coombes et al., 2007; Esterhazy et al., 2016). In contrast, CD103⁻ cDC2 secrete IL-12 and IL-23 in the absence of overt stimulation and induce strong inflammatory Th1 and Th17 responses from naïve T cells (Cerovic et al., 2013; Milling et al., 2009). In colonic MLNs, only CD103⁺

cDC1 and CD103⁻ cDC2 populations are found, consistent with the very low frequency of CD103⁺ cDC2 in the colon.

The distribution of DC populations in human gut appears to be analogous to that reported in mice (Watchmaker et al., 2014). However, functional properties of DCs in MLNs are extrapolated from data obtained using DCs isolated from intestine. Granot *et al.* reported the presence of resident and migratory cDC1 and cDC2 in MLNs of deceased organ donors (Granot et al., 2017). The tissue origin of migratory DCs is inferred by their elevated CCR7 expression acquired in gut. Nonetheless, there are limited studies examining DCs in MLNs of IBD patients. Immunohistochemistry identified cDC1 (BDCA3⁺) and cDC2 (BDCA1⁺) in MLNs of CD, UC and non-IBD patients (Verstege et al., 2008). By conventional flow cytometric analysis, it was shown that equivalent frequencies of CD103⁺DCs are observed in small intestine MLNs of CD and non-IBD patients (Jaensson et al., 2008). Furthermore in CD MLNs, CD11c⁺ DCs, which are stratified by their level of HLA-DR expression, produce high amounts of IL-23 and low amounts of IL-10 upon stimulation, and induce strong Th1/Th17 immune responses, a key feature of CD (Sakuraba et al., 2009).

Several macrophages (M ϕ) subsets that occupy distinct niches cohabit with DCs in LNs. Ontogenically, murine M ϕ are thought to be derived from adult circulating monocytes that replenish the LN pool while their embryonic origin is not established in LNs (Hoeffel and Ginhoux, 2015). CX3CR1⁺F4/80⁻ subcapsular sinus M ϕ (SSM) are known to easily capture and transfer lymph-borne substances to B cells, while CX3CR1⁻ F4/80⁺ medullary sinus M ϕ (MSM) are highly phagocytic. In addition to phagocytosis of apoptotic plasma cells, CX3CR1⁻ F4/80⁺

medullary cord M ϕ (MCM) provide trophic support to these cells (Gray and Cyster, 2012). Recently, another subset of M ϕ has been reported in the LN T cell zone (TZM). These CX3CR1⁺ F4/80⁻ M ϕ , derived from circulating monocytes in adult mice, are specialized in efferocytosis of numerous apoptotic cells present in the T cell zone (Baratin et al., 2017). Finally, the germinal center in reactive LN hosts highly phagocytic tangible body M ϕ (TBM) that eliminate apoptotic cells. Like in the mice, human SSM and MSM are both CD68⁺CD169⁺ whereas paracortex M ϕ express CD68 but not CD169 (Komohara et al., 2017). Similar to DCs, M ϕ and monocyte-derived cells (MCs) are poorly characterized in MLNs of IBD patients.

We previously identified a heterogeneous HLA-DR⁺SIRP α ⁺ population that includes CD14⁺ and CD14⁻ cells in colonic MLNs of CD patients (Baba et al., 2013). Furthermore, adoptively transferred SIRP α ⁺ MNPs, isolated from colonic MLNs of chemically-induced colitic wild-type mice, elicit colitis in otherwise protected CD47^{-/-} mice (Fortin et al., 2009), highlighting the relevance of investigating MNPs in MLNs of human IBD. In this report, we uncovered the entire phenotypic landscape of CD14⁻ and CD14⁺ HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs in MLNs of CD and UC patients using mass cytometry in parallel with molecular and functional studies. These data revealed differences and similarities in cell distribution and phenotype of HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs between CD and UC patients, highlighting potentially different functionalities of MNPs in MLNs of these two distinct IBD.

C.3. RESULTS

C.3.1. DISTRIBUTION OF CD14⁺CD64⁺CD163⁺ AND CD14⁻CD64⁻CD163⁻ CELLS IN MLNS WAS DIFFERENT BETWEEN UC AND CD PATIENTS

The frequencies of HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs were examined in cMLNs of UC (n=13) relative to CD (n=21) and diverticulosis (non-IBD; n=12) patients. HLA-DR⁺SIRPα⁺ population was first subdivided into HLA-DR⁺SIRPα^{hi} and HLA-DR⁺SIRPα^{low} cells. The frequencies of HLA-DR⁺SIRPα^{hi} cells tended to increase in cMLNs of UC and CD patients when compared to non-IBD donors (Figure 1A). Notably, the difference between IBD and non-IBD patients was significant only when the UC or CD groups were individually compared with the non-IBD control group (Unpaired *t*-test: *P*<0.05 and *P*<0.04 respectively), corroborating and extending our previously published observations (Baba et al., 2013). In contrast, frequencies of unfractionated HLA-DR⁺SIRPα^{low/hi} as well as HLA-DR⁺SIRPα^{low} cells were equivalent among the three groups of patients (Figure S1A). Since HLA-DR⁺SIRPα⁺ population includes CD14⁻ and CD14⁺ cells in MLNs of CD (Baba et al., 2013; Granot et al., 2017), we examined the percentage of CD14⁺ among HLA-DR⁺SIRPα⁺ cells in the three groups of patients. Unexpectedly, only in UC patients the frequency of CD14⁺ MNPs was significantly increased when considering either the HLA-DR⁺SIRPα^{hi} or HLA-DR⁺SIRPα^{low/hi} populations but not HLA-DR⁺SIRPα^{low} cells (Figure 1B and Figure S1B), suggesting that the increase of CD14⁺ MNPs in the HLA-DR⁺SIRPα^{hi} subset discriminates between UC and CD.

In light of these observations, HLA-DR⁺SIRPα^{hi} MNPs were further subdivided based on expression of CD14 and CD163, which marks Mφ in tissues or LNs (Segura et al., 2012). The proportion of CD14⁺CD163⁺ cells was significantly augmented in UC when compared to CD patients (Figure 1C, upper panels). In CD only, the percentage of CD14⁻CD163⁻ cells was

elevated relative to CD14⁺CD163⁺ cells. Noteworthy, the percentage of CD14⁻CD163⁺ and CD14⁺CD163⁻ subsets, which both represented ~10% of HLA-DR⁺SIRP α ^{hi} MNPs, were equivalent in UC and CD patients (Figure S1C). Since CD64 expression reportedly delineated M ϕ in mice, and inflammatory monocyte-derived cells in humans (Plantinga et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012), CD14⁺CD163⁺ and CD14⁻CD163⁻ MNPs were further stratified using CD64. As depicted in Figure 1C (bottom panels), all CD14⁺CD163⁺ co-expressed CD64 at high intensity while CD14⁻CD163⁻ MNPs predominantly comprised CD64⁻ cells. The frequencies of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells were selectively augmented in UC when compared to CD while CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells predominated in CD.

In conclusion, increased frequencies of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells distinguished UC from CD in MLNs of IBD patients.

C.3.2. CD14⁺CD64⁺CD163⁺ AND CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs DISPLAYED MORPHOLOGY AND FUNCTION OF MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS, RESPECTIVELY

In order to investigate the nature and function of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs that were differentially distributed in MLNs of UC and CD, we purified these cells according to the gating strategy depicted in Figure 2A. CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells displayed either a kidney-shaped nucleus or a large cytoplasm with vacuoles consistent with monocyte and M ϕ morphology respectively, while dendrites were seen on CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells and thus, resembled DCs (Figure 2A).

Since the M ϕ -like cells were found in high proportions in UC MLNs, some of their functionalities were assessed in UC patients only. The CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells were

phagocytic when compared to CD14⁻CD163⁻CD64⁻ cells (Figure 2B). Conversely, CD14⁻CD64⁻CD163⁻ and not CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs isolated from CD induced allogeneic naïve CD4⁺ T cell proliferation, reflecting their antigen-presenting function (Figure 2C). Furthermore, these cells polarized naïve CD4⁺ T cells into IFN- γ ⁺IL-17⁻ (Th1) but not IL-17⁺IFN- γ ⁻ (Th17) or IL-17⁺IFN- γ ⁺ (Th1/Th17) cells (Figure 2D). We next investigated the cytokine expression profile of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ subsets in both diseases. Although IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-23p19 and TNF- α expression was low in CD14⁻CD163⁻CD64⁻ as compared to CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs using *ex vivo* cell staining (Figure S2, left panels), TLR2 stimulation significantly augmented cytokine secretion in both cell types (Figure S2, right panels).

Collectively, these data suggested that phagocytic CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs that preferentially accumulated in MLNs of UC when compared to CD, comprised some M ϕ , while CD14⁻CD163⁻CD64⁻ cells that predominated in MLNs of CD were enriched in *bona fide* DCs.

C.3.3. CD14⁻CD64⁻CD163⁻ CELLS FAVORED PLASTICITY OF AUTOLOGOUS TH17 T_{CM} TOWARDS TH1/TH17 OR TH1* PROFILE IN MLNS

Double IL-17/IFN- γ -secreting cells (Th17/Th1) display pathogenicity in mice with colitis (Ahern et al., 2010), and similar cells are detected in gut of patients with CD (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014). We therefore asked whether CD14⁻CD163⁻CD64⁻ MNPs, which did not induce naïve T cell polarization into Th17/Th1, regulate plasticity of autologous recirculating Th17 central memory T cells (T_{CM}) towards Th17/Th1 profile (Figure 3). T_{CM} have been reported to be less differentiated and more prone to conversion than Th17

effector memory T cell (T_{EM}) responses in MLNs (Rivino et al., 2004). To this end, $CD4^+CD45RO^+CD62L^{high} T_{CM}$ were subdivided and purified from the MLNs of CD patients according to surface markers associated with Th17 ($CCR6^+CXCR3^-$), Th1 ($CCR6^-CXCR3^+$) and Th17/Th1 ($CCR6^+CXCR3^+$) profile (Figure S3A and B). Indeed, *ex vivo* stimulated T_{CM} cells induced a cytokine profile (IL-17 and IFN- γ expression) that concurred with their phenotypic signature, which is in agreement with previous studies in blood of healthy donors (Duhon and Campbell, 2014). Furthermore, Th17 T_{CM} were converted into IFN- γ -secreting T cells in the presence of IL-12, whereas addition of IL-23 together with IL-1 β increased IL-17 expression (Figure S3C and D), corroborating their plasticity. As depicted in Figure 3A, $CD14^-CD64^-CD163^-$ but not $CD14^+CD64^+CD163^+$ MNP cells in co-culture with Th17 T_{CM} favored the emergence of IL-17 $^-$ IFN- γ^+ (ex-Th17 or Th1*) and IL-17 $^+$ IFN- γ^+ (Th17/Th1) T cells, though both cell types increased frequencies of IL-17 $^+$ IFN- γ^- T cells (Th17). Cytokine measurement in culture supernatant corroborated the intra-cytoplasmic staining for IFN- γ and IL-17 (Figure 3B). IL-6 but not TNF- α was augmented by $CD14^-CD64^-CD163^-$ MNP cells while IL-21 tended to decrease (Figure 3B).

Taken together, we propose that $CD14^-CD64^-CD163^-$ enriched DCs contributed to Th17 T_{CM} plasticity towards a Th17/Th1 and Th1* profile in MLNs while both MNP subsets, enriched in either DCs or M ϕ -like cells, amplified Th17 responses.

C.3.4. MOLECULAR SIGNATURE OF $CD14^+CD64^+CD163^+$ AND $CD14^-CD64^-CD163^-$ CELLS IN MLNs OF CD AND UC PATIENTS

We next performed genome-wide transcription profiling on FACS-sorted $CD14^+CD64^+CD163^+$ and $CD14^-CD64^-CD163^-$ populations from MLNs of 5 UC and 7 CD

patients (Figure 4). Principal component analysis (PCA) of gene expression segregated these two cell subpopulations independently of disease type (Figure 4A). Comparing gene expression profiles of the two HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNP subsets indicated that CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells expressed, as expected, significantly higher levels of *CD14*, *FCGR1A* and *CD163* than CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells in both UC and CD (Figure 4B), thus validating our gating strategies for cell subset isolation. We next identified the gene signature that distinguished CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ populations for all UC or CD patients individually (Tables S1 and S2, and Figure 4C, left (UC) and right (CD) panels, FDR<0.05, CD14⁻CD64⁻CD163⁻ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells). Top genes differentially co-regulated in CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells relative to CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells, included *MAFB*, *MARCO*, *STAB1*, *SEPP1*, *C2*, *CSF1R*, *CQ1B*, *CD300E*, *S100A8/A9*, *APOE*, *IL1B*, *THBS1*, *VCAN*, *C5A1*, *CSTL1* (down regulated genes, FDR<0.003), and *PTPRS*, *CDH1/e-cadherin*, *IRF4*, *SERPINF*, *IGJ*, *TRAF4*, *GZMB*, *RUNX2*, *BCL11A* (up regulated genes, FDR<0.1) for both diseases and across all patients examined (Figure 4D, volcano plots, heat map and Tables S3 and S4 (0.05<FDR<0.1)).

To gain further insight into the identity of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells in UC and CD, we next performed cross-species analysis by comparing their gene expression with data obtained from murine LN M ϕ and DCs (Baratin et al., 2017). M ϕ genes (*CD14*, *CD68*, *MERTK*) were significantly enriched in the CD14⁺CD64⁺CD163⁺ population while DC genes (*BTLA*, *FLT3*, *CCR7*) were enriched in CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs (Figure 4E). Furthermore, violin plots showed elevated *BTLA*, *FLT3*, *CCR7* and *IRF4* expression in CD14⁻CD64⁻CD163⁻ populations (Figure S4A), and *SIGLEC1/CD169*, *MARCO*, *CD209*, *MERTK*, *MSR1*, *MRC1*, *ITGAM1*, *CD300E*, *TREM-1*, *TLR4*, *IL1B* and *IL10* in CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs (Figure S4B). Analysis of functional pathways (as indexed in GO database) further

indicated that CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells were endowed with M ϕ capacities, corroborating their phagocytic activity. Indeed, CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells expressed genes involved in phagocytosis and its regulation (GO:0006909; GO:0050766) (Figure S5A). Further examination of the gene signature of CD14^{+/-}CD64^{+/-}CD163^{+/-} MNPs showed that CD14⁺CD64⁺CD163⁺ subset overexpressed genes implicated in leucocytes chemotaxis (GO:0002690) (Figure S5B).

Overall, gene expression pattern of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells accumulating in UC concurred with the functional and morphological observations that these cells comprised typical M ϕ . A characteristic DC enriched signature also highlighted the heterogeneity of CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells that included conventional cDC2 and plasmacytoid DCs (pDCs) but excluded SIRP α ⁻cDC1.

C.3.5. HIGH DIMENSIONAL SINGLE CELL PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS OF HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPS REVEALED THE HETEROGENEITY OF CD14⁻CD64⁻ POPULATIONS IN MLNS OF UC AND CD

Based on differentially expressed gene signature in CD163⁻DC-like and CD163⁺ monocytes/M ϕ -like cells, we designed a monocytes/M ϕ /DC panel to further explore the heterogeneity of HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNP populations at the protein level using CyTOF (Figure 5). After manual gating for CD45⁺ hematopoietic cells, *t*-distributed stochastic neighbor embedded (*t*-SNE) analysis of concatenated UC and CD samples identified clusters that included the two main cell types, CD3⁺ T cells (60.4% \pm 18.6) and CD19⁺ B cells (35.6.4% \pm 17.69), CD66b^{hi}SIRP α ⁺ neutrophils (0.022% \pm 0.024), as well as rare cells including Fc ϵ RI⁺CD123⁺SIRP α ⁺HLA-DR⁻CD11c⁻ basophils (0.007% \pm 0.007) and SIRP α ⁻HLA-DR⁺BLTA⁺CLec9A⁺cDC1 (0.007% \pm 0.004). HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs (Lineage⁻: CD3⁻, CD19⁻ and CD66b⁻) represented 0.46% \pm 0.2 of CD45⁺ cells. The concatenated HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNP

population was further subjected to *t*-SNE analysis that resulted in 3 main clusters (Figure 5A); expression feature *t*-SNE plots of CD14, CD64, CD11b expression identified a monocyte-derived cell/macrophage (Mono-Mac) cluster, which was distinct from the pDC-like cluster best defined by CD123 with some cells co-expressing CD303, and cDC cluster characterized by CD1c, FcεRI and BTLA expression. HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs were enriched in the Mono-Mac cluster, while the proportion of pDC-like cluster predominated over cDCs (Figure 5B).

We next investigated the heterogeneity of CD14⁻ subpopulation in MLNs from both diseases. To this end, HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs were next stratified by CD14 and CD64 expression (Figure 5C). FlowSOM (self-organizing map) analysis applied to the concatenated UC and CD CD14⁻CD64⁻ population identified four major clusters. These included one major CD11c⁻CD123⁺ pDC-like cluster (Cluster D; orange), and three CD11c⁺ cDC2 subsets that comprised a predominant CD33⁺CD1c^{hi} resident DC cluster (Cluster A; blue), a minor HLA-DR^{hi} CCR7⁺ migratory DC cluster (Cluster B; red), and an additional cluster that did not express CD1c but expressed CD11b (Cluster C; green) (Figure 5D). In order to compare the two diseases, FlowSOM analysis map of the combined CD14⁻CD64⁻ population was applied on the CD14⁻CD64⁻ subset of UC or CD (Figure 5E). The four clusters were then visualized on the *t*-SNE plot of concatenated HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs, and as a minimal spanning tree (MST) (Figure 5E). The MST depicts the relative frequencies of all clusters since circle size is proportional to the number of cells in each node with background color to indicate the cluster. Triangle size in star chart depicts the mean intensity of each marker for all cells assigned to the node. This unsupervised analysis showed that CD14⁻CD64⁻ clusters in UC and CD displayed similar phenotypes but differential cell distribution (Table S5: χ^2 , $P = 0.0001$). The pDC-like cluster, which appeared to be more abundant in CD than UC (80.7% versus 66.8%) included CD123⁺ cells co-expressing or not

BDCA2/CD303, whereas CD1c⁺ cells were best defined by BTLA, FcεRI, CD33, CD11c^{high} and CD1c^{high} expression.

Collectively, high dimensional mass cytometry analysis has shown that the UC and CD CD14⁺CD64⁺ cells from MLNs were differentially distributed into 4 DC clusters with pDC-like cells being the predominant population over cDC2 in both diseases.

C.3.6. HIGH DIMENSIONAL SINGLE CELL PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS OF HLA-DR⁺SIRPA⁺ MNPS REVEALED THE HETEROGENEITY OF CD14⁺CD64⁺ POPULATIONS IN MLNS OF UC AND CD

In order to identify which CD14⁺ subsets contributed to the observed increased proportion of these cells in UC relative to CD (Figure 1B), we next compared the heterogeneity of CD14⁺CD64⁺ population in MLNs from both diseases (Figure 6A) using similar analysis strategies as for CD14⁺CD64⁺ population. FlowSOM analysis on concatenated UC and CD CD14⁺CD64⁺ MNPs separated this population into seven clusters, four CD163⁺ and three CD163⁻ clusters (Figure 6B). FlowSOM clusters were visualized on *t*-SNE plot of concatenated CD14⁺CD64⁺ population (Figure 6C, top panels). Importantly, applying Phenograph, another clustering algorithm, also identified 7 clusters with similar phenotypes (Figure 6C, bottom panels). CD163⁺ clusters 4 (light blue), 5 (light green) and 7 (dark green) were best defined by cells co-expressing CD68 and HLA-DR at a high intensity. Specifically, cluster 5 was characterized as CD206^{dim}CD209⁺MARCO^{dim}CD169⁺CD163⁺ cells, whereas cluster 7 was enriched in CD206⁻CD209⁻MARCO^{hi}CD169⁻CD163^{hi} cells. Interestingly, cluster 4 included CD206^{hi} cells, and mainly differed from cluster 5 by low CD11b expression. The fourth CD163⁺ subset, cluster 6 (purple) was enriched in CD206⁻CD209⁻MARCO⁻CD169⁺CD11b⁺CD68^{dim}

HLA-DR^{dim} cells. The three CD163⁻ clusters expressed CD68 and HLA-DR at variable intensities, CD68⁺HLA-DR⁺ (cluster 1; orange), CD68^{dim}HLA-DR^{dim} (cluster 2; red), and CD68^{dim}HLA-DR^{low} cluster 3; dark blue). All CD163⁻ cells co-expressed CD11b while cluster 3 (dark blue) was enriched in CD169⁺ cells.

We next asked which of the CD14⁺CD64⁺CD163⁺ subsets contributed to increased frequency of CD14⁺ subpopulation observed in UC relative to CD MLNs. Therefore, FlowSOM analysis map of the combined CD14⁺CD64⁺ population was applied on CD14⁺CD64⁺ population of UC or CD. Clusters were visualized on *t*-SNE plots of concatenated HLA-DR⁺SIRP α ⁺MNPs, and as MSTs (Figure 6D). Cells in the 7 identified clusters were differentially distributed in both diseases (Table S5: χ^2 , $P < 0.0001$). CD11b⁺CD68^{dim}HLA-DR^{dim} cells in cluster 6 (purple), which was enriched in UC MLNs, represented the major CD163⁺ population (38.3% versus 24.3%). Overall, cells belonging to this cluster displayed a similar phenotype (TREM-1⁺) in both diseases. The relative frequency of MARCO^{hi}CD169⁻CD68⁺HLA-DR^{hi}CD163^{hi} cells in cluster 7 (dark green), considered to be bona fide M ϕ since they also co-expressed MERTK, appeared to be augmented in UC while MARCO^{dim}CD169⁺CD68⁺HLA-DR^{hi}CD163⁺ M ϕ (cluster 5; light green) were found in equal proportions in UC and CD. Finally, the three CD163⁻ clusters displayed a similar phenotype in both types of MLNs.

Taken together, the heterogeneity of CD14⁺CD64⁺ subset revealed that UC MLNs were best characterized by an increased proportion of CD11b⁺TREM-1⁺CD68^{dim}HLA-DR^{dim} cells that expressed CD163, which thus might contribute to the elevated frequencies of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells detected in UC relative to CD.

C.4. FIGURES

Figure 1

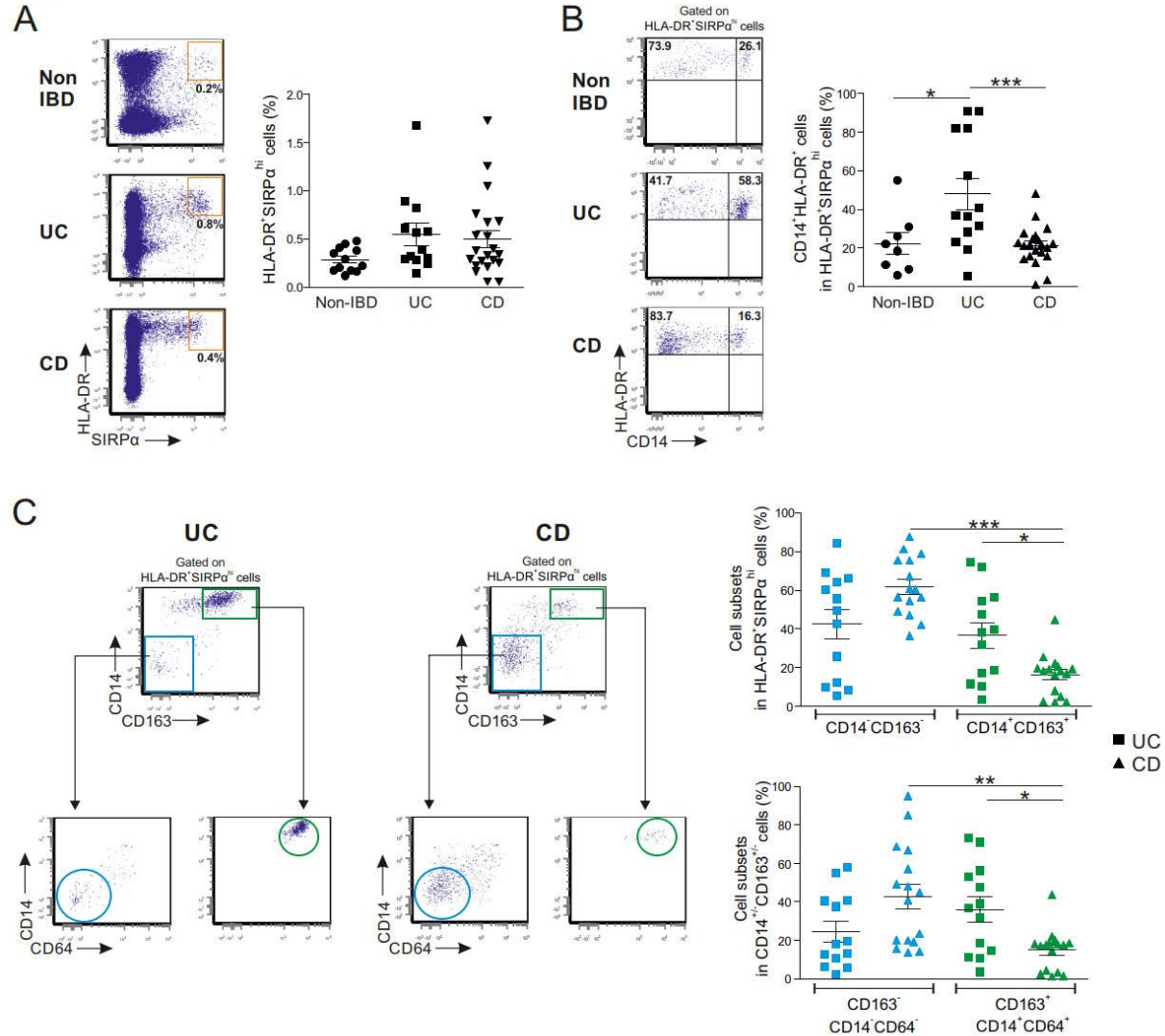


FIGURE C.4.1. DISTRIBUTION OF HLA-DR+SIRPAHI MNPs, CD14+CD64+CD163+ AND CD14-CD64-CD163- CELLS IN MLNS REVEALED DIFFERENCES BETWEEN UC AND CD PATIENTS.

Representative dot plots and frequencies in MLNs of **A.** HLA-DR⁺SIRPα^{hi} MNPs of control (n=12), UC (n=13) and CD (n=21), Kruskal Wallis test; **B.** CD14⁺HLA-DR⁺ in HLA-DR⁺SIRPα^{hi} MNPs of control (n=8), UC (n=13) and CD (n=21), one way analysis of variance (P<0.0007) and **C.** CD14⁺CD163⁻ versus CD14⁺CD163⁺ cells in HLA-DR⁺SIRPα^{hi} MNPs (top right panel), one way analysis of variance (P<0.0001), or CD14⁺CD64⁻CD163⁻ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁺ in CD14⁺CD163⁺ cells (bottom right panel) of UC (n=13) and CD (n=15), one way analysis of variance (P<0.002). For **B to C**, one way analysis of variance followed by Bonferroni's test (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

Figure 2

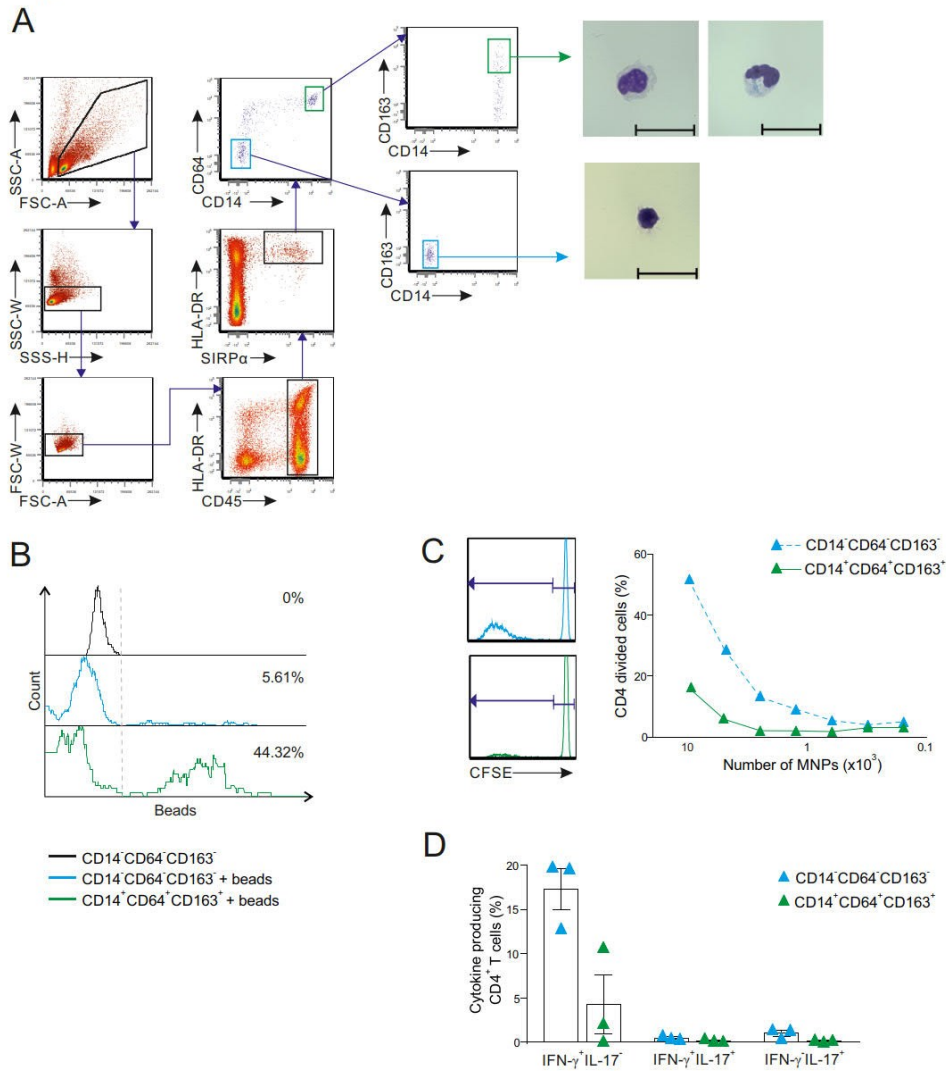


FIGURE C.4.2. CD14⁺CD64⁺CD163⁺ AND CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs DISPLAYED MORPHOLOGY AND FUNCTION OF MACROPHAGES AND DENDRITIC CELLS RESPECTIVELY

A. Gating strategy for isolation of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs from IBD MLNs, cell size and morphology (scale bar=20 μm). **B.** Phagocytosis of rabbit IgG–FITC coupled beads by CD14⁺CD64⁺CD163⁺ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs from UC MLNs (*n*=2). **C.** For proliferation assay (CFSE dilution), percentage division of fixed number of naïve CFSE-labeled CD4⁺ T cells when co-cultured with increasing numbers of allogeneic activated CD14⁺CD64⁺CD163⁺ or CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs for 5 days. **D.** Purified naïve CD4⁺ T cells were co-cultured with allogeneic activated CD14⁺CD64⁺CD163⁺ or CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs at 25:1 ratio for 6 days followed by 4 hours with PMA-ionomycin and brefeldin A. Percentage of IFN-γ and IL-17 producing CD4⁺T cells.

Figure 3

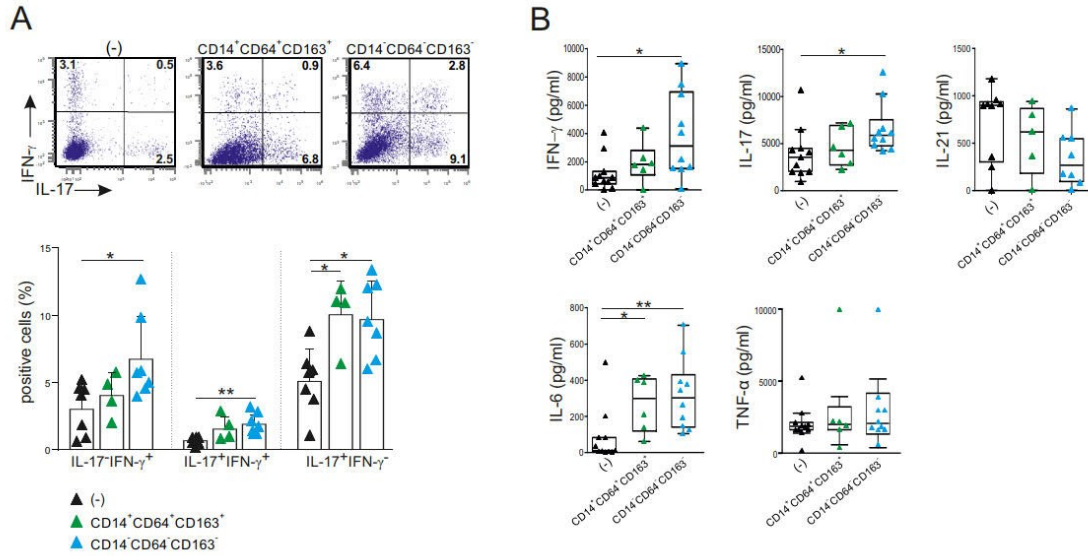


FIGURE C.4.3. CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPS REGULATED PLASTICITY OF AUTOLOGOUS TH17 T_{CM} IN MLNS

Purified Th17 were co-cultured with anti-CD3/CD28 coated beads, in the absence or presence of HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNP subsets isolated from CD MLNs, for 6 days, followed by PMA-ionomycin for 6 hours and Brefeldin A was added for the last 3 hours. **A.** Representative dot plots and percentages of IFN- γ and IL-17-producing cells (CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs ($n=7$) and CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs ($n=4$)), Kruskal Wallis test (IL-17⁻IFN- γ ⁺ $P<0.05$, IL-17⁺IFN- γ ⁻ $P<0.009$, IL-17⁺IFN- γ ⁺ $P<0.006$), followed by Dunn's test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$). **B.** Cytokines in culture supernatants measured by multiplex assay (CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs ($n=8-10$), and CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs ($n=5-6$)). Kruskal Wallis test (IFN- γ $P<0.02$, IL-17 $P<0.03$, IL-21 $P=0.15$, IL-6 $P<0.005$, TNF- α $P<0.6$), followed by Dunn's test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Figure 4

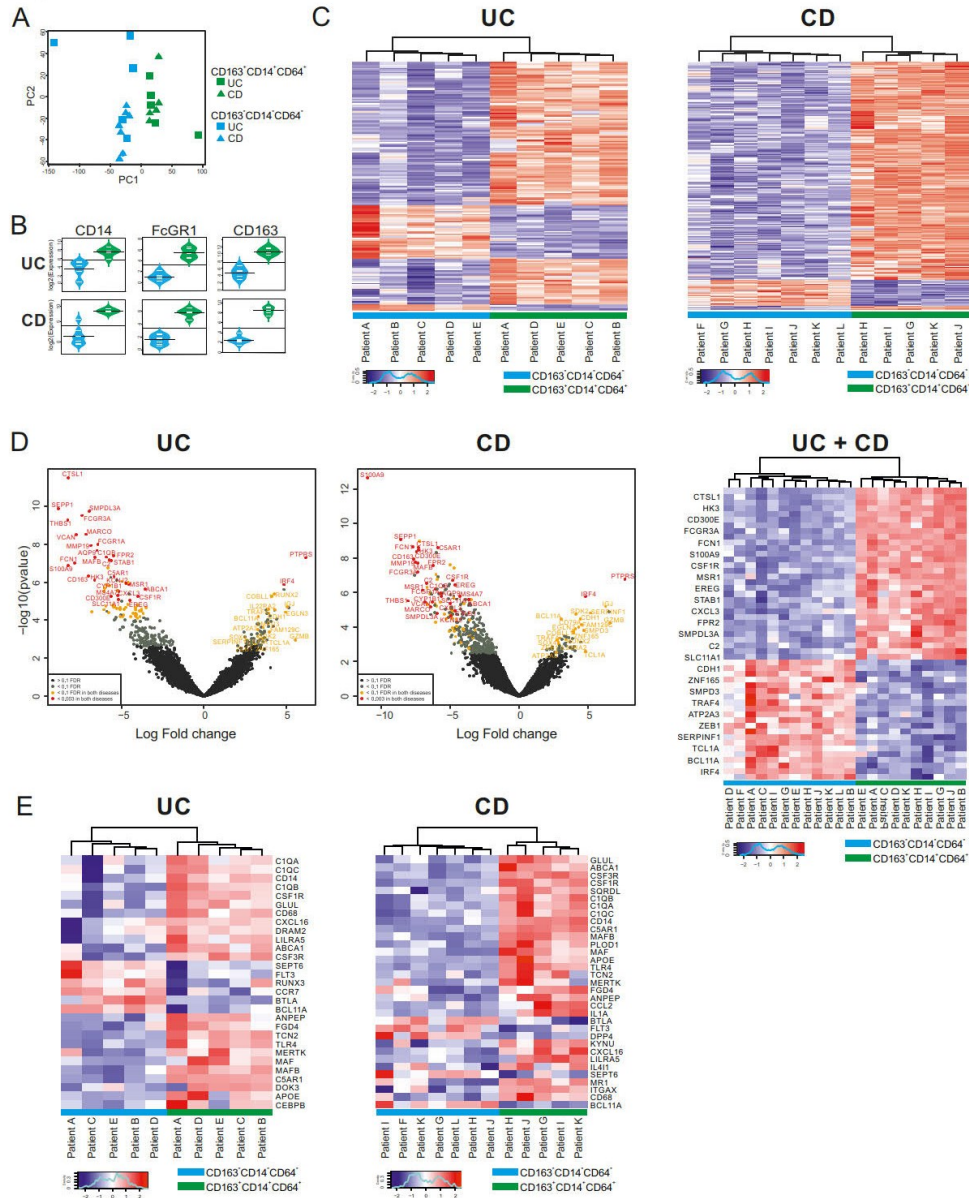


FIGURE C.4.4. MOLECULAR SIGNATURE OF CD14⁺CD64⁺CD163⁺ AND CD14⁻CD64⁻CD163⁻ CELLS IN MLNS OF UC AND CD PATIENTS

A. Principal component analysis (PCA) of FACS sorted CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ populations from 5 UC and 7 CD MLNs, respectively. **B.** Violin plots illustrate gene expression level distribution of CD14, CD64 (FcεR1) and CD163 surface marker genes (y-axis, (log₂ (Expression))) for CD14⁻CD64⁻CD163⁻ (blue) and CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (green) MNPs (x-axis). **C.** Heatmaps of discriminative genes between CD14⁻CD64⁻CD163⁻ and CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs from UC and CD for all patients (FDR < 0.05). **D.** Top genes differentially co-regulated in CD14⁻CD64⁻CD163⁻ relative to CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs (downregulated genes, FDR < 0.003, and upregulated genes, FDR < 0.1) in both diseases and across all patients examined. Volcano plots (UC and CD, left panels) and heatmap (right panel). **E.** Functional enrichment in pathways as indexed in murine LNs (Baratin et al., 2017) (downregulated genes in CD14⁻CD64⁻CD163⁻ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs with FDR < 0.05).

Figure 5

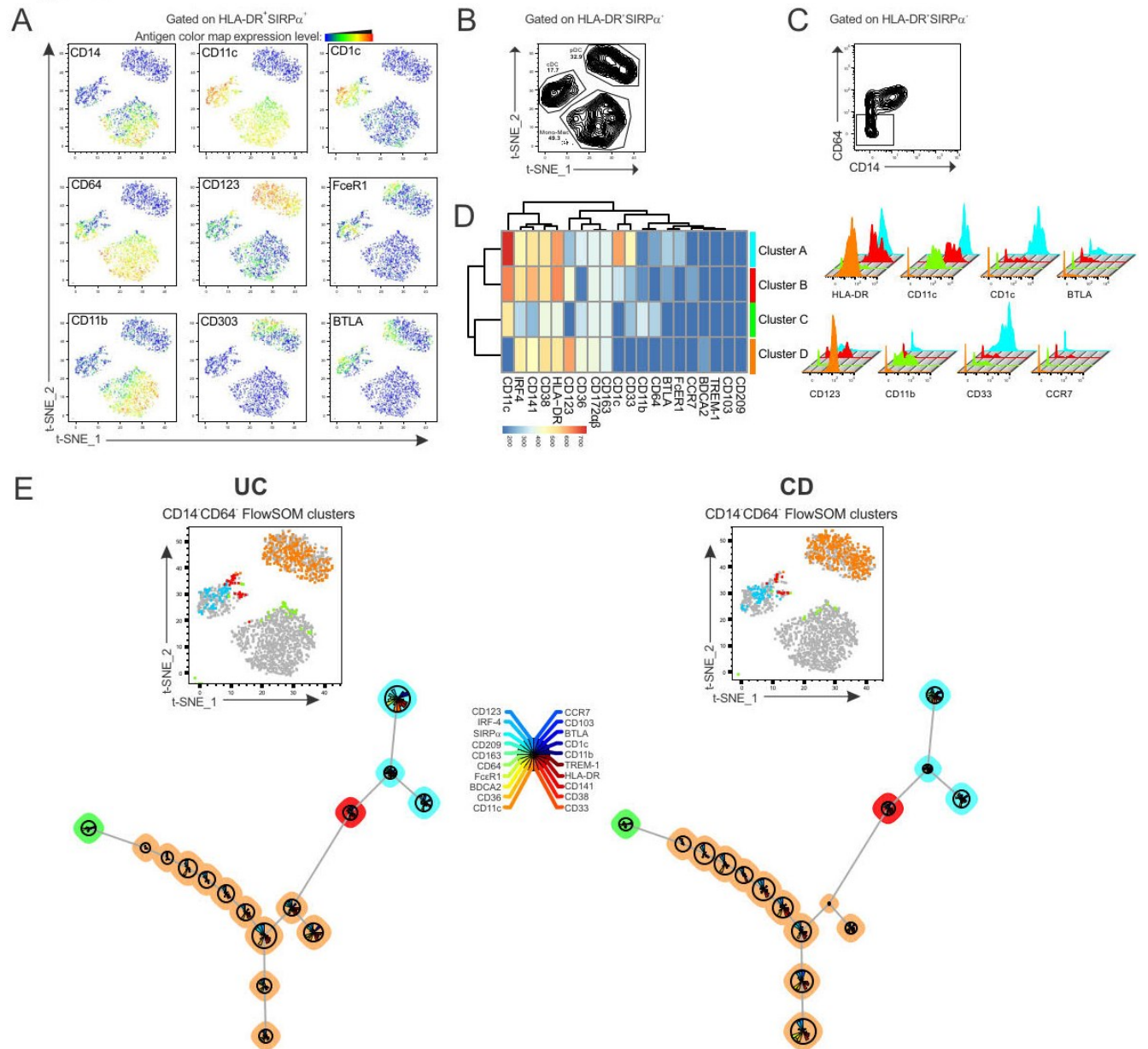


FIGURE C.4.5. HIGH DIMENSIONAL SINGLE CELL PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS OF CD14⁺CD64⁺HLA-DR⁺SIRPα⁺ MNPs IN MLNs OF UC AND CD

Cells isolated from MLNs were stained for CyTOF analysis. **A**. t-SNE analysis of concatenated HLA-DR⁺SIRPα⁺ population from 8 patients (4 UC and 4 CD). Expression feature plots of the indicated surface markers. **B**. Frequencies of pDC-like, cDC and Mono-Mac clusters in HLA-DR⁺SIRPα⁺ t-SNE plot. **C**. CD14⁺CD64⁺ subset gated on concatenated HLA-DR⁺SIRPα⁺ population. **D**. Heatmap and histogram overlays of indicated markers of clusters generated by FlowSOM analysis of concatenated CD14⁺CD64⁺ subset. **E**. FlowSOM analysis map of the combined CD14⁺CD64⁺ subset was applied on the concatenated CD14⁺CD64⁺ subset of only UC or CD to compare diseases. UC and CD FlowSOM clusters visualized on HLA-DR⁺SIRPα⁺ t-SNE plots, and as minimal spanning trees.

Figure 6

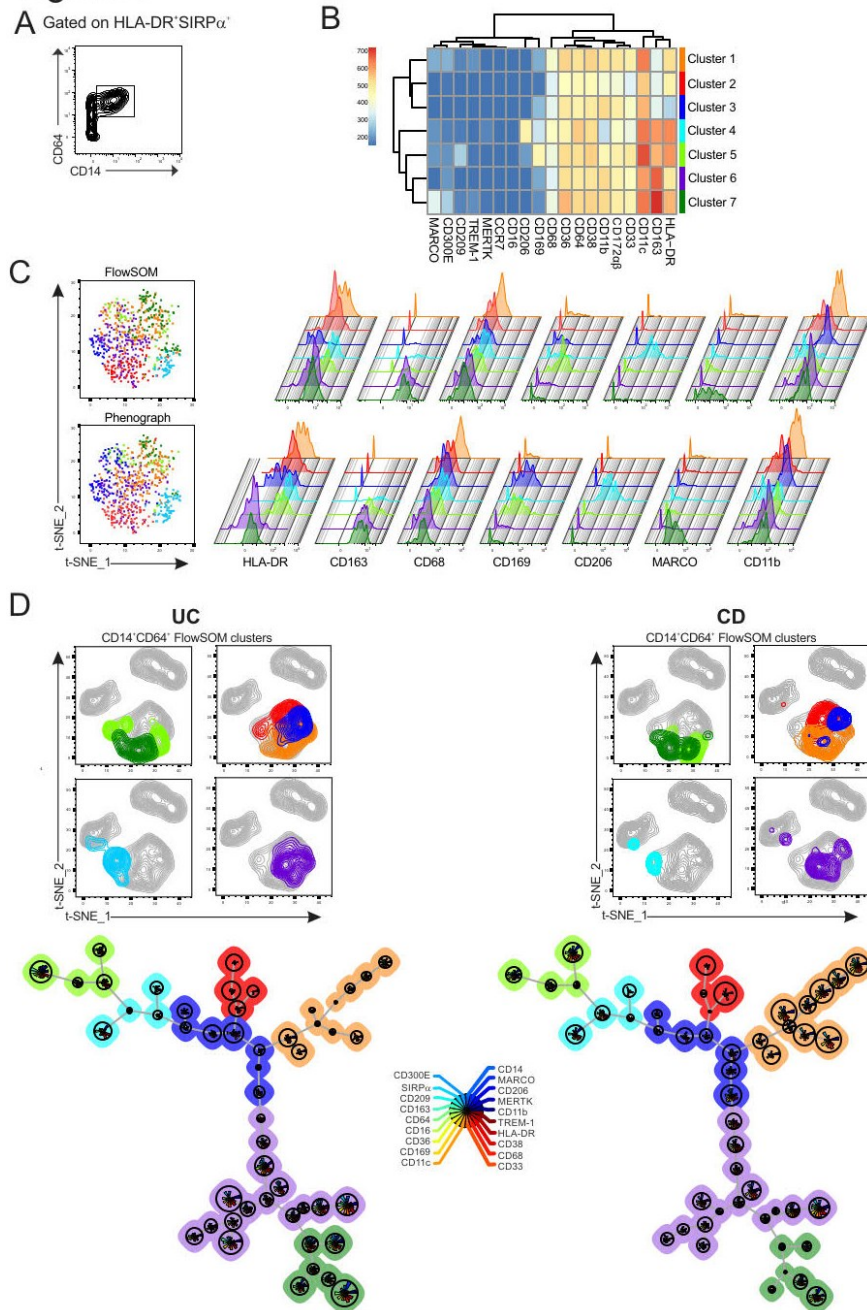


FIGURE C.4.6. HIGH DIMENSIONAL SINGLE CELL PROTEIN EXPRESSION ANALYSIS OF CD14⁺CD64⁺HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs IN MLNS OF UC AND CD PATIENTS

MLNs from 4 UC and 4 CD patients were stained for CyTOF analysis. **A.** CD14⁺CD64⁺ subset gated on concatenated HLA-DR⁺SIRP α ⁺ population. **B and C.** Concatenated CD14⁺CD64⁺ subset was subjected to *t*-SNE, FlowSOM and Phenograph analysis. Heatmap of FlowSOM clusters (B). FlowSOM and Phenograph clusters overlaid on *t*-SNE plots, and histogram overlays of the indicated markers from both algorithms are shown beside the corresponding plot (C). **D.** For the concatenated CD14⁺CD64⁺ subset of only UC or CD, FlowSOM analysis map of the combined CD14⁺CD64⁺ subset was applied to compare diseases. UC and CD FlowSOM clusters visualized on HLA-DR⁺SIRP α ⁺ *t*-SNE plots, and as minimal spanning trees.

Figure S1

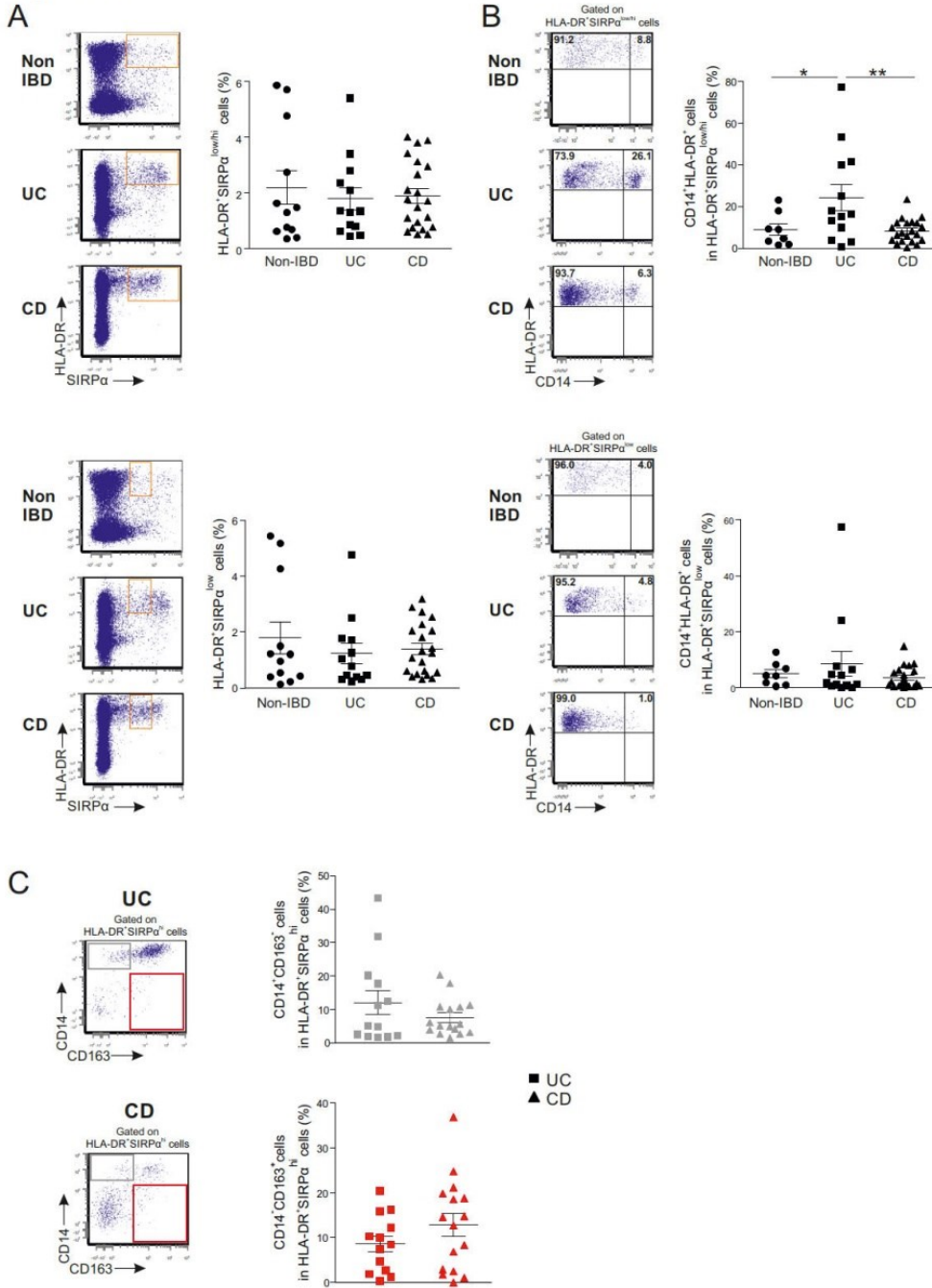


FIGURE C.4.S1. DISTRIBUTION OF HLA-DR⁺SIRPα^{LOW/hi} MNPs, CD14⁺CD163⁻ AND CD14⁺CD163⁺ CELLS IN MLNS OF UC AND CD PATIENTS

Representative dot plots and frequencies in MLNs of **A**. HLA-DR⁺SIRPα^{low/hi} and HLA-DR⁺SIRPα^{low} MNPs of control ($n=12$), UC ($n=13$) and CD ($n=21$), Kruskal Wallis test; **B**. CD14⁺HLA-DR⁺ in HLA-DR⁺SIRPα^{low/hi} and HLA-DR⁺SIRPα^{low} MNPs of control ($n=8$), UC ($n=13$) and CD ($n=21$), one way analysis of variance ($p<0.005$ for HLA-DR⁺SIRPα^{low/hi} cells) followed by Bonferroni's test ($*P<0.05$, $**P<0.01$) and **C**. CD14⁺CD163⁻ (top right panel) and CD14⁺CD163⁺ cells (bottom right panel) in HLA-DR⁺SIRPα^{hi} MNPs of UC ($n=13$) and CD ($n=15$), unpaired t -test.

Figure S2

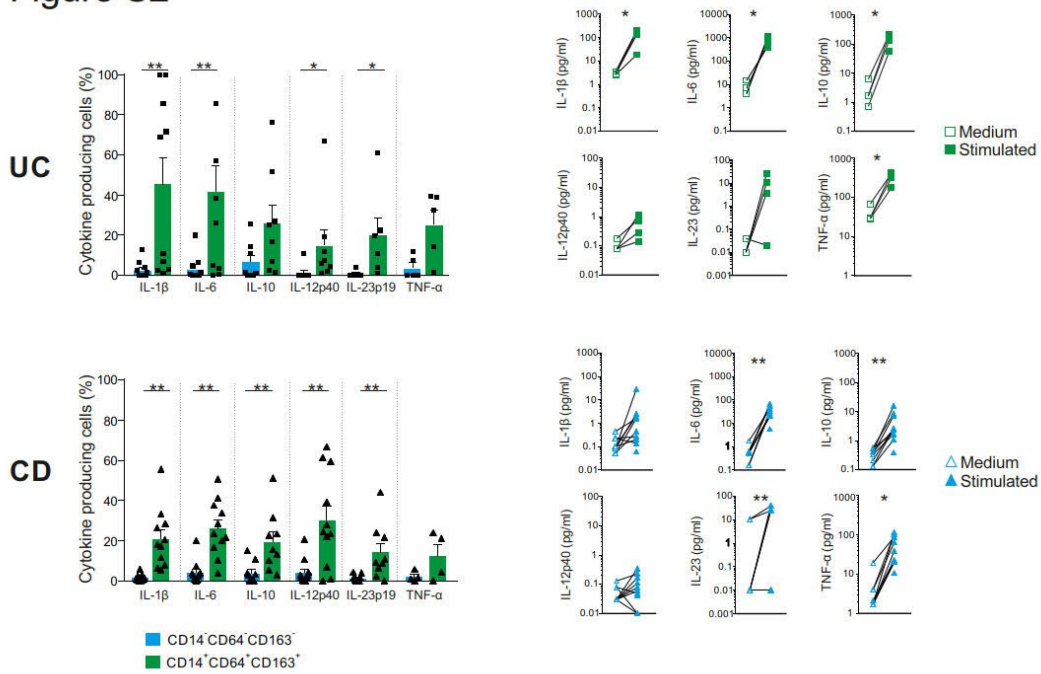


FIGURE C.4.S2. EX VIVO CYTOKINE PRODUCTION AND AFTER IN VITRO STIMULATION BY CD14⁺CD64⁻CD163⁻ AND CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPS FROM MLNS

A. Frequencies of *ex vivo* IL-1 β (UC $n=10$ and CD $n=11$), IL-6 (UC $n=8$ and CD $n=11$), IL-10 (UC $n=8$ and CD $n=9$), IL-12p40 (UC $n=8$ and CD $n=11$), IL-23p19 (UC $n=6$ and CD $n=9$), and TNF α (UC $n=5$ and CD $n=4$) producing CD14⁺CD64⁻CD163⁻ and CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs in UC and CD MLNs. **B.** Cytokine production by *in vitro* stimulated CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (UC) and CD14⁺CD64⁻CD163⁻ (CD) MNPs. **For A and B**, Wilcoxon signed rank test (* $P<0.05$, ** $P<0.01$).

Figure S3

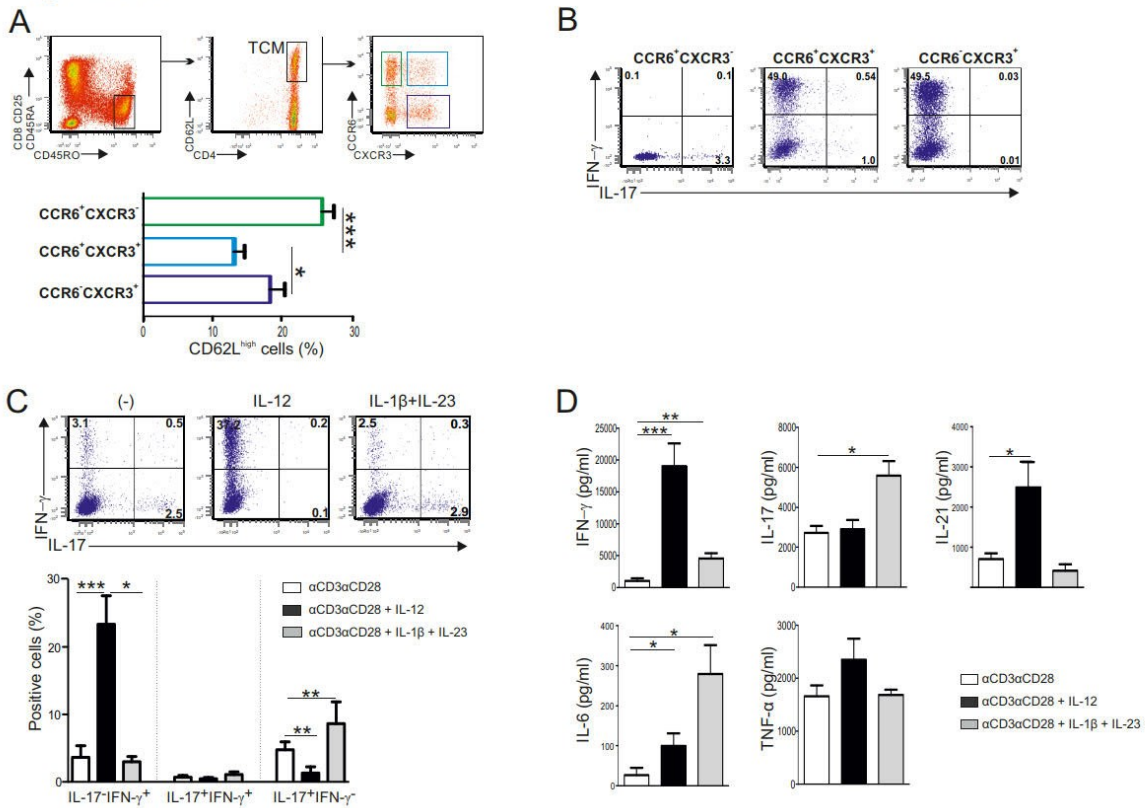


FIGURE C.4.S3. IL-12 BUT NOT IL-1 β PLUS IL-23 INDUCED PLASTICITY OF TH17 T_{CM} IN MLNS

A. Gating strategy for isolation of T_{CM} subsets from MLNs of CD patients. Distribution of Th1 (CCR6⁺CXCR3⁻), Th1/Th17 (CCR6⁺CXCR3⁺) and Th17 (CCR6⁻CXCR3⁺) T_{CM} subsets ($n=15$), Friedman test ($P<0.0003$) followed by Dunn's test ($*P<0.05$, $***P<0.001$). **B.** Freshly purified Th1, Th17/Th1 and Th17 were cultured for 4 hours with PMA-ionomycin and brefeldin A followed by intracytoplasmic staining for IFN- γ and IL-17. **C.** Purified Th17 were co-cultured with anti-CD3/CD28 coated beads, in the presence of IL-12 (10 ng/ml) or IL-1 β ng/ml + IL-23 (10 ng/ml) for 6 days followed by PMA-ionomycin for 6 hours and brefeldin A was added for the last 3 hours. Representative dot plots and bar graphs of intracytoplasmic staining for IFN- γ and IL-17 ($n=12$), Kruskal Wallis test ($P<0.0006$, $P<0.15$, $P<0.001$) followed by Dunn's test ($*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.001$). **D.** Multiplex Cytokines in culture supernatants measured by multiplex assay ($n=11$). Kruskal Wallis test followed by Dunn's test ($*P<0.05$, $**P<0.001$, $***P<0.001$).

Figure S4

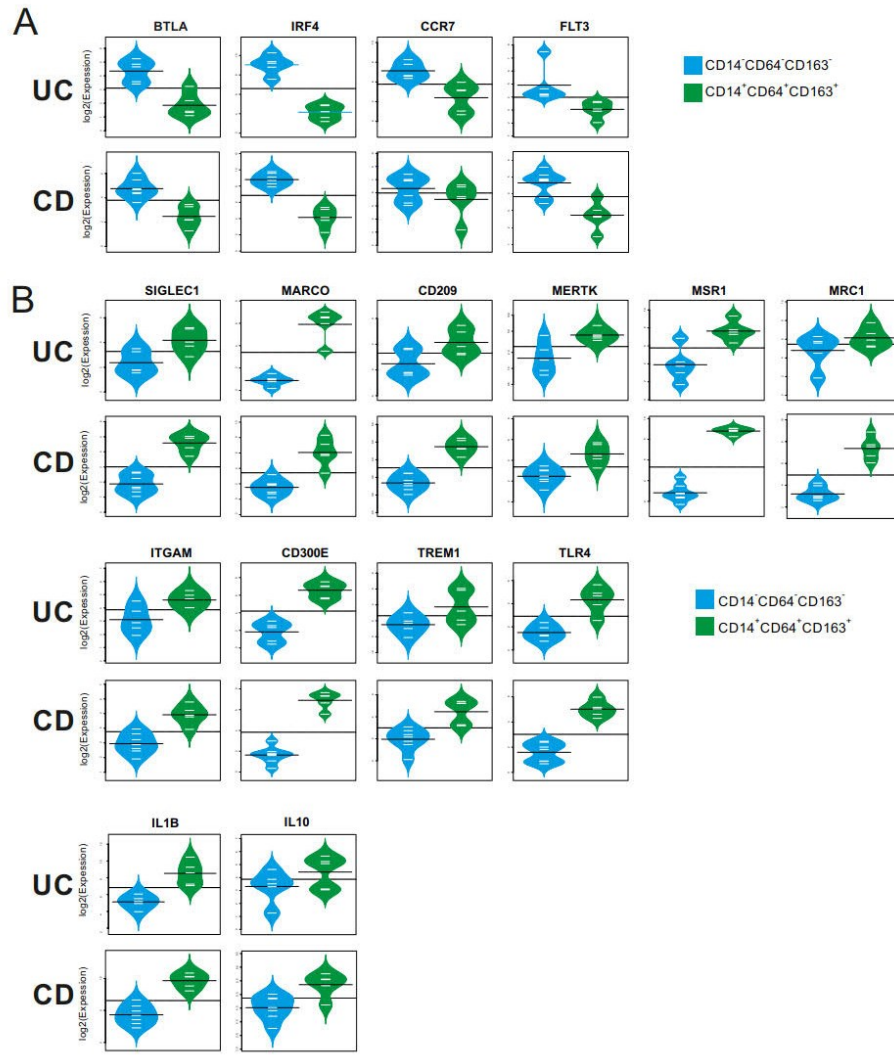


FIGURE C.4.S4. VIOLIN PLOTS OF GENE EXPRESSION LEVELS

Violin plots illustrate gene expression levels of upregulated (A) or downregulated (B) genes (y-axis, (log₂(Expression))) in CD14⁺CD64⁺CD163⁻ (blue) relative to CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (green) MNPs (x-axis).

Figure S5

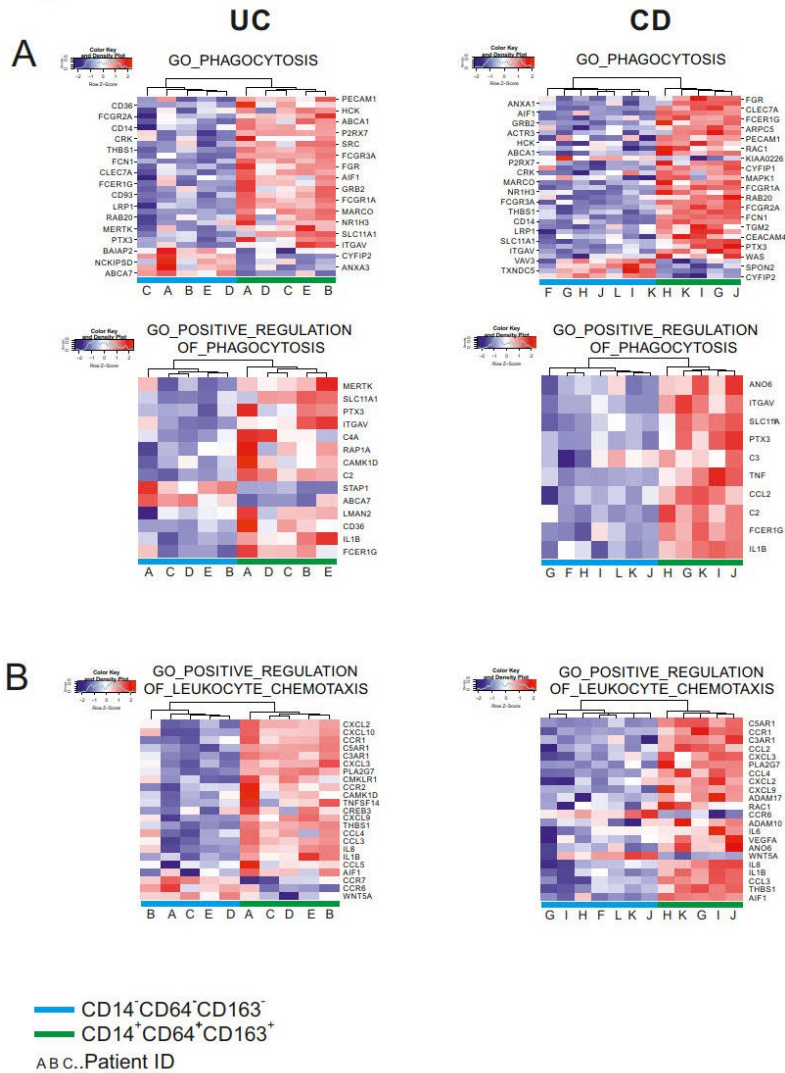


FIGURE C.4.S5. SHARED FUNCTIONAL PATHWAYS WITH CD14⁺CD64⁺CD163⁻ AND CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPS

Comparison of functional enrichment of regulated genes sets in CD14⁺CD64⁺CD163⁻ MNPs (downregulated genes in CD14⁺CD64⁺CD163⁻ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁺ MNPs with FDR < 0.05). Functional enrichment in pathways as indexed in GO database for **A.** phagocytosis and its regulation (GO:0006909; GO:0050766), and **B.** leukocyte chemotaxis (GO:0002690).

C.5. DISCUSSION

Lymph nodes are uniquely positioned at the interface between lymph and blood. Induction of immune response in MLNs results from interactions between resident or migratory MNPs, which carry antigen from peripheral intestinal tissues, and naïve or central memory T cells (Worbs et al., 2017). We showed here that a high frequency of CD14⁺HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs was a distinct feature of MLNs in UC. Although CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells displayed a common monocyte/M ϕ gene signature in UC and CD, single cell phenotypic analysis further revealed that UC, when compared to CD, MLNs were enriched in CD11b⁺CD68^{dim}HLA-DR^{dim}CD163⁺ cells, a phenotype that resembles tissue monocytes.

The CD14⁻CD64⁻CD163⁻ cells comprised conventional DCs (cDCs) and pDC-like clusters. In agreement with a previous study (Hostmann et al., 2013), pDCs predominated over cDCs in MLNs. Circulating CD123⁺CD303⁺CD11c⁻ pDCs represent a minor DC population, best characterized by *TCF4*, *IGJ*, *GZMB*, *SERPINF1* molecular signature (See et al., 2017; Villani and Satija, 2017). However, the selected CyTOF panel did not include AXL and SIGLE6 makers recently reported to best define the minor AXL⁺SIGLEC6⁺ (AS) DC population described as partially captured within the blood CD123⁺ pDC population (Villani and Satija, 2017). Thus, it remains possible that some of the CD123⁺ cells in MLNs (defined as CD11c⁻) are also comprising AS DCs. CCR7⁻Fc ϵ R⁺CD33⁺CD1c⁺ resident cDC2 that resembled circulating CD1cA/cDC2 are best defined by *FcerR*, *CD33* and *CD1c* expression using scRNAseq analysis (Villani and Satija, 2017). The minor CD14⁻CD64⁻CD11b⁻CD36⁻CD141⁺CD1c⁺CCR7⁺HLA-DR^{high} migratory cDC2s were also observed in UC and CD MLNs. In that regard, CD14⁻CD64⁻CD11b⁻DEC205⁺CD11c⁺CD1c⁺HLA-DR⁺ cells that are detected in lung draining LNs (LLNs)

express high levels of CCR7 and HLA-DR, and reside within the T-cell zone in close proximity to the B-cell zone (Desch et al., 2016). Granot et al examined a large cohort of deceased organ donors and reported that LLNs contain the highest frequencies of mature and migratory SIRP α ⁺CD1c⁺ cells when compared to other LNs, including MLNs, and their numbers remain stable over life (Granot et al., 2017). In the present study, we further identified CD14⁻CD64^{dim}CD11b⁺CD36⁺CD11c⁺ cells that were CD1c⁻ in both diseases. These cells share some characteristics with circulating CD11c^{dim}CD36⁺CD1c^{dim}CD1cB/DC3, which are identified as a separate cell subset in blood (Villani and Satija, 2017).

CD64⁻CD14⁻CD163⁻ cells primed naïve T cells and induced Th1 polarization in CD, a function likely attributed to cDC2 (resident or migratory) that are included in this cell population, since pDCs are devoid of the ability to present antigen (Villani and Satija, 2017). Naïve T cell priming and differentiation occurs in MLNs and likely not in gut tissue because these cells are rare in intestinal mucosa (Sathaliyawala et al., 2013). Th17 cell lineage plasticity has been demonstrated *in vivo* in mice (Griseri et al., 2012). In humans, Th17 clones generated from mucosal T cells that are isolated from gut of CD patients produce IFN- γ when cultured in presence of IL-12 (Annunziato et al., 2007). Here, we demonstrated that CD14⁻CD64⁻CD163⁻ DC enriched population also shifted Th17 T_{CM} into Th17/Th1 and Th1*. Thus, these results provide evidence that cDCs are implicated in the plasticity of Th17 T_{CM} towards Th17/Th1 in the MLNs.

Unexpectedly, the two common IBD could be distinguished by cell distribution and phenotype of CD14⁺HLA-DR⁺SIRP α ⁺MNPs subsets in MLNs. UC MLNs comprised the highest frequency of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells relative to CD. This population includes cells endowed with phagocytic activity, and resembled CD163⁺ M ϕ detected in axillary skin-draining LNs that are

capable of apoptotic cell uptake but do not induce proliferation of naïve T cells under homeostatic conditions (Haniffa et al., 2012; Segura et al., 2012). CD14⁺ cells could be subdivided into CD68⁺HLA-DR^{hi} M ϕ that either expressed CD163, MARCO, or CD169. CD169 expression defines subcapsular (SSM) and medullary (MSM) sinus M ϕ as opposed to paracortex M ϕ that express CD68 but not CD169 in humans and mice (Bellomo et al., 2018; Komohara et al., 2017). Furthermore, MSM are best defined as CD209⁺CD206⁺MARCO⁺CD169⁺ cells in murine LNs. In the present study, CD68⁺HLA-DR^{hi}CD163^{hi} M ϕ were subdivided into CD209⁺CD206⁺MARCO^{-dim}CD169⁺ (cluster 5) and CD209⁻CD206⁻MERTK⁺MARCO^{hi}CD169⁻ M ϕ (cluster 7). Therefore, cluster 7 might include MARCO^{hi}CD169⁻ T cell zone M ϕ (TZM), which appeared to be increased in UC relative to CD, and cluster 5 CD169^{hi}CD163^{hi} sinusoidal M ϕ . Noteworthy, depletion of CD169⁺ M ϕ in MLNs ameliorates DSS-induced UC-like colitis (Li et al., 2017a), suggesting a pro-inflammatory role for these M ϕ . An additional feature of MLNs resides in their capacity to restrict pathogen dissemination (Voedisch et al., 2009). This filtering function of LNs is attributed to CD169⁺ SSM that poorly support cytomegalovirus replication, and thus prevent spread of infection (Farrell et al., 2015). Finally, CD169⁺ M ϕ in MLNs contribute to anti-tumor immunity with high densities being associated with better prognosis in colorectal carcinoma (Ohnishi et al., 2013). Therefore, study of phagocytic CD169⁺ M ϕ in UC and CD MLNs warrants further investigation.

The high-dimensional phenotypic analysis provided further evidence that CD14⁺CD64⁺ population in IBD MLNs included, like in murine MLNs (Jakubzick et al., 2017), a large population of CD68^{-dim}HLA-DR^{dim} cells. Notably, UC MLNs comprised increased frequency of CD11b⁺CD68^{dim}HLA-DR^{dim}CD163⁺ cells when compared to CD, mostly contributing to their

enrichment in CD14⁺CD64⁺CD163⁺ monocyte/M ϕ . CD163⁺ monocyte-like cells in MLNs might represent either recently recruited circulating monocytes, that have not yet down-regulated CD163 or migratory mucosal inflammatory monocyte-like cells that acquired CD163 (Jakubzick et al., 2013). Adoptively transferred Ly6C^{hi} monocytes are retraced with similar kinetics in mucosa and MLNs in colitis, suggesting that monocytes enter MLNs directly from blood rather than migrating from the mucosa (Tamoutounour et al., 2012). However, CD11b⁺CX3CR1^{int} effector monocytes migrate from colon to MLNs during DSS-induced colitis (Zigmond et al., 2012), and dysbiosis favors the migration of murine mucosal CD103⁻CD14⁺ cells to MLNs in inflammatory conditions (Diehl et al., 2013). In that regard, MLNs are also the site of bacterial translocation and reduced microbial diversity is observed in IBD. Microbiota profiling of MLNs reveal differences between CD and UC patients with increased relative abundance of *Firmicutes* and *Proteobacteria* in UC and CD respectively (Kiernan et al., 2019). A differential gut dysbiosis in IBD patients is also reflected by an altered bacteria composition and lower diversity in CD relative to UC mucosa (Yilmaz et al., 2019).

To the best of our knowledge, no studies have yet examined the transcriptomic profile of HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNPs in human IBD MLNs. Here, we compared the molecular profile of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ monocyte/M ϕ -like cells and CD14⁻CD64⁻CD163⁻ enriched DCs using bulk RNAseq. Our study revealed that CD14⁺CD64⁺CD163⁺ population over-expressed, relative to DCs, genes that were previously reported in either M ϕ (*MAFB*, *CSFR1*, *C1QA*, *C1QB*, *C1QC*, *MRC1*, *MAF*, *STAB1*, *SLCO2B1*, *FOLR2*, *FCGR3A*, *C2*, *VSIG4*) or inflammatory monocyte-like cells (*CD300E*, *SERPINA1*, *FCN1*, *FPRI*, *S100A9*, *SLC11A1*, *THBS1*, *IL1RN*, *PLAUR*, *CCRL2*, *OLRI*, *EREG*, *ACSL1*) in inflamed colon of CD patients (Chapuy L, 2018). Noteworthy,

CD14⁺CD64⁺CD163⁺ subset did not display the gene signature of circulating monocytes (*SELL*, *CLEC4D*, *CD48* but no *MERTK* and *CD209* expression) while they shared molecular features with *in vitro* MCSF-derived human monocytes (*SEPP1*, *MERTK*, *CD169*, *CD163* expression) (Sander et al., 2017). In human tissue, monocytes are best defined by high *SI00A9*, *FCAR*, *SERPINB2*, *TNFAIP3* and low *CIQA/B*, *VSIG4*, *MARCO* gene expression relative to M ϕ in heart (Bajpai et al., 2018), and by *CD14*, *SI00A12*, *SI00A8/9*, *TREM* expression in gut under homeostatic conditions (Richter et al., 2018). Since CD11b⁺CD209⁻HLA-DR^{dim}CD163⁻ inflammatory monocyte-like cells expressing TREM and *FCAR/CD89* at protein and molecular levels, accumulate in inflamed relative to non-inflamed colon (Chapuy L, 2018), these cells may be included in the pool of recruited effector monocyte-like cells reported here (cluster 1) in inflamed MLNs.

Taken together, the distribution and detailed phenotypic characterization of MNPs in human MLNs revealed differences between UC and CD. UC MLNs comprised increased frequencies of CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells, that displayed a monocyte/M ϕ gene signature and predominantly included CD11b⁺CD68^{dim}HLA-DR^{dim} cells. Since MLNs are key lymphoid tissues in the initiation, perpetuation and resolution of pathogenic inflammatory responses, complementary RNA and protein expression are essential to better understand the potential contribution of MNPs to IBD immunopathogenesis. Although MLNs from IBD patients are difficult to access for research investigations, further imaging, functional and molecular analysis at the single cell level are warranted.

C.6. MATERIALS AND METHODS

Human clinical samples

All participants signed an informed consent form that had been approved by the Institutional Ethics Research Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. MLNs were acquired from surgical resections. Patient recruitment was based on clinical and histological criteria. UC patients presented with bloody stools, diarrhea, and abdominal pain. Endoscopically, they presented a continuous inflammation, extending from the rectum to the colon. CD patients presented with diarrhea, weight loss or abdominal pain. Histologically, the architecture of crypts was disturbed with the mucosa being infiltrated by mono or polynuclear cells, with or without pathognomonic granulomas in case of CD patients. No histological data or bacteriological infections suggested a differential diagnosis. Clinical information is shown in table S6. Cord blood, used for isolation of naïve CD4⁺ T cells, was obtained from healthy subjects.

Cell purification and staining

MLNs were digested mechanically as previously reported to obtain cellular suspensions (Baba et al., 2013). Staining for flow cytometry (10 parameters) and CyTOF (37 parameters) was performed using monoclonal antibodies listed in tables S7 and S8 respectively. Data were analyzed with either FCS Express 6 (DeNovo Software) or FlowJo version 10.5.3 (FlowJo, LLC, BD). Unsupervised analyses were performed using *t*-SNE (*t*-Distributed Stochastic Neighbor Embedding), FlowSOM (Flow cytometry data using self-organizing map) (Van Gassen et al., 2015) and Phenograph (Levine et al., 2015) plugins available in FlowJo. FlowSOM clusters visualized on *t*-SNE plots, and as minimal spanning trees. The trees depict the relative frequencies of all clusters since circle size is proportional to the number of cells in each node

with background color to indicate the cluster. Triangle size in star chart depicts the mean intensity of each marker for all cells assigned to the node. All algorithms were run at least 5 times to ensure reproducibility of cluster analysis.

Cell sorting

HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNPs were FACS sorted for morphologic, functional and transcriptomic studies according to the gating strategy depicted in Figure 2A. Human CD4⁺CD8⁻CD45RA⁺CD25⁻ naïve T cells were sorted from umbilical cord blood. Human CD4⁺CD45RO⁺CD62L^{high}CD8⁻CD45RA⁻CD25⁻ central memory T cells (T_{CM}) were sorted from MLNs of CD patients. T_{CM} were further stratified into CCR6⁺CXCR3⁻ (Th17 T_{CM}), CCR6⁻CXCR3⁺ (Th1 T_{CM}) and CCR6⁺CXCR3⁺ (Th17/Th1 T_{CM}) (Figure S3A). Cell isolation was performed using FACS Aria II cell sorter and data were analyzed using FACS Diva 6 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA).

Morphology

For morphological studies, FACS sorted MNPs were cytopun and stained according to Wright Stain procedure. Leica DM4000B microscope, equipped with Leica DFC300FX camera was used to visualize cells.

Phagocytosis assay

Sorted CD14⁻CD64⁻CD163⁻ and CD14⁺CD64⁺CD163⁺ cells were cultured with or without 1/100 FITC-labeled latex beads (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) in 96 well plates for 4

hours. Samples were quenched with trypan blue for 2 minutes. Negative control samples were kept at 4°C. Cells were analyzed by flow cytometry using FACS Aria II.

***Ex vivo* cytokine expression and ELISA**

Cells isolated from MLNs were immediately stained for CD45, HLA-DR, CD172 α (SIRP α), CD64 and CD163, in the absence of brefeldin A, then fixed/permeabilized and stained for intracytoplasmic cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-23 and TNF- α). FACS sorted HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNP subsets from UC and CD patients respectively, were cultured with peptidoglycan (PGN, 10 μ g/ml; Sigma Aldrich) for 36 hrs. Cytokines in culture supernatants were measured by multiplex assay (Eve Technologies, Calgary, AB, Canada).

Cell cultures

HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁺CD64⁺CD163⁺ and HLA-DR⁺SIRP α ⁺CD14⁻CD64⁻CD163⁻ MNP subsets were co-cultured with allogeneic CFSE-labeled naïve CD4⁺ T cells at different MNP/T cell ratios and cell proliferation was assessed by CFSE dilution. For Th cell polarization, allogeneic naïve CD4⁺ T cells were co-cultured with or without HLA-DR⁺SIRP α ⁺ MNP subsets isolated from MLNs at a 10:1 ratio for 6 days. Freshly isolated T_{CM} (Th17, Th1, or Th17/Th1) were cultured with PMA-ionomycin for 4 hours in the presence of brefeldin A, then fixed and stained for CD45, CD3, CD4, CD8 and CD25. For T_{CM} plasticity, Th17 T_{CM} cells were stimulated with anti-CD3/CD28 coated beads (Miltenyi Biotec), and a) cultured with either mouse IgG1 (10 μ g/ml) in the absence or presence of IL-12 (20 ng/ml, R&D system) or IL-1 β (10 ng/ml, R&D system) plus IL-23 (10 ng/ml, R&D system) for 6 days; or b) co-cultured with autologous MNP subsets

purified from CD MLNs at a 10:1 ratio for 6 days in the presence of PGN (10 µg/ml). For all cultures: a) RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum and 1% Penicillin/Streptomycin was used; b) for intracytoplasmic staining, cells were stimulated *ex vivo* or after culture, with PMA-ionomycin for 6 hours, brefeldin A was added for the last 3 hours, then fixed and stained with CD3 monoclonal antibody followed by intracytoplasmic staining for IL-17 and IFN- γ .

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Two-tailed Wilcoxon signed rank test, unpaired t-test, Friedman test followed by Dunn's test, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test, one way analysis of variance followed by Bonferroni test was used as indicated. For all tests, 1 star means $P < 0.05$, 2 stars mean $P < 0.01$, and 3 stars mean $P < 0.001$. Bar graph data are shown as mean \pm SEM.

RNA-sequencing

RNA-sequencing: data analysis

A differential expression analysis was performed using RNA-sequencing data counts for 23686 genes. The count dataset was produced from two experimental batches so the batch removal procedure from the limma R package had to be used. Samples having less than 6000 genes expressed as well as an outlier revealed by PCA (Principal Component Analysis) were removed. Genes with no observable expression count for less than half of the samples were also removed from the dataset. A TMM (trimmed mean of M values) normalization (EdgeR package) was then applied to the remaining 12231 genes on all samples.

A differential expression analysis was performed on all samples with limma. Contrast matrix was applied to assess for the differential expression of FACS-sorted CD14⁻CD64⁻CD163⁻ versus CD14⁺CD64⁺CD163⁺ populations from MLNs of 5 UC and 7 CD patients, respectively. Gene set enrichment analysis was obtained using the regression data from limma using the camera algorithm (Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation) to scan the publicly available MySigDB database. R package Gplots was used to generate heatmaps of significant pathways.

RNA-sequencing: reverse transcription

Samples were thawed on ice for 2 minutes, then centrifuged at 2,500 rpm at 4°C for 1 minute and normalized to same concentration range. 1.9 µL of normalized RNA concentration for each sample was moved to a full-skirt 96-well plate (Eppendorf). Each sample was mixed with 1 µL 10 µM RT primer [5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3', IDT], 1 µL 10 mM dNTP [New England BioLabs], 0.1 µL Recombinant Rnase-Inhibitor [40 U/µL, Clontech], and 1.9 µL nuclease-free water.

The samples were denatured at 72° C for 3 minutes and placed immediately on ice afterwards. 7µL of the Reverse Transcription Mix was subsequently added in every well, consisting of: 2 µL 5x RT buffer [Thermo Fisher Scientific], 2 µL 5 M Betaine [Sigma-Aldrich], 0.9 µL 100 mM MgCl₂ [Sigma-Aldrich], 1 µL 10 µM TSO [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G-3', Exiqon], 0.25 µL Recombinant Rnase-Inhibitor [40 U/µL, Clontech], 0.1 µL Maxima H Minus Reverse Transcriptase [200 U/µL, Thermo Fisher Scientific], and 0.75 µL nuclease-free water. Every well was well mixed with the

resuspended beads. Reverse transcription was carried out by incubating the plate at 50°C for 90 minutes, followed by heat inactivation at 85°C for 5 minutes.

RNA-sequencing: PCR pre-amplification and cDNA purification

14 μL of PCR Mix was added in each well (0.5 μL 10 μM PCR primer [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', IDT], 12.5 μL 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix [KAPA Biosystems], 1 μL nuclease-free water), for a final PCR reaction volume of 25 μL . The reaction was carried out with an initial incubation at 98°C for 3 minutes, followed by 21 cycles of (98°C for 15 seconds, 67°C for 20 seconds, and 72°C for 6 minutes) and a final extension at 72°C for 5 minutes.

PCR products were purified by mixing them with 20 μL (0.8X) of Agencourt AMPureXP SPRI beads (Beckman-Coulter), followed by a 6 minute incubation period at room temperature. The plate was then placed onto a magnet for 6 minutes prior to removing the supernatant. SPRI beads were washed twice with 100 μL of freshly prepared 70% ethanol, with care being taken to avoid loss of beads during the washes. Upon removing all residual ethanol traces, SPRI beads were left to dry at room temperature for 10 minutes. The beads were then resuspended in 20 μL of TE buffer (Teknova) and incubated at room temperature for 5 minutes. The plate was placed on the magnet for 5 minutes prior to transferring the supernatant containing the amplified cDNA to a new 96-well plate. This cDNA SPRI clean-up procedure was repeated a second time to remove all residual primer dimers. The concentration of amplified cDNA was measured on the Synergy H1 Hybrid Microplate Reader (BioTek) using the Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific).

RNA-sequencing: library preparation

Library preparation was carried out using the Nextera XT DNA Sample Kit (Illumina) with custom indexing adapters, allowing 384 single cell libraries to be simultaneously generated in a 384-well PCR plate (Eppendorf). For each library, the amplified cDNA was normalized to a 0.15-0.20 ng/ μ L concentration range. The tagmentation reaction consisted of mixing 0.625 μ L of normalized cDNA with 1.25 μ L of Tagmentation DNA (TD) Buffer and 0.625 μ L of Amplicon Tagment enzyme Mix (ATM). The 2.5 μ L reaction was incubated at 55°C for 10 minutes and then immediately placed on ice upon completing this incubation step. The reaction was quenched with 0.625 μ L of Neutralize Tagment (NT) Buffer and incubated at room temperature for 10 minutes. The libraries were amplified by adding 1.875 μ L of Nextera PCR Master (NPM) Mix, 0.625 μ L of 10 μ M i5 adapter (5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC-3', IDT, where [i5] signifies the 8 bp i5 barcode sequence (see below for sequences)), and 0.625 μ L of 10 μ M i7 adapter (5'CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT[i7]GTCTCGTGGGCTCGG -3', IDT, where [i7] represents the reverse-complement of the 8 bp i7 barcode sequence (see below for sequences)). The PCR was carried out at an initial incubation at 72°C for 3 minutes, 95°C for 30 seconds, followed by 12 cycles of (95°C for 10 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute), and a final extension at 72°C for 5 minutes. Following PCR amplification, 2.5 μ L of each library were pooled together in a 2.0 mL Eppendorf tube. The pool was mixed with 864 μ L (0.9X ratio for 2.5 μ L of 384 cells pooled together) of Agencourt AMPureXP SPRI beads (Beckman-Coulter) and incubated at room temperature for 5 minutes. The pool was then placed on a magnet (DynaMag-2, Life Technologies) and incubated for 5 minutes. The supernatant was removed and the SPRI beads were washed twice with 1 mL of freshly prepared 70% ethanol.

Upon removing all residual ethanol traces, the SPRI beads were left to dry at room temperature for 10 minutes. The beads were resuspended in 100 μ L of nuclease-free water and incubated at room temperature for 5 minutes. The tube was then placed back on the magnet for 3 minutes prior to transferring the supernatant to a new 1.5 mL Eppendorf tube. This SPRI clean-up procedure of the library was repeated a second time to remove all residual primer dimers, using the same approach. The concentration of the pooled libraries was measured using the Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), and the library size distribution measured on a High-Sensitivity Bioanalyzer Chip (Agilent). Pooled samples were sequenced as paired-end on a NextSeq 500 sequencing system (Illumina) using the 75 cycles NextSeq 500/550 High Output kit v2 (catalog number FC-404-2005).

i5 barcodes: AAGTAGAG, ACACGATC, CTCTACTT, TCCTTGGT, TGTTCGGA

i7 barcodes: AGTTGCTT, AATGTTCT, CACATCCT, AAGACACT, TGTCGGAT, TCGCCTTG, AGCAATTC, TCTCGGTC, AACTTGAC, ACTAAGAC, AGGTGCGA.

RNA-sequencing alignment and quantification

Libraries were sequenced to an average depth of 568,867 paired-end reads of length 37 base pairs (bp). The reads were mapped to the UCSC human transcriptome (genome build hg19) using Bowtie 2 (version 2.1.0.0 (Langmead and Salzberg, 2012)) and expression levels of all genes were quantified using RSEM (version 1.2.8 (Li and Dewey, 2011)). On average 38% of the reads mapped to the transcriptome in each sample passing QC (see below, range 24.4-48.4%). RSEM yielded an expression matrix of inferred gene counts, which was converted to TPM (transcripts per million) values and then \log_2 -transformed after the addition of 1 to handle zero count values.

D. BASOPHILS ACCUMULATE IN CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS AND
AUGMENT MESENTERIC LYMPH NODE T HELPER CELL RESPONSES

Laurence Chapuy, MD¹, Marwa Bsati, MSc¹, Heena Mehta, PhD¹, Manuel Rubio, BSc¹, Keiko Wakahara, MD, PhD², Vu Quang Van, PhD¹, Nobuyasu Baba, PhD³, Cheolho Cheong, PhD⁴, Yun Tae Jin, MSc⁴, Benoît Panzini, MD⁵, Ramses Wassef, MD⁶, Carole Richard, MD⁶, Raja Tamaz, MD⁵, Geneviève Soucy, MD⁷, Guy Delespesse, MD, PhD⁸ and Marika Sarfati, MD, PhD¹

Immunoregulation¹ and Allergy⁸ Laboratories, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Canada,
Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan²,
Center for Innovative and Translational Medicine, Kochi University Medical School, Kochi, Japan³,
Cellular physiology and Immunology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal, Montréal, Canada⁴,
Department of Gastroenterology⁵, Department of Digestive tract surgery⁶ and Department of Pathology⁷, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Montréal, Canada.

Published in J Allergy Clin Immunol, 2014 October: 134(4):978-81.e1.

doi: 10.1016/j.jaci.2014.05.025.

D.1. ABSTRACT

Basophils, a rare population of granulocytes, are involved in the effector phase of Th2-dependent allergic and parasitic diseases. Their role in IgE-independent inflammatory bowel diseases (IBD) remains unclear. We examined the frequency of basophils in Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), and investigated the impact of basophils on effector function of memory T cells isolated from mesenteric lymph nodes (MLNs) of IBD patients. Basophils and memory T cells were quantified using multicolor flow cytometry-based method in the blood and colonic mucosa of CD and UC patients. Basophils were co-cultured with three memory CD45RO⁺CD4⁺T cell subsets isolated from mLN or blood: CD62L⁺CCR7⁺ central memory

(T_{CM}) cells, CD62L⁻CCR7⁻ effector memory (T_{EM}) cells and CCR7⁺ T_{EM}. Cytokine profile was determined using intracytoplasmic staining and ELISA. Basophils were increased in the blood of CD and UC patients and accumulated in inflamed colon. They promoted the emergence of IL-17⁺/IFN γ ⁺ and IL-17⁺/IFN γ ⁻ but not single IFN γ ⁺ cells in memory T cells isolated from MLNs. Basophils increased memory Th2 and Th9 responses, but did not induce Th17/Th2 or Th17/Th9 responses. The minor population of CCR7⁺ T_{EM}, which is prone to egress tissues and re-circulate, was the preferential target of basophils among the two T_{EM} subsets. In conclusion, basophils accumulate in inflamed colon of CD and UC patients and augment Th17/Th1 responses, a hallmark of IBD, in mLN CCR7⁺ T_{EM} and T_{CM} subsets. Basophils may contribute to aggravation and flare up of the disease and thus represent an attractive therapeutic target for IBD patients.

D.2. INTRODUCTION

Basophils is a rare population of granulocytes accounting for only 0.5-1% of circulating leukocytes; along with eosinophils and mast cells, they have long been considered as effector cells in allergic diseases and helminthic infections (Schroeder, 2011; Siracusa et al., 2013). Basophils and mast cells belong to distinct cell lineages. Basophils are short-lived circulating cells (estimated half-life of 2 days) that essentially differentiate and mature in the bone marrow (BM) whereas mast cells leave the BM as CD34⁺ precursors, then differentiate and mature in peripheral tissues. Allergic inflammation is orchestrated by Th2 lymphocytes and associated with IgE antibody production (Siracusa et al., 2013). Basophils express high levels of the tetrameric form of high affinity receptor for IgE (Fc ϵ R1) and, are an important source of histamine which is contained in their basophilic granules and rapidly released following Fc ϵ R1 crosslinking by IgE-antigen complexes. IL-3 is important but not obligatory for basophils differentiation, because IL-

3-deficient mice display normal basophilia (Lantz et al., 1998; Siracusa et al., 2011). Indeed, thymic stromal lymphopoietin (TSLP) promotes basophil hematopoiesis and supports type 2 inflammation in IL-3-deficient mice (Siracusa et al., 2011). Interestingly, TSLP-induced basophils are key to the induction and perpetuation of experimental eosinophilic esophagitis (EoE), which may be triggered in the absence of IgE and mast cells (Noti et al., 2013).

Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) are the most common chronic inflammatory bowel diseases (IBD). They share some clinical and pathological characteristics but are clearly distinct entities (Xavier and Podolsky, 2007) that are associated with Th1 and Th17 or Th17 and type 2 responses, respectively (Fuss et al., 2004; Kaser et al., 2010; Kobayashi et al., 2008). In addition to activated T cells, the inflammatory infiltrate observed in IBD was commonly described as being comprised of neutrophils, macrophages and dendritic cells (Pelletier et al., 2010), while the contribution of basophils has remained largely unappreciated. We have previously shown that basophils can be detected in inflamed colons of a pool of IBD donors and that basophil-derived histamine is required but not sufficient to promote memory Th17 and Th2 responses using human peripheral blood T cells of control subjects (Wakahara et al., 2012; Wakahara et al., 2013). However, lymphoid tissues represent the major site of memory T cells in the body, when compared to circulating pool (Farber et al., 2013). Activation of T lymphocytes and generation of functionally distinct antigen-experienced T cells, such as effector memory $CCR7^-$ (T_{EM}) and central memory $CCR7^+$ (T_{CM}) T cells occur in lymph nodes (Masopust and Schenkel, 2013). Furthermore, a small number of tissue memory T_{EM} express $CCR7$; these cells are prone to exit the tissues and re-circulate (Bromley et al., 2013; Debes et al., 2005).

In order to appreciate the contribution of basophils to CD and/or UC pathogenesis, it is therefore essential to examine basophils in both diseases separately, as well as to investigate their

impact on T cells isolated from lymphoid tissues of CD and UC patients. The present study aimed to analyze the number of basophils in blood as well as in uninvolved and involved colonic mucosa of patients with CD or UC. We also investigated their ability to regulate the function of memory T cells subpopulations that include T_{CM} as well as $CCR7^-$ and $CCR7^+$ T_{EM} subsets isolated from mLNs of IBD patients.

D.3. RESULTS

D.3.1. BASOPHILS INCREASE IN BLOOD AND INFLAMED TISSUES OF CD AND UC PATIENTS.

Basophils can be quantified in blood as $Fc\epsilon RI^{high}CD172a^{low}CD123^+$ cells that exclude $Fc\epsilon RI^{low}CD172a^{high}$ dendritic cells from the FACS analysis gating (Foster et al., 2003; Wakahara et al., 2012). Using this experimental approach, we here examined the basophilic responses in blood of IBD patients and found that the percentage of basophils was significantly higher in blood of IBD patients when compared to control (non-allergic and non-IBD) as well allergic subjects (Figure 1a). The two main subtypes of IBDs are Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC) (Kaser et al., 2010). Basophils increased equally in blood of CD and UC patients as compared to control subjects (Figure 1b). We next assessed whether increased basophilia was associated with their recruitment to intestinal CD or UC tissues. Our flow cytometry-based basophil detection method was validated to identify and quantify tissue basophils since the frequency of $Fc\epsilon RI^{high}CD172a^{low}CD123^+c-kit^-$ cells and $HLA-DR^-CD123^+$ cells were significantly correlated in gut mucosa (data not shown). Morphological studies of FACS-sorted cells from intestinal tissues further demonstrated that basophils could be clearly discriminated from mast cells (Figure 1c). Basophils, but not $Fc\epsilon RI^{high}CD172a^{low}CD123^-c-kit^+$ mast cells accumulated in inflamed CD as well as UC tissues when compared to non-inflamed mucosa

(Figure 1d). Notably, no basophils could be detected in healthy colons of control donors, suggesting a preferential recruitment or survival of these rare cells at inflamed mucosal sites in the two types of IBD patients. The accumulation of basophils occurred in inflamed colons in untreated and treated (5-ASA, steroids, immunosuppressive agents and/or biologic modifiers) IBD donors (Figure 1e). We also compared the expression of the basophil activation marker CD203c (Ono et al., 2010) as well as FcεRI expression in blood and tissues of IBD patients and found similar expression levels in CD and UC patients at both sites (data not shown). As the percentages of blood and tissue basophils in both diseases were not correlated (Figure 1f), we could exclude the possibility that the accumulation of basophils in inflamed tissues simply reflects an increase of basophils in blood vessels of IBD tissues. Collectively, these data demonstrate that basophils increase in blood as well as inflamed colonic mucosa of patients with two distinct IgE-independent intestinal disorders, i.e. CD and UC.

D.3.2. BASOPHILS PROMOTE TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES BY MEMORY CD4 T CELLS FROM MESENTERIC LYMPH NODES OF IBD PATIENTS.

We previously reported that blood basophils increased Th17 responses in autologous or allogeneic memory CD4 T cells isolated from peripheral blood of control subjects (Wakahara et al., 2012). Here, we decided to evaluate whether basophils promoted IL-17 production in memory CD4 T cells isolated from draining mLNs that represent a more biologically relevant site of T cell activation than blood. To this end, we examined the effect of blood or tissue basophils on allogeneic or autologous lymphoid T_{CM} and T_{EM}, since circulating and tissue basophils did not differ phenotypically. Basophils only transit through the mLNs (Sokol et al., 2008). In that context, basophils were only detected in mLNs in 2 out of 10 IBD patients examined. Our data indicate that, regardless of their origin (blood, colon or mLNs), basophils

increased IL-17 production and promoted the emergence of IL-17⁺/IFN γ ⁺ and IL-17⁺/IFN γ ⁻ but not IL-17/IFN γ ⁺ cells in T_{CM} (Figures 2a and 2b) and T_{EM} (Figure 2c) cells isolated from IBD mLNs, corroborating our earlier report with circulating T cells of non IBD donors.

D.3.3. BASOPHILS INCREASE MEMORY TH2 AND TH9 RESPONSES BUT DO NOT PROMOTE THE EMERGENCE OF IL-17⁺IL-4⁺ OR IL-17⁺ IL-9⁺ MEMORY T CELLS.

Double IL-17⁺IFN γ ⁺ cells are a hallmark of CD (Annunziato et al., 2007) whereas IL-17⁺IL-4⁺ cells are increased locally in lung chronic inflammatory diseases (Cosmi et al., 2010). These double cytokine-producing cells may contribute to disease pathogenesis. Th1 and Th17 or Th17 and type 2 responses are associated with CD and UC, respectively (Fuss et al., 2004; Kaser et al., 2010; Kobayashi et al., 2008). Since basophils promoted Th1/Th17 responses, this prompted us to investigate whether basophils increase double positive IL-17⁺IL-4⁺ CD4 T cells isolated from mLNs of IBD patients. Indeed, basophils increased IL-4⁺ CD4 T cells but did not induce IL-17/IL-4-secreting CD4 T cells after 2 or 5 days co-culture (Figures 3a and 3b). These results corroborate our previous observations that basophils increased IL-4 in human memory CRTH₂⁺ T cells (Wakahara et al., 2013) that are detected in colonic mucosa of UC patients (Matsuzaki et al., 2003). Interestingly, basophils also augmented Th9 response (Figure 3c) with peak secretion at day 2 (data not shown). Furthermore, double positive IL-17⁺IL-9⁺ cells have been described in autoimmune diseases (Beriou et al., 2010) but basophils failed to induce IL-17⁺IL-9⁺-secreting cells (Figure 3d). Altogether, basophils did not favor the emergence of double positive IL-17⁺IL-4⁺ or IL-17⁺IL-9⁺ cells in either T_{CM} or T_{EM} (data not shown) but promoted pathogenic IL-17⁺IFN- γ ⁺ cells as well as Th2, Th9 and Th17 responses.

D.3.4. BASOPHILS PROMOTE TH17 AND TH17/TH1 RESPONSES BY CCR7⁺ BUT NOT CCR7⁻ T_{EM} SUBPOPULATIONS

T_{EM} (CD62L^{low}) can be further subdivided into two subsets according to CCR7 expression (Sathaliyawala et al., 2013),(Kryczek et al., 2011b), with resident CCR7⁻ T_{EM} predominating over recirculating CCR7⁺ T_{EM} populations in inflamed colons but not mLNs in IBD donors (Figure 4a). Therefore, we asked whether basophils targeted both subsets of T_{EM}. Unexpectedly, we demonstrated that basophils augmented the percentage of IL-17⁺IFN γ ⁻ and IL-17⁺IFN γ ⁺ cells in CCR7⁺ but not CCR7⁻ T_{EM} cells (Figure 4b), and most particularly in CCR7⁺CCR6⁺ T_{EM} subsets (data not shown). In contrast, basophils tended to increase IL-4⁺ and IL-9⁺ cells in CCR7⁺ as well as CCR7⁻ T_{EM} cells (Figures 4c and 4d). Similar to what has been seen for T_{CM} cells (Figure 3), basophils did not induce Th17/Th2 or T_H17/T_H9 responses in either T_{EM} cell subsets.

Collectively, we propose that basophils amplify the effector function of CCR7⁺ T_{EM} cells that have the potential to exit tissues *en route* to lymph nodes and, together with T_{CM}, recirculate and infiltrate unaffected areas of IBD mucosa (Lira, 2005). Thus, tissue basophils may contribute to the aggravation and flare up of IBD.

D.4. FIGURES

Figure 1

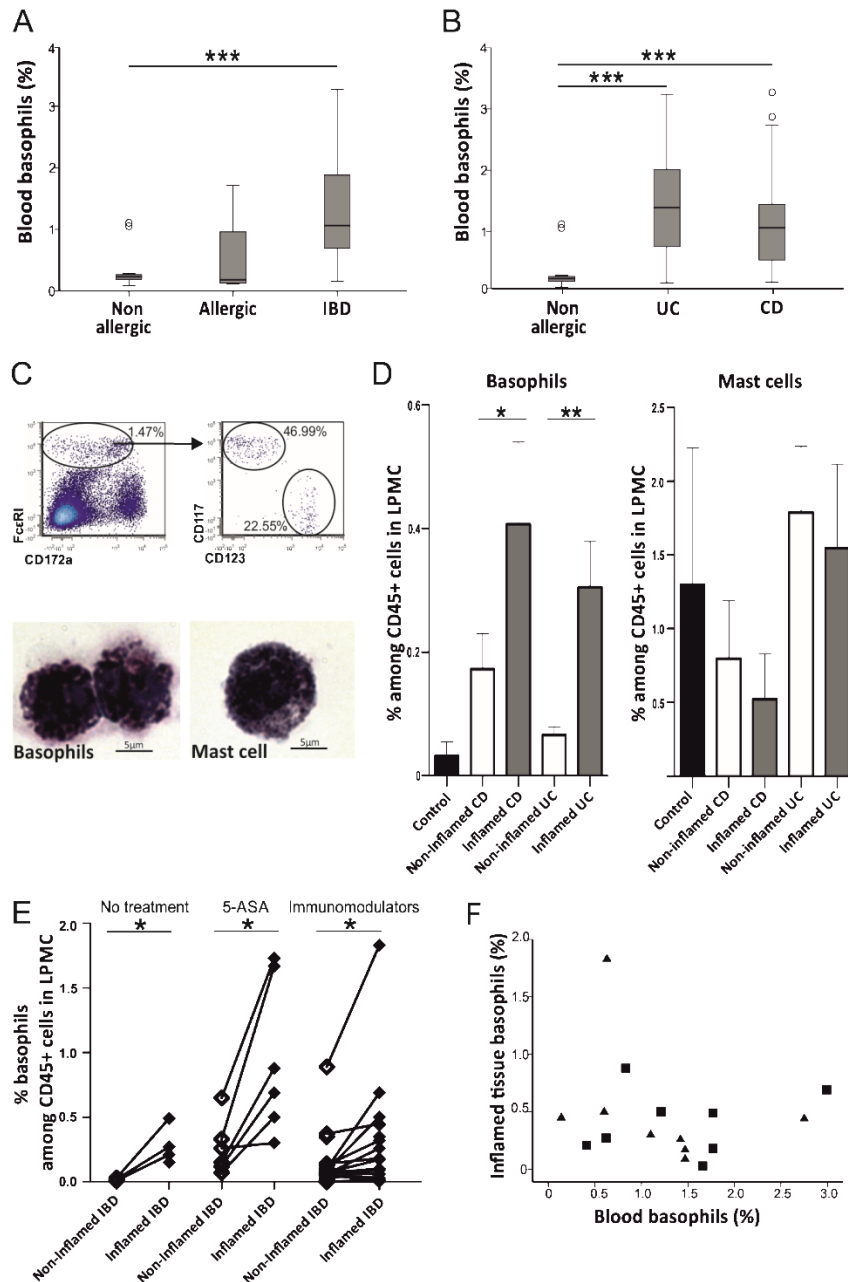


FIGURE D.4.1. ACCUMULATION OF BASOPHILS IN THE BLOOD AND INFLAMED MUCOSA OF IBD PATIENTS

(A-B) The frequency of basophils ($Fc\epsilon R1^{high}CD172a^{low}CD123^{+}$) is shown in the blood of non-allergic ($n=8$), allergic ($n=5$) or IBD (A), UC ($n=9$) and CD ($n=9$) (B). (C) Morphology and (D-E) percentage of basophils and mast cells among $CD45^{+}$ cells in LPMC from CD ($n=17$), UC ($n=11$) and control non IBD ($n=4$) (D), untreated and treated IBD (E). (F) Correlation between the percentage of inflamed tissue and blood basophils (CD: triangle and UC: square).

Figure 2

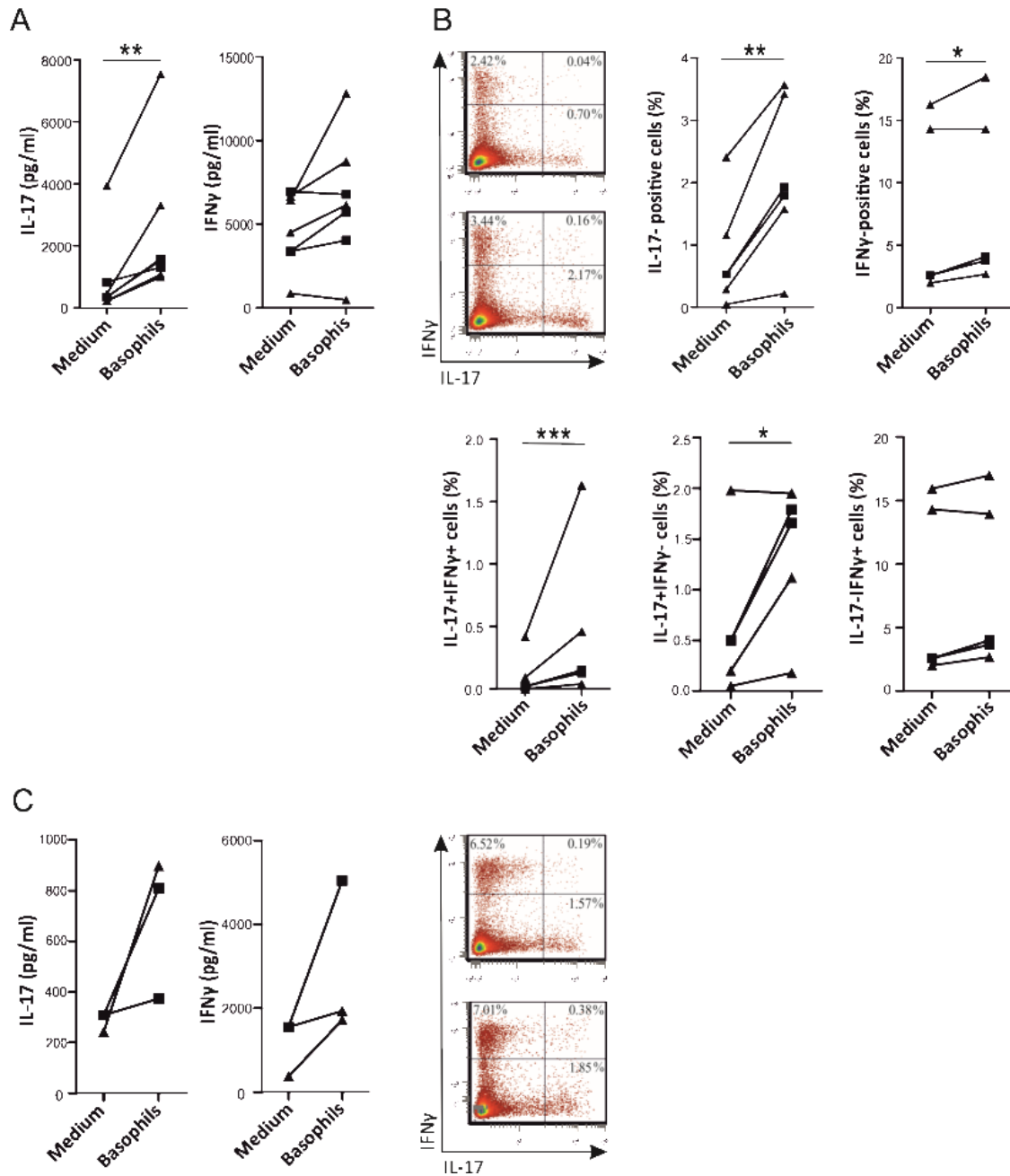


FIGURE D.4.2. BASOPHILS INCREASE IL-17 AND IFN γ PRODUCTION BY CENTRAL MEMORY (T_{CM}) AND EFFECTOR MEMORY (T_{EM}) CD4 T CELLS FROM THE MLNS OF IBD PATIENTS

T_{CM} (A-B) and T_{EM} (C) from mLNs of CD (triangle) and UC (square) patients were co-cultured with or without autologous or allogeneic basophils from blood (n=8), LPMC (n=1) in the presence of IL-3 and IL-33. Production of IL-17 and IFN γ (pg/ml) (ELISA) and frequency of IL-17⁺ and/or IFN γ ⁺ cells (intracytoplasmic staining).

Figure 3

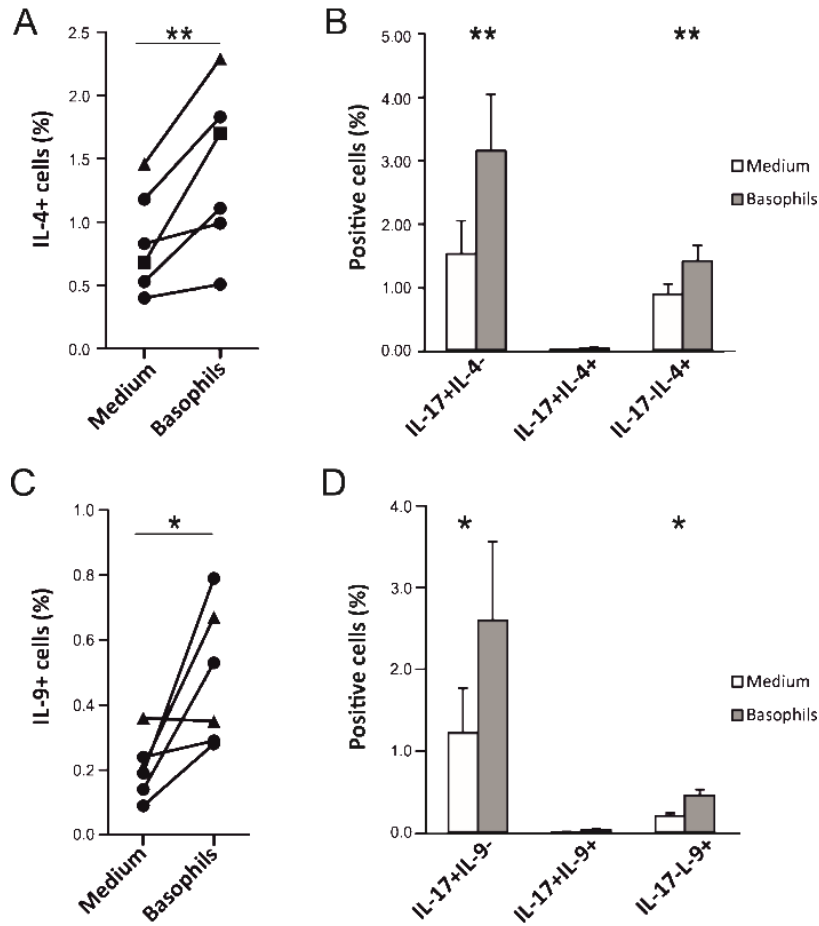


FIGURE D.4.3. BASOPHILS PROMOTE MEMORY T_H2 AND T_H9 MEMORY CD4 T CELLS

(A-D) T_{CM} were co-cultured with or without autologous or allogeneic basophils from blood. Percentage of IL-4⁺ (A) and/or IL-9⁺ (C) cells in T_{CM} from MLNs of CD (triangle) and UC (square) patients or control blood (circle). Percentage of cells expressing IL-17 and/or IL-4 (B), and IL-17 and/or IL-9 (D).

Figure 4

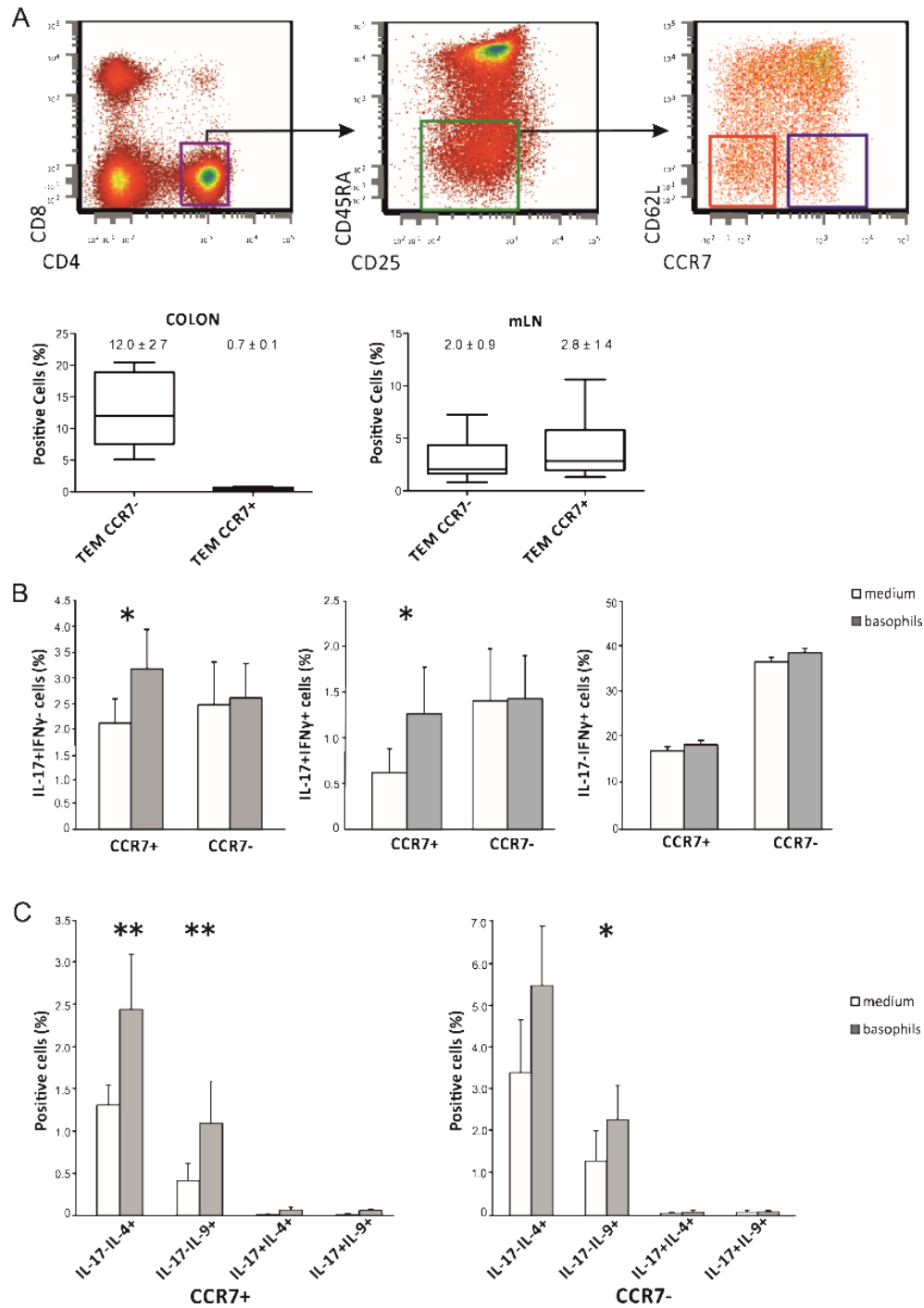


FIGURE D.4.4. BASOPHILS AUGMENT T_{H17}, T_{H2} AND T_{H9} RESPONSES IN CCR7⁺ T_{EM} SUBPOPULATION

(A) Gating strategy for isolation of CCR7⁺ and CCR7⁻ T_{EM} in mLNs (top). Proportion of CCR7⁺ and CCR7⁻ T_{EM} in tissues of IBD (median +/- SEM, n=5 to 6) (bottom). (B-C) T_{EM} from mLNs of IBD or blood of control donors (n=7) were co-cultured with or without basophils isolated from blood or LPMC. Percentage of single or double positive IL-17⁺, IFNγ⁺ cells (B) and IL-4⁺, IL-9⁺, IL-17⁺ cells (C).

D.5. DISCUSSION

To better understand the interplay between basophils and CD4 T cells responses in CD and UC patients, it is essential to examine basophils at the site they accumulate as well as to evaluate their impact on T cell subsets isolated from tissues. In the present report, we demonstrated that increased basophilia was associated with the selective accumulation of basophils in inflamed colons in CD and UC patients, irrespective of the treatment at the time of sample collection. Circulating and tissue basophils enhanced Th responses in T_{CM} and T_{EM} memory CD4 T cell subsets purified from MLNs of IBD patients. More particularly, basophils preferentially augmented memory Th17 and Th17/Th1 but not Th1 responses in the minor CCR7⁺ T_{EM}, prone to exit tissue, re-enter lymph nodes and re-circulate.

In the present study, we show that the frequency of circulating basophils increased in two distinct IgE-independent disorders, CD and UC. Although basophilia is not a particular feature of IgE-dependent allergic diseases, it was reported in patients with hyper-IgE syndrome (Hill et al., 2012). Furthermore, the pool of circulating basophils is increased in a form of type 2 inflammatory chronic food allergy, EoE, that is associated with TSLP overexpression (Noti et al., 2013). TSLP-induced basophils display a pro-inflammatory function in experimental EoE. However, depending on the IBD subset examined, TSLP mRNA expression is either increased or decreased in colonic epithelial cells in UC and CD respectively (Rimoldi et al., 2005; Tanaka et al., 2010). Thus, the mechanisms that govern basophilia in IBD remain to be elucidated. Notably, microbiota has been shown to control basophilic responses in blood as demonstrated by their increase in germ-free or antibiotics-treated mice (Hill et al., 2012).

UC and CD are chronic disorders with distinct pathogenesis. Here, we show that basophils accumulated and could be purified from inflamed mucosa of CD as well as UC

patients; they were also detected in non-inflamed IBD mucosa but absent in healthy colons from control donors. Our attempt to visualize basophils in inflamed IBD colons (n=3) by *in situ* immunofluorescence staining, using 2D7 monoclonal antibody (mAb) to detect basophils, was inconclusive. Although the mechanism that regulates the accumulation of basophils in inflamed colons remains to be clarified, it may result either from increased survival, recruitment, proliferation or perhaps differentiation of basophils *in situ*. Activated effector T cells infiltrate inflamed colons and are an abundant source of IL-3, therefore likely contributing to attraction or survival of basophils locally (Sullivan et al., 2011).

Lymphoid tissue represents an active site of T_{CM} differentiation into T_{EM} . Our results indicate that basophils promoted Th17 and Th17/Th1 but not Th1 responses in both memory T cells subsets isolated from MLNs. While the majority of effector T cells migrate to tissues where they rapidly die, a minor population of T cells differentiate into long-lived resident T_{EM} that persist in tissue as they lack CCR7 and CD62L expression. In mice, a small number of tissue memory T_{EM} express CCR7, a passport to exit tissue, re-enter lymph nodes and re-circulate to other lymph nodes or distal site of inflammatory reaction (Bromley et al., 2013; Debes et al., 2005). IBD MLNs were enriched in memory $CCR7^+$ T_{EM} and basophils selectively augmented Th17 and Th17/Th1 responses in $CCR7^+$ T_{EM} . Basophils also express CCR7 (Lim et al., 2006) that confers them the ability to migrate, along with $CCR7^+$ dendritic cells to MLNs. CCL19 and CCL21, the ligands of CCR7, are increased in intestinal mucosa of CD patients and can attract basophils and/or $CCR7^+$ T_{EM} in tissues (Middel et al., 2006). We, therefore, postulate that basophils may either directly interact with the minor $CCR7^+$ memory T cells in the inflamed IBD colons and/or make their journey to MLNs to enhance Th17, Th17/Th1 responses. The IL-17, IL-17/IFN γ -secreting memory $CCR7^+$ T cells, which are abundant in MLNs, are prone to re-

circulate and infiltrate the tissues to possibly aggravate pre-existing lesions or induce inflammation in previously unaffected areas. Hence, colons of CD patients display a discontinuous pattern of inflammation and are infiltrated by pathogenic Th17/Th1 cells (Ahern et al., 2010; Annunziato et al., 2007; Ramesh et al., 2014).

Therefore, the present study suggests unexpected therapeutic strategies in IBD patients: a) the neutralization/depletion of basophils by treatment with the non degranulating anti-IgE human antibody (omalizumab) which is clinically safe to use or b) the neutralization of histamine type 2 and 4 receptors. We previously showed that basophil-derived histamine augment IL-17 production by memory T cells via Histamine 2 (H₂R) and Histamine 4 (H₄R) receptors (Wakahara et al., 2012). In that context, anti-H₄R antibody administration inhibits CD-like TNBS-induced colitis model (Varga et al., 2005). Importantly, the relevance of therapeutic use of anti-IgE monoclonal antibody has already been validated in experimental colitis. First, treatment of mice with a non-anaphylactic anti-IgE antibody, which is known to inhibit IgE binding to FcεRI-expressing basophils, prevents development of UC-like DSS and oxazolone-induced murine colitis (Hoving et al., 2012; Kang et al., 2006). Second, FcεRI-deficient mice are protected from TNBS-induced colitis (Dombrowicz et al., 2001). Notably, non-anaphylactic anti-IgE human antibody are effective in the treatment of patients with non IgE-dependent asthma (Domingo et al., 2013; Gevaert et al., 2013) and chronic urticarial (Maurer et al., 2013) and there is accumulating solid evidence that basophils are the main target of this antibody (Eckman et al., 2010).

A direct pathogenic role has been also proposed for murine basophils in experimental EoE as well as in allergen-induced colitis in a humanized mice model (Noti et al., 2013; Weigmann et al., 2012). Basophil depletion in established EoE markedly reduces the severity

and progression of the disease (Noti et al., 2013). Similarly, the removal of human FcεRI-expressing cells from human PBMC before reconstitution of *scid* mice together with murine basophils depletion, prevent allergen-specific gut inflammation (Weigmann et al., 2012). Basophils administration elicits colitis in both experimental models (Noti et al., 2013; Weigmann et al., 2012). In contrast, basophils depletion aggravates colitis induced by adoptive transfer of pathogenic T cells in lymphopenic mice (Rodriguez Gomez et al., 2013). Overall, the *in vivo* function of mucosal or lymphoid human basophils warrants further investigation in CD and UC. Their accumulation in IBD tissues may reflect either a negative regulatory feedback mechanism to dampen inflammation or as shown in the present study, a positive loop to trigger flare up or progression of the disease (Voehringer, 2013). In support of the latter hypothesis, our unpublished observations indicate that basophils did not promote the emergence of non-pathogenic IL-17⁺/IL-10⁺ memory T cells (Ramesh et al., 2014).

Taken collectively, our results suggest that bona fide basophils are an integral part of mucosal infiltrates in both CD and UC that may promote inflammation and thus open avenues for previously unappreciated therapeutic approaches in IBD patients.

D.6. MATERIALS AND METHODS

Human clinical samples

All human subjects, non allergic (n=9), allergic (n=18), IBD (n=28) patients, signed informed consent forms that have been approved by the Institutional Ethic Research Committee (Centre Hospitalier de l'Université de Montréal). Twenty four patients were treated by 5-aminosalicylic acid, steroids, immunosuppressive agents (6-mercaptopurine, azathioprine, methotrexate) and/or biologic modifiers (anti-TNFα) at the time of sample collection. Blood was collected in

heparinized tubes. mLNs, non-inflamed and inflamed colonic tissues were acquired from surgical resections or endoscopic biopsies. Samples were taken from non-inflamed and inflamed gut regions on the basis of clinical, endoscopic and histologic criteria.

Cell purification

Lamina propria mononuclear cells (LPMC) were isolated from the intestinal mucosa by enzymatic digestion (with DNase I, Roche and Collagenase D, Roche) and mechanical dissociation (by gentle MACS). MLN cell suspensions were prepared by mechanical dissociation (Baba et al., 2013). Peripheral blood cells (PBMC) were obtained by adapted centrifugation on a Lymphoprep gradient, followed by T-cell depletion by rosetting sheep RBCs.

Flow cytometry analysis and cell sorting

LPMC and PBMC were stained with mAbs listed in table 1. Staining index (SI) was calculated as: $(\text{positive MFI} - \text{negative MFI}) / 2 * \text{negative MFI}$ (MFI=Mean Fluorescent Intensity). Human T_{EM} ($CD4^+CD8^-CD45RA^-CD45RO^+CD62L^{low}CD25^-CCR7^{+/-}$), T_{CM} ($CD4^+CD8^-CD45RA^-CD45RO^+CD62L^{high}CD25^-CCR7^+$), mast cells ($CD14^-CD1c^-Fc\epsilon RI^{high}CD172a^{low}CD123^-C-kit^+$) and basophils ($CD14^-CD1c^-Fc\epsilon RI^{high}CD172a^{low}CD123^+C-kit^-$) were sorted using FACS Aria II cell sorter from various cell suspensions. Cell purity was greater than 99%.

Morphology

For morphological studies, FACS-sorted basophils and mast cells were cytopun and stained according to the Wright Stain procedure.

In vitro basophil/T-cell cocultures

T_{EM} (1×10^6 /mL) were co-cultured with autologous or allogeneic basophils at a 5:1 ratio for 4-5 days in the presence of IL-2 (100U/mL; R&D Systems), IL-3 (10ng/mL; R&D Systems), and IL-33 (10ng/mL; Amgen). T_{CM} (0.5×10^6 /mL) were co-cultured with autologous or allogeneic basophils at a 5:1 ratio for 4-5 days in the presence of anti-CD3/CD28 coated beads (Miltenyi Biotec), IL-3 (10ng/mL), and IL-33 (10ng/mL). RPMI 1640 medium with 10% FCS was used for all experiments. IL-17 (R&D Systems) and IFN- γ (Biosource) release were measured by ELISA in the culture supernatants. For intracytoplasmic staining, cells in co-cultures were restimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) and ionomycin for 6 hours in the presence of brefeldin A (Calbiochem) for the last 3 hours, then fixed and stained with mAbs (IL-17, IFN- γ , IL-4, IL-9 as listed in table 1).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 5. Paired Student t test or Wilcoxon signed rank test were used unless otherwise indicated (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

DISCUSSION

Notre travail a étudié la nature des MNPs présents dans le colon et les ganglions mésentériques des patients atteints de MC et de CU ainsi que leurs interactions avec les lymphocytes T CD4⁺ mémoires autologues tissulaires. Une population de monocytes inflammatoires CD14⁺CD64⁺CD163⁻ (P3), mais pas les macrophages CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (P4), s'accumule dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MII (MC et CU), et promeut les réponses mémoires de type Th17 et Th17/Th1 d'une manière dépendante de l'IL-1 β . La fréquence de cette population corrèle avec le score de sévérité endoscopique (SES-CD) en MC. Dans les MLNs, la distribution des MNPs ganglionnaires diffère entre la MC et la CU. Alors que les pDCs CD14⁻CD64⁻ prédominent parmi les DCs dans les deux MII, les MNPs CD14⁺CD64⁺ sont enrichis en cellules CD163⁺ dans la CU et comprennent principalement des cellules 'monocyte-like' HLA-DR^{dim} en plus de macrophages HLA-DR^{hi}. Nous montrons également que l'IL-1 β dans la MC et l'IL-12 dans la CU induisent un profil pathogénique dans les lymphocytes T CD4⁺ (IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-6) de la muqueuse colique. De plus, l'IL-12 et les monocytes inflammatoires tissulaires favorisent la production d'IL-8 par les lymphocytes T CD4⁺ mémoires de la muqueuse intestinale et des MLNs dans la CU mais pas dans la MC. Enfin, nous rapportons également l'accumulation de basophiles, mais pas de mastocytes, dans la muqueuse colique et les MLNs en MC et en CU, et montrons qu'ils augmentent les réponses Th17 et Th17/Th1 mais non Th1 dans les lymphocytes T CD4⁺ mémoires exprimant CCR7.

A. NATURE ET FONCTION DES MNPs INTestinaux DANS LA MC

Le but de notre travail était de caractériser phénotypiquement, morphologiquement, moléculairement et fonctionnellement les MNPs de la muqueuse intestinale et des MLNs chez les patients atteints de MII. Lors de son initiation, les données de la littérature étaient limitées, aussi bien chez la souris que chez l'humain, tant à l'homéostasie qu'au cours de l'inflammation. Cependant, au cours des six dernières années, plusieurs concepts ont émergé ou ont été révisés: 1) la classification des MNPs a été remaniée, intégrant les cellules dérivant des monocytes comme une entité propre, distincte des DCs et des M ϕ embryonnaires (Guilliams et al., 2014); 2) la notion de plasticité des monocytes ('cascade monocyttaire') et donc de leur hétérogénéité tissulaire à l'homéostasie a été démontrée chez la souris en 2013 (Bain et al., 2013) et chez l'humain en 2018 (Bujko et al., 2018); 3) les techniques permettant la caractérisation cellulaire ont nettement évolué, grâce aux outils technologiques (cytométrie de flux multicolore, cytométrie de masse-CyTOF, analyse moléculaire à l'échelle de la cellule unique (scRNAseq)) et aux outils d'analyse des mégadonnées. Divers articles ont contribué à la description des MNPs dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de MII mais avec des résultats disparates, obtenus sur de petites cohortes et sans analyse au 'single cell level' (Bernardo et al., 2018; Dige et al., 2016; Magnusson et al., 2016; Ogino et al., 2013; Thiesen et al., 2014). À la lumière de toutes ces données récentes de la littérature, nous mettons en contexte, dans cette section, nos résultats avec ceux obtenus parallèlement chez la souris et chez l'humain à l'homéostasie, afin de mettre en évidence la contribution de notre travail dans la caractérisation des MNPs en contexte inflammatoire chez l'humain.

La nature et la fonction des MNPs intestinaux sont relativement conservées entre la souris et l'humain à l'homéostasie (Watchmaker et al., 2014). Par notre travail, nous montrons que les MNPs CD14⁺ présents dans le colon des patients avec MII, ont de nombreuses similitudes avec ce qui a été décrit chez la souris. Phénotypiquement, l'expression, dans nos populations P3 et P4, de CD14 qui est aussi exprimé à tous les stades de la différenciation monocytaire chez la souris (Bain et al., 2013; Zigmond et al., 2012), et de CCR2 (Thiesen et al., 2014), plaide pour une origine monocytaire de ces cellules. De plus, Grimm et al, ont démontré que des monocytes circulants isolés de patients avec MII, marqués au Technetium^{99m}, puis réinjectés aux patients, se retrouvaient dans la muqueuse inflammatoire en maintenant leur expression de CD14 (Grimm et al., 1995). Néanmoins, l'absence du marqueur Ly6C sur les monocytes humains et le caractère non discriminant de CX3CR1 (dont le niveau d'expression est identique dans nos populations P3 et P4) limitent la comparaison de nos résultats avec ceux de la souris. Aussi, l'expression de CD11c sur les Mφ intestinaux murins augmente au cours de leur différenciation tissulaire, les cellules CX3CR1^{int} qui s'accumulent dans la colite étant CD11c^{dull} alors que les Mφ matures CX3CR1^{hi} sont CD11c⁺ (Bain et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012). Ceci est en contradiction avec nos données puisque nos populations P3 et P4 expriment toutes deux de fort niveau de CD11c. Cependant, parmi les quatre sous-populations de Mφ rapportés à l'homéostasie dans le jéjunum humain, les deux populations qui sont recrutées immédiatement dans le greffon après une transplantation jéjunale expriment CD11c, alors que son expression diminue dans les 2 populations de Mφ de morphologie plus mature (Bujko et al., 2018). CD11c semble donc être un marqueur de Mφ récemment recruté chez l'humain, ce qui est en cohérence avec nos données et celles de la littérature qui rapportaient que seules les cellules CD14⁺CD11c⁺, et non CD11c⁻, persistaient dans la muqueuse inflammatoire comparé à la muqueuse non-inflammatoire des

patients avec MC (Bain et al., 2013), ou s’y accumulaient (Bernardo et al., 2018; Gonzalez-Dominguez et al., 2015). Sur la base de critères phénotypiques, notre travail suggère donc que les cellules P3 qui s’accumulent dans la muqueuse inflammatoire des patients avec MC ressemblent aux populations CX3CR1^{int} s’accumulant dans la colite chez la souris, alors que la population P4 a un phénotype plus proche des Mφ matures Ly6C⁻CX3CR1^{hi}MHCII^{hi}CD64^{hi} décrits chez la souris.

De plus, la ‘cascade monocytaire’ décrite phénotypiquement chez la souris par Bain *et al.* en 2013 (Bain et al., 2013) a été confirmée récemment par l’étude du transcriptome (microarray) de ces cellules (Schridde et al., 2017). Les gènes exprimés préférentiellement sur les populations CX3CR1^{int} et non sur les Mφ matures chez la souris comprennent des gènes identifiés dans notre étude dans la population P3, dont *TREM-1* et *FCAR* (CD89) (Schridde et al., 2017; Weber et al., 2011). Chez la souris, l’inhibition de TREM-1 atténue la maladie dans un modèle de colite au DSS et de colite par transfert de cellules T (Kokten et al., 2018; Schenk et al., 2007). De plus, la co-expression de TREM-1 et de CD89 décrite dans notre population P3 a été précédemment rapportée dans la population CD14⁺ non fractionnée chez les patients avec MII (Schenk et al., 2007). Enfin, une méta-analyse rapporte une augmentation systématique de l’expression de *TREM-1* dans la muqueuse des patients non répondeurs aux anti-TNF-α (Gaujoux et al., 2018). Notre population P3 (analysée en scRNAseq) possède donc des caractéristiques moléculaires uniques et cohérentes avec celles des cellules CD14⁺ présentes en contexte inflammatoire chez l’humain et chez la souris.

Les cellules P3 et P4 CD14⁺ de notre étude semblent donc dériver des monocytes, mais leur nature fonctionnelle est moins claire. Si la morphologie et le profil moléculaire des P4 sont ceux d’un Mφ, la nature des P3 est plus difficile à déterminer en raison de leur plasticité cellulaire.

Chez la souris, les cellules CX3CR1^{int} qui s'accumulent dans la colite sont généralement considérées comme des M ϕ (Bain et al., 2013; Tamoutounour et al., 2012), c'est-à-dire comme des cellules sessiles incapables de migration. D'ailleurs, au cours du transfert adoptif de monocytes Ly6C^{hi} dans des souris ayant une colite, la cinétique de la 'cascade monocyttaire' est la même dans le colon et dans le ganglion, ce qui va à l'encontre d'un recrutement de monocytes Ly6C^{hi} migrant depuis le tissu, mais plaide en faveur d'un recrutement direct des monocytes Ly6C^{hi} du sang dans le ganglion (Tamoutounour et al., 2012). Cependant, d'autres considèrent plutôt ces cellules CX3CR1^{int} muqueuses comme des DCs dérivés des monocytes, voire même comme des cDCs, capables de migration et de présentation antigénique. La confusion sur les capacités migratoires des cellules CX3CR1^{int} a été entretenue par le fait que certaines cDCs intestinales (cDC2 SIRP α ⁺CD103⁻) expriment des niveaux intermédiaires de CX3CR1, et comme les M ϕ , n'expriment pas CD103 (Rivollier et al., 2012). Scott et al. ont effectivement démontré que parmi les MNPs CD103⁻CX3CR1^{int}, il existait une population de *bona fide* DCs, dépendantes de Flt3 et dérivées d'un précurseur pré-DC, capables de migrer vers les MLNs (Scott et al., 2015). Il existe donc bien une population de DCs migratoires CD11c^{hi}CD103⁻CX3CR1^{int}; toutefois chez l'humain, elle se différencie des cellules dérivées des monocytes par le fait qu'elle n'exprime pas CD14 (Scott et al., 2015). Il faut également noter qu'une nouvelle population de cDC (CD1c_B/DC3), dites cDCs inflammatoires, exprimant *S100A9*, *CD14* et *IL1RN* comme notre population P3, a été rapportée dans le sang de sujets sains (Villani and Satija, 2017). On ne peut donc formellement exclure que notre population P3 dérive de ces CD1c_B/DC3 mais le niveau très faible d'expression de CD14 de ces dernières rend cette hypothèse moins probable.

Il est donc peu probable que notre population P3 CD14⁺CD103⁻ dérive de cDCs, mais elle pourrait correspondre fonctionnellement à des DCs dérivées des monocytes. Zigmond et al. ont montré, dans un modèle de colite au DSS, que les monocytes Ly6C^{hi} recrutés au cours de l'inflammation donnaient naissance à deux types cellulaires : d'abord à des cellules Ly6C^{hi}CX3CR1^{int}CD14⁺MHCII^{+/-}CD11c⁻, puis après quelques jours, à des cellules Ly6C^{low}CX3CR1^{int}CD14⁺MHCII^{hi}CD11c⁺, exprimant TREM-1 mais pas CD163 ni CD206, et produisant toutes deux des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-1 β et l'IL-6 mais pas de TNF- α , comme nos cellules P3 (Zigmond et al., 2012). Ces dernières sont capables de métaboliser des antigènes oraux et d'induire la prolifération de lymphocytes T naïfs *in vitro*; expriment CCR7 ; et sont retrouvées dans les vaisseaux lymphatiques (Zigmond et al., 2012). Une migration des cellules CX3CR1^{hi} vers le MLN d'une manière dépendante de CCR7, a par ailleurs été rapportée par Diehl et al. dans un modèle de colonisation par une salmonelle non invasive. Ils montrent que la migration, et ainsi les capacités de 'priming' des lymphocytes T par ces cellules, sont restreintes par la présence du microbiote. Il suggère qu'en cas de dysbiose, comme dans les MII, la migration des cellules CX3CR1^{hi} pourrait être effective, amplifiant ainsi la réponse immunitaire (Diehl et al., 2013). Chez l'humain, des DCs dérivées des monocytes ont été rapportées en contexte inflammatoire, dans la peau (Zaba et al., 2009), le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde et dans l'ascite tumorale (Segura et al., 2013). Dans ces derniers, deux types de cellules HLADR⁺SIRP α ⁺CD11c⁺CD11b⁺ ont été décrites : des DCs inflammatoires CD14^{+/lo}CD1c⁺CD16⁻ et des M ϕ inflammatoires CD14⁺CD1c⁻CD16⁺. Ces deux sous-populations sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α), la production d'IL-23 étant restreinte aux DCs inflammatoires. Ces dernières sont capables de présenter l'antigène et d'induire la différenciation de cellules T naïves en cellules Th17. De plus, en

présence de cellules T CD4⁺ mémoires tissulaires autologues, elles augmentent le pourcentage de cellules T sécrétant de l'IL-17 et de l'IL-17/IFN- γ . Enfin, sur le plan moléculaire, elles n'expriment pas *MAFB*, mais expriment *Flt3* et *ZBTB46*, deux gènes caractéristiques des DCs (Segura et al., 2013). Ces DCs inflammatoires ont donc des caractéristiques communes (morphologie, sécrétion cytokinique, induction d'IL-17 et IL-17/IFN- γ dans des lymphocytes T CD4 mémoires, absence relative d'expression de *MAFB*) avec notre population P3. Cependant, le profil moléculaire des DCs inflammatoires, qui est proche de celui des monocytes dérivés *in vitro* en présence de GM-CSF et d'IL-4, n'est pas partagé avec celui de notre population P3, dont l'étude en scRNAseq n'a pas conclu à la surexpression relative de *CD1c* (exprimé au niveau protéique par seulement 20% des P3), *IRF4*, *FcER1*, *ZBTB46* et *CCR7*. De plus, alors que Kamada et al. avaient montré que les cellules CD14⁺ qui s'accumulaient dans la muqueuse étaient capables d'induire la prolifération de lymphocytes T naïfs dans une réaction lymphocytaire mixte (Kamada et al., 2009), nous n'avons pas observé que notre population P3 induisait une telle prolifération chez deux patients ayant une MII active et leur capacité migratoire reste à investiguer.

Nos cellules P3, qui n'ont ni les pleines caractéristiques de DCs dérivées des monocytes, ni celles d'un typique M ϕ , pourrait être qualifiées de cellules ressemblant à des monocytes ('monocyte-like'). Chez l'humain sain, les MNPs récemment recrutés dans la muqueuse ont une signature moléculaire plus proche de celle des monocytes circulants que des 3 populations de M ϕ plus matures qui se regroupent entre eux, suggérant que leur nature fonctionnelle est différente de celle des M ϕ plus matures (Bujko et al., 2018). Bernado et al. ont aussi montré récemment que les cellules qui s'accumulent dans la muqueuse des patients avec MII ont un phénotype proche des monocytes CD14⁺CD16⁻ puisqu'elles expriment, comme eux, *CCR2*, *CX3CR1* et

CD11c et qu'elles migrent dans le tissu d'une manière dépendante de CCR2 (Bernardo et al., 2018). Ces monocytes circulants classiques CD14⁺CD16⁻, qui sont les seuls à migrer en réponse à CCL2 et dont la proportion est diminuée chez les patients atteints de MII, ont une grande aptitude à sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6) en réponse au LPS ou à des complexes immuns (Thiesen et al., 2014). En plus des cytokines pro-inflammatoires, il a été montré chez la souris que des monocytes inflammatoires Ly6C^{hi}, recrutés dans la muqueuse intestinale au cours d'une infection par *Toxoplasma gondii*, sécrétaient des molécules anti-inflammatoires telles que l'IL-10 (Grainger et al., 2013). Cette sécrétion d'IL-10 par les MNPs de la muqueuse intestinale en contexte inflammatoire, a aussi été précédemment rapportée chez l'humain (Baba et al., 2013; Gonzalez-Dominguez et al., 2015; Kamada et al., 2008; Ogino et al., 2013). Notre population P3 qui exprime CD14, CCR2, CX3CR1, CD11c, CD11b mais pas CD16 et qui sécrète des cytokines pro-inflammatoires et de l'IL-10, pourrait donc correspondre à des 'monocytes inflammatoires' ayant subi une différenciation limitée dans le tissu, n'ayant ainsi acquis, ni la signature moléculaire, ni la pleine fonction, d'une DC dérivée des monocytes ou d'un M ϕ inflammatoire.

Finalement, bien que nous n'ayons pas eu l'occasion d'évaluer la localisation de ces monocytes inflammatoires P3 dans la muqueuse, il est probable que ces cellules se situent principalement à proximité de l'épithélium. En effet, dans le jéjunum humain à l'homéostasie, les M ϕ CD11c⁺, récemment recrutés dans la muqueuse, se trouvent plus près de l'épithélium que les CD11c⁻, en meilleure position pour interagir promptement avec des bactéries qui auraient traversé la barrière épithéliale (Bujko et al., 2018). De plus, Kamada et al. avaient montré que les cellules CD14⁺ s'accumulant dans la muqueuse des patients ayant une MC, exprimaient toutes CD68 (Kamada et al., 2008). Or, des cellules CD68⁺INOS⁺ s'accumulent massivement dans les zones sous-

épithéliales en MC et en CU et participeraient aux lésions de la barrière intestinale, en dérégulant les protéines de jonction cellulaire et en induisant l'apoptose des cellules épithéliales (Lissner et al., 2015).

L'expression de plusieurs gènes dans la population P4 (*MERTK*, *CD163L1*, *MRC1/CD206*, *Clqa*, *Clqb*, *Clq*, *Mmp12* et *Mmp14*) est également en cohérence avec leur expression dans la population CX3CR1^{hi} murine à l'homéostasie (Schridde et al., 2017). Elle suggère la nature hautement phagocytaire de ces cellules, puisqu'il a été montré que l'expression de CD206, avec celles de CD163 et de MERTK, identifie dans l'intestin murin, les Mφ résidents ayant phagocyté (N et al., 2017) ; et leur implication dans le remodelage du tissu par l'expression des métalloprotéinases Mmp12 et Mmp14. La nature régulatrice de ces Mφ est en cohérence avec le fait que les Mφ CD206⁺ sont induits chez les patients atteints de MII répondant aux anti-TNFα en comparaison avec les non-répondeurs (Vos et al., 2012; Weber et al., 2011). Enfin, l'expression de CD209 par la population P4 coïncide avec un niveau d'expression élevé de CD209 dans les Mφ les plus matures décrits à l'homéostasie dans la muqueuse jéjunale humaine (Bujko et al., 2018). La nature fonctionnelle de notre population de Mφ P4 reste cependant difficile à définir. En effet, en phase inflammatoire, il a été montré que les monocytes recrutés subissaient un processus de maturation séquentielle dans lequel la phase pro-inflammatoire est suivie d'une phase de résolution de l'inflammation, au cours de laquelle les Mφ qui ont survécu à l'inflammation, participent activement à la restauration tissulaire. Cependant in vivo, ces processus sont concomitants, avec la coexistence de Mφ à différents stades de maturation (Joeris et al., 2017). Les cellules P4 dans notre étude pourraient être le reflet de ces Mφ intermédiaire en voie de différenciation vers des Mφ réparateur, mais qui seraient différents des Mφ retrouvés à l'homéostasie. En effet, certaines études montrent que dans une muqueuse intestinale saine, les

M ϕ n'expriment pas CD14, CD64 ou CD11c (Smythies et al., 2005). D'autres ont montré la présence de M ϕ qui expriment CD14, mais d'autant moins qu'ils ont un phénotype plus mature, l'expression de CD64 étant par contre maintenue (Bain et al., 2013). Or, même si notre population P4 exprime un niveau plus élevé de CD64 que P3, elle exprime aussi fortement CD14, et ne peut donc pas être considérée comme l'équivalent des M ϕ résidents décrits ci-dessus. Cependant, une étude récente a mis en évidence des M ϕ CD14^{hi} dans le jéjunum humain à l'homéostasie (Bujko et al., 2018). Ces M ϕ CD11c⁻SIRP α ⁺CD64^{dull}CD163⁺CD206⁺CD209⁺ sont principalement situés dans les couches profondes de la paroi intestinale et pourraient donc correspondre aux M ϕ d'origine embryonnaire Tim4⁺ très récemment décrits dans la sous-muqueuse et la musculature externe chez la souris. Effectivement, notre population P4 contient une fraction de cellules exprimant TIM4 et CD4. Toutefois, en comparaison à ces derniers, le phénotype de notre population P4 (CD64^{hi}CD11c⁺) n'est pas entièrement superposable et son profil moléculaire n'a pas de similitude avec celui décrit chez la souris en dehors de l'expression de C2. Enfin, les études de Smythies et de Bujko montrent toutes deux une absence de sécrétion d'IL-10 par les M ϕ jéjunaux matures alors que notre population P4 exprime de l'IL-10 ex-vivo. Cependant, d'autres auteurs ont montré comme nous que les M ϕ coliques humains, comme les murins, étaient capables de sécréter de l'IL-10 (en réponse à la stimulation des TLR/NLRs) à l'homéostasie et en contexte inflammatoire (Gonzalez-Dominguez et al., 2015; Kamada et al., 2008; Ogino et al., 2013). Ainsi, les M ϕ résidents décrits à l'homéostasie pourraient 1) n'être présents qu'en très petite quantité dans le tissu inflammatoire des patients avec MII ; ou 2) correspondre à la population P1 de notre étude qui exprime CD163 et pas CD64, surtout présente dans le tissu non-inflammatoire des patients ; ou 3) correspondre à une population qui n'exprime pas SIRP α et qui par conséquent, n'a pas été étudiée dans notre travail ; ou 4) avoir dans le

colon, un phénotype différent de celui décrit à l'homéostasie dans le jéjunum ; ou 5) être comprise dans le 'cluster' D rapporté dans notre étude donc la nature exacte et la fonction n'ont pas pu être précisées.

Finalement, nous postulons que la population P4 décrite dans notre étude est une population de M ϕ réparateurs spécifiquement différenciés en contexte inflammatoire. Elle partage des caractéristiques morphologiques et phénotypiques (CD14⁺CD206⁺CD11b⁺CD16⁺CD1c⁻) communes avec les M ϕ inflammatoires présents dans l'ascite tumorale et le liquide synovial des patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Segura et al., 2013). Leur profil moléculaire a également des similitudes avec celui de ces M ϕ inflammatoires (Segura et al., 2013) et de leurs homologues induits *in vitro* en présence de M-CSF (*MAFB*, *MERTK*, *CD163*, *CD169*, *CD11c*, *CD14*, *SLCO2B1*, *FCGRT*, *STAB1*) (Sander et al., 2017). Elle pourrait être localisée autour des ulcères et des vaisseaux puisqu'il a été montré que les M ϕ CD163⁺ s'accumulaient dans ces régions chez les patients atteints de MII (Franze et al., 2013). Nous concluons que notre population P4 est une population de macrophages post-inflammatoires, dont le profil moléculaire sous-tend une fonction réparatrice. Cette population P4 dériverait des cellules P3, par l'intermédiaire d'une population transitionnelle (Px) impliquant la coexistence de ces trois populations au sein du tissu inflammatoire. Cette conclusion est en cohérence avec les données *in vitro* de Goudot *et al.* qui montrent que la culture de monocytes avec un mélange de cytokines réputées pro- et anti-inflammatoires (M-CSF, IL-4, TNF- α , AHR) permet la genèse simultanée de M ϕ et de DCs dont le profil moléculaire est proche de celui des M ϕ et de DCs inflammatoires retrouvés dans l'ascite tumorale (Goudot et al., 2017). Cette étude reflète en effet la plasticité du monocyte et sa capacité à moduler sa nature en fonction de la synergie entre les divers facteurs présents dans le milieu auquel il est soumis.

Les facteurs impliqués dans la différenciation des monocytes dans l'intestin sont incomplètement élucidés. Plusieurs hypothèses ont été émises chez la souris pour expliquer l'arrêt du processus de différenciation des monocytes en M ϕ régulateurs au cours de l'inflammation : trop courte durée de vie (la durée de différenciation complète étant d'environ une semaine) (Bain et al., 2013), recrutement de monocytes dont le profil pro-inflammatoire a été prédéterminé avant leur arrivée dans la muqueuse (Kamada et al., 2009); manque de facteurs responsables de leur différenciation in situ.

Certains auteurs ont montré que les monocytes sanguins des patients ayant une MC pourraient être différents des monocytes isolés de patients sains. En effet, dans les mêmes conditions de culture (M-CSF), les cellules dérivées des monocytes de patients avec MC produisent plus d'IL-23 en réponse à des stimuli bactériens que les cellules dérivées des monocytes des patients sains, suggérant que l'inflammation systémique influence le phénotype des monocytes avant leur arrivée dans le tissu (Kamada et al., 2008).

Les déterminants de la différenciation des monocytes dans la muqueuse intestinale à l'homéostasie et en conditions inflammatoires ont été étudiés chez l'homme et chez la souris. Chez la souris, le processus de différenciation, mais pas le recrutement ou la survie, des monocytes en M ϕ régulateurs (ayant des fonctions scavengers et de restauration épithéliale) est sous la dépendance du TGF- β (Schridde et al., 2017). Par contre, le TGF- β ne semble pas impliqué dans l'anergie de ces M ϕ en réponse à la stimulation des TLRs. Cette diminution de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires est plutôt attribuée à l'IL-10, plus particulièrement à la réponse des M ϕ à l'IL-10 via l'IL-10R plus qu'à l'IL-10 sécrétée par les M ϕ eux-mêmes (Schridde et al., 2017; Shouval et al., 2016a; Zigmond et al., 2014). D'autres facteurs pourraient être impliqués dans ce processus de différenciation, notamment l'acide rétinoïque et le récepteur

Ahr qui ont tous deux de nombreux ligands dans l'intestin, ainsi que le microbiote ou ses produits dérivés (Schridde et al., 2017). Chez l'homme, l'exposition in vitro de monocytes circulants à du surnageant de cellules stromales (qui ne contient pas de GM-CSF, M-CSF, IL-4, ni IL-10) induit une diminution de leur expression de CD14, CD16, CCR5 et FPR1, ainsi qu'une non-réponse à la stimulation par le LPS et par la phagocytose en termes de sécrétion cytokinique (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-10, CCL5/RANTES). Cette exposition accroît par contre leur capacité phagocytaire (Smythies et al., 2005) et augmente la production de TGF- β dans le surnageant, probablement par les monocytes eux-mêmes. L'inhibition du TGF- β , qui est aussi produit in vivo dans la muqueuse par les cellules épithéliales et les mastocytes, inverse les effets du surnageant, et peut donc être considéré comme un facteur majeur dans la transformation du monocyte/macrophage intestinal à l'homéostasie (Smythies et al., 2005). Le rôle du TGF- β ne semble donc pas complètement superposable à ce qui est décrit chez la souris. D'autre part, l'exposition de monocytes humains à du M-CSF et du milieu de culture issu de LPMC montre que le M-CSF maintient l'expression de CD14 alors que le surnageant de LPMC induit celle de CD209 et CD206, qu'il provienne de patients atteints de MII ou de patients sains (Kamada et al., 2008). Cependant, l'IFN- γ présent dans le surnageant de LPMC de patients avec MC, favorise la différenciation en M ϕ produisant plus d'IL-23 que chez les patients contrôles (Kamada et al., 2008). L'étude des facteurs impliqués dans cette transformation macrophagique et notamment la possibilité de transformer des cellules similaires à notre population P3, générées in vitro à partir de monocytes, en P4 est en cours d'étude dans notre laboratoire. L'ensemble des observations concernant les MNPs intestinaux dans la MC est résumé dans la Figure 14.

B. SIMILITUDES ET DIFFERENCES DES CELLULES INNEES ENTRE MC ET CU

Dans la muqueuse intestinale, notre étude de la distribution des MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ n'a pas mis en évidence de spécificités phénotypiques ou quantitatives associées à chacune des maladies. En effet, la distribution des cellules HLADR⁺SIRP α ⁺ et des sous-populations qui les composent, telles que définies par le niveau d'expression de CD14, CD64 et CD163 (P1 à P4) est similaire dans les deux maladies. Les cellules P2, P3 et P4 ont une morphologie identique dans les deux pathologies et les cellules P3 s'accumulent dans la muqueuse en MC et en CU. Ces résultats sont en cohérence avec la population CD14⁺HLADR⁺ décrite dans la littérature, qui s'accumule dans la muqueuse des patients tant en MC qu'en CU, et qui inclurait les populations P3, Px et P4 rapportées dans notre étude (Kamada et al., 2008; Magnusson et al., 2016). De plus, bien que nous n'ayons pas encore obtenu de données moléculaires par séquençage d'ARN à l'échelon d'une cellule (scRNAseq) en CU, nous avons vérifié au niveau protéique, par analyse multiparamétrique en cytométrie de flux, que les marqueurs de surface différenciant les sous-populations de MNPs en MC (TREM-1, MERTK, CD209, CD206), étaient également exprimés par les cellules HLADR⁺SIRP α ⁺ isolées de patients atteints de CU, et permettaient de discriminer les CD14⁺CD64⁺ exprimant ou non le CD163. Aussi, l'expression d'autres protéines de surface exprimées par les P3 (CCR2, CD11c, CD11b, CLEC5A) et, probablement par leurs précurseurs monocytaires, est également retrouvée dans la CU, arguant la similitude de ces cellules dans les deux pathologies. Fonctionnellement, nous montrons que la fréquence de P3 et P4 produisant de l'IL-1 β , de l'IL-12p40, de l'IL-23 et de l'IL-6 est similaire en CU et MC. Toutefois, si la quantité totale de cytokines présente dans la muqueuse intestinale n'a pas été évaluée dans notre étude, les données de la littérature, qui ont utilisé des approches expérimentales peu précises, sont contradictoires. Certains auteurs ne notent pas de différence entre la MC et la CU dans la

quantité intra-muqueuse d'IL-12p40, mesurée par PCR, qui est augmentée dans les deux maladies par rapport à la condition contrôle (Nielsen et al., 2003) (Omata F, IBD 2001). D'autres décrivent une détection d'IL-12p40 et d'IL-12p35, donc d'IL-12p70, en MC mais pas en CU (Monteleone G, Gastroenterology 1997). Il a aussi été montré, par PCR sur des biopsies intestinales, que l'IL-12p35 tendait à prédominer dans la MC alors que l'IL-23 était présente en quantité plus importante en CU (Kobayashi et al., 2008). Cependant, ces mêmes auteurs montrent que la production d'IL-12p40 et d'IL-23p19 (donc d'IL-23), évaluée par PCR ou dans le surnageant de culture après stimulation bactérienne est supérieure dans les MNPs CD14⁺ isolés de patients atteints de MC comparée à ceux isolés de CU (Kamada et al., 2009). L'évaluation de la quantité respective de ces cytokines dans les deux maladies mérite donc d'autres investigations.

Contrairement à la muqueuse, nous montrons que la distribution des MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ est différente entre la MC et la CU dans les MLNs. En utilisant les marqueurs de surface étudiés dans la muqueuse, nous avons subdivisé les MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ en sous-populations CD14⁻CD64⁻CD163⁻ et CD14⁺CD64⁺CD163⁺, qui correspondent respectivement à des populations de cellules dendritiques et de monocytes/macrophages hétérogènes. Notre étude démontre pour la première fois que la CU se distingue de la MC, par une fréquence accrue de la population CD14⁺CD64⁺CD163⁺ ganglionnaire. Par contre, l'analyse transcriptomique de l'ARN total (« bulk RNAseq ») révèle que le profil moléculaire différentiel entre les monocytes/M ϕ et les DCs est comparable dans les deux maladies, plaidant pour la similitude de ces deux sous-populations HLA-DR⁺SIRP α ⁺ dans la MC et la CU. Toutefois, la caractérisation phénotypique

détaillée des monocytes/M ϕ et des DCs par cytométrie de masse a mis en évidence leur hétérogénéité respective.

Dans les deux MII, l'analyse par cytométrie de masse de l'ensemble des cellules hématopoïétiques CD45⁺ indique la présence, en très faible quantité (0,007±0,004 %), de cDC1 BTLA⁺CLEC9A⁺HLADR⁺SIRP α ⁻. Parmi les cellules HLADR⁺SIRP α ⁺, la population CD14⁻CD64⁻CD163⁻, contient 4 sous-populations de DCs. Le profil moléculaire en 'bulk RNAseq' indiquent la présence de pDCs dont la signature (*PTPRS*, *IGJ*, *GZMB*, *TRAF4*, *SEMA7A*, *IRF4*) est comparable avec celle des pDCs circulantes (Villani and Satija, 2017) et des pDCs retrouvées dans la muqueuse des patients atteints de MC (Cluster A de notre étude en scRNAseq). De par leur phénotype en cytométrie de masse, les pDCs (CD123⁺CD303⁺CD11c⁻) ganglionnaires sont, contrairement au sang, les DCs majoritaires dans le ganglion dans les deux MII, et sont retrouvées en plus grande fréquence en MC qu'en CU. Nous avons aussi mis en évidence dans les deux maladies, une population de cellules CD14⁻CD64^{int}CD163^{int}CD11b⁺CD36⁺CD11c^{dim}CD1c⁻ qui pourrait correspondre à la population de DCs inflammatoires (CD1c_B/DC3) nouvellement décrite dans le sang (CD1c^{dim}CD163^{dim}CD36^{dim}) (Villani and Satija, 2017). Cette population est détectée en proportion similaire en MC et en CU, alors que la population de cDC2 résidentes CD11c^{hi}CD1c⁺CD33⁺ est détectée en plus grande fréquence dans la CU. Tel que précédemment décrit dans les ganglions lymphatiques pulmonaires (Desch et al., 2016), nous avons aussi observé une faible quantité de cDC2s migratoires HLADR^{hi}CCR7⁺ en MC et en CU. Notons que ces cDC2s migratoires n'expriment pas CD103, ce qui est cohérent avec ce qui a été rapporté chez la souris (Houston et al., 2016). En effet, ces DCs migratoires dérivent certainement de notre population muqueuse P2, majoritairement CD103⁻ dans le colon. Les populations CD14⁻CD64⁻CD163⁻ muqueuse (P2) et ganglionnaire sont d'ailleurs également

similaires par le fait qu'elles ne produisent peu ou pas de cytokines ex-vivo, contrairement aux populations de MNPs CD14⁺. De plus, nous confirmons la similitude des cellules CD14⁻CD64⁻CD163⁻ isolées de la muqueuse (P2) et du ganglion par le séquençage de l'ARN ('bulk' RNAseq) et l'analyse de type 'principal component analysis' (PCA). En effet, cette analyse (annexe 6) montre que les cellules CD14⁻CD64⁻CD163⁻ se regroupent dans un même 'cluster', indépendamment de leur origine tissulaire et de la maladie sous-jacente. Par contre, cette même analyse montre que toutes les cellules CD14⁺CD64⁺ se regroupent dans un même 'cluster' indépendamment de leur expression de CD163, qu'elles proviennent de la muqueuse (P3 vs P4) ou du ganglion (CD14⁺CD64⁺CD163⁺ et CD14⁺CD64⁺CD163⁻) en MC et en CU. Notre travail démontre que la discrimination entre les sous-populations CD14⁺CD64⁺, dans la muqueuse et dans le MLN, n'a pu se faire que par l'analyse à l'échelon d'une cellule ('single cell level'), soit du transcriptome (scRNAseq), soit du phénotype détaillé (cytométrie de masse). En effet, l'analyse comparative du profil moléculaire en « bulk RNAseq » des DCs CD14⁻CD64⁻CD163⁻, des cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁻ (données non montrées) et des CD14⁺CD64⁺CD163⁺ ganglionnaires indique que les cellules CD14⁻ expriment un profil moléculaire différent des CD14⁺, mais que par contre, les CD14⁺CD64⁺ exprimant ou non le CD163, ont un profil moléculaire similaire. Le transcriptome des CD14⁺CD64⁺CD163⁺ en bulk RNAseq révèle des gènes identifiés par scRNAseq, à la fois dans les populations de Mφ CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (P4) (*MAFB*, *CSFR1*, *CIQA*, *CIQB*, *CIQC*, *MRC1*, *MAF*, *STAB1*, *SLCO2B1*, *FOLR2*, *FCGR3A*, *C2*, *VSIG4*, mais aussi de cellules monocyte-like CD14⁺CD64⁺CD163⁻ (P3) (*CD300E*, *SERPINA1*, *FCN1*, *FPRI*, *SI00A9*, *SLC11A1*, *THBS1*, *IL1RN*, *PLAUR*, *CCRL2*, *OLR1*, *EREG*, *ACSL1*). De plus, l'analyse phénotypique de cette population ganglionnaire, démontre que les cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ contiennent des macrophages HLADR^{hi}CD68⁺ (clusters 4, 5 et 7) mais

incluent également des cellules de type monocyttaire HLADR^{dim} (cluster 6) exprimant comme les monocytes circulants, CD163 et CD300E mais peu ou pas CD68 (Clark et al., 2007). Cependant, ces cellules HLADR^{dim} pourraient aussi correspondre à des monocytes inflammatoires qui auraient migré de la muqueuse vers le ganglion, en transition vers une différenciation macrophagique de par leur acquisition de CD163 (Jakubzick et al., 2013; Zigmond et al., 2012). L'augmentation de cette population cellulaire HLADR^{dim}CD163⁺ en CU comparé à la MC (cluster 6 : 38% vs 24% des CD14⁺CD64⁺, en CU et en MC respectivement), contribue à la fréquence élevée des cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ en CU, en combinaison avec la fréquence accrue de la population HLADR^{hi}CD68⁺MARCO^{hi}CD169⁻ (cluster 7) en CU versus MC (17% vs 6% respectivement). Cette dernière a un phénotype compatible avec les Mφ décrits dans la zone T chez la souris (TZM) n'exprimant pas CD169, alors que les Mφ HLADR^{hi}CD68⁺MARCO⁻CD169⁺ (cluster 5) correspondent probablement à une population de Mφ sinusaux (Bellomo et al., 2018). En outre, les cellules CD14⁺CD64⁺ ganglionnaires contiennent aussi des cellules CD163⁻ qui expriment faiblement HLADR en MC et en CU (clusters 1, 2 et 3, représentant 20% des CD14⁺CD64⁺ en CU et 55% en MC). Leur phénotype détaillé indique qu'il pourrait s'agir principalement, comme dans la muqueuse, de monocytes ou de monocyte-like, ce qui est cohérent avec ce qui a été observé chez la souris où les monocytes prédominent en nombre dans le MLN (Granot et al., 2017; Jakubzick et al., 2017). En faveur de cette hypothèse, ces cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁻ ont des capacités de phagocytose inférieures aux cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺, et présentent une morphologie et une fonction compatibles avec celle des monocytes. En effet, elles sont capables d'induire la différenciation de lymphocytes T naïfs en Th17 (annexe 6), en accord avec les travaux d'Acosta-Rodriguez et *al.* qui ont montré que les

monocytes seraient de meilleures cellules présentatrices d'antigène pour induire la polarisation en Th17 que les DCs (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

En conclusion, on retrouve dans les MNPs HLADR⁺SIRP α ⁺ du MLN des patients atteints de MII, des cellules CD14⁺ en plus grande fréquence dans la CU que dans la MC, et des pDCs en plus grande proportion dans la MC que dans la CU. Les cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ contiennent des *bona fide* macrophages, mais aussi des monocytes. S'il est très probable que les M ϕ CD14⁺CD64⁺CD163⁺HLADR^{hi} (clusters 4, 5 et 7) résidents ganglionnaires ne soient pas originaires de la muqueuse et ne dérivent donc pas des cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ muqueuses (P4), plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la présence de CD14⁺CD64⁺HLADR^{dim} exprimant ou non CD163 dans le ganglion (clusters 6, 1, 2 et 3): cette population de type monocyttaire dériverait, soit de monocytes circulants entrant directement dans les MLNs, soit de leurs homologues muqueux, qui pourraient avoir acquis des capacités migratoires tel que suggéré par certains auteurs chez la souris (Jakubzick et al., 2013; Zigmond et al., 2012). Seule l'analyse transcriptomique au 'single cell level' qui alignerait les résultats des MNPs ganglionnaires avec ceux de la muqueuse et du sang, permettrait d'établir l'origine, la nature et la relation entre les différentes sous-populations de MNPs dans les MII. Cependant, nous n'avons pas eu l'opportunité de compléter cette analyse au cours de notre étude.

Finalement (voir annexe 1), l'étude du phénotype des cellules CD14⁺ de la muqueuse intestinale dans notre laboratoire, a aussi montré qu'une partie de ces cellules exprimaient le marqueur Slan (6-sulfoLacNAc), une modification d'un carbohydrate de la glycoprotéine P-selectine ligand-1 (GPSL-1) (Bsat et al., 2015). L'expression de Slan sur les cellules ClassII⁺ définirait la principale population de DC circulantes dans le sang de sujets sains, distinctes des

cDC2 CD1c⁺ et exprimant CD16 (Cros et al., 2010), alors que d'autres études la considèrent comme proche des monocytes CD14^{dull}CD16⁺ (Cros et al., 2010). Notre étude révèle des différences en termes de distribution de ces cellules et de sécrétion cytokinique, dans le sang, la muqueuse et les MLNs des patients atteints de MC et de CU. En effet, la fréquence des cellules Slan⁺SIRPα⁺ circulantes est diminuée chez les patients atteints de MC réfractaires au traitement par rapport aux sujets contrôles mais pas chez ceux atteints de CU. De plus, dans la muqueuse intestinale et les MLNs, des cellules Slan⁺, augmentant leur expression de CD14 et sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL1-β et TNF-α), sont plus fréquentes par rapport à des sujets contrôles, chez les patients atteints de MC mais pas de CU. Finalement, parmi les cellules Slan⁺ circulantes, le pourcentage de cellules produisant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-12p40, IL-23p19, TNF-α) en réponse à la stimulation du TLR2 et de NOD2, augmente dans la MC mais pas dans la CU. La nature et le profil transcriptomique de ces cellules Slan⁺CD14⁺SIRPα⁺, qui s'accumulent uniquement dans les tissus des patients ayant une MC, au sein des cellules CD14⁺SIRPα⁺ décrites dans le reste de ce travail reste à éclaircir. Bien que l'expression de Slan ait été décrite dans des cellules CD14⁺CD163⁺ et CD14⁺CD163^{dull} dans la muqueuse normale de patients atteints de cancer colorectal (Ogino et al., 2013), dans notre étude, les cellules Slan⁺CD14⁺SIRPα⁺ étaient CD11c⁺CD163⁻, tel que décrit aussi dans la peau (Gunther et al., 2012). Ces cellules sont donc contenues dans notre population P3. En cohérence avec le fait que nous considérons notre population P3 comme pathogénique dans les MII, l'accumulation tissulaire de cellules Slan⁺ a été rapportée dans des maladies telles que le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, le lupus et la sclérose en plaques (Hansel et al., 2013; Hansel et al., 2011; Thomas et al., 2014). Plus particulièrement, les cellules Slan⁺ induisent des réponses Th17 et Th17/Th1 dans le sang de patients atteints de psoriasis, plaidant encore pour un rôle

pathogénique de ces cellules (Hansel et al., 2011). Enfin, les cellules Slan⁺ sont localisées principalement dans la partie apicale de la muqueuse intestinale et dans les zones B et T du MLN chez les patients atteints de MC (Bsat et al., 2015). Des investigations complémentaires en cytométrie et en imagerie sont donc nécessaires pour définir la nature exacte des cellules Slan⁺CD14⁺SIRP α ⁺ parmi les autres populations tissulaires de MNPs, ainsi que leur fonction spécifique dans la MC.

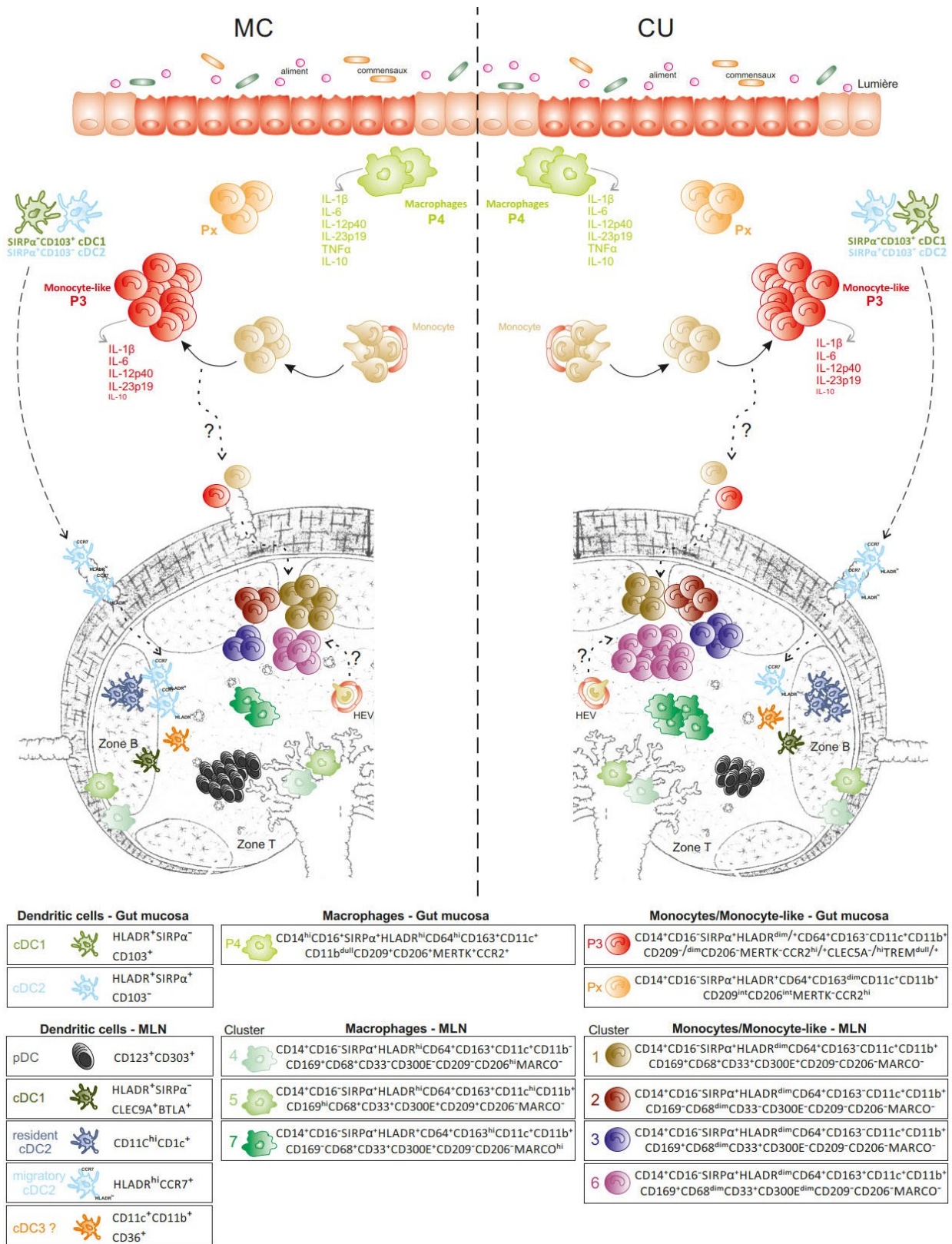


FIGURE 14 : MNPS INTESTINAUX ET GANGLIONNAIRES DANS LA MALADIE DE CROHN ET LA COLITE ULCEREUSE

Légende en page suivante

Dans la muqueuse des patients atteints de MII, on observe un recrutement accru de monocytes (en doré), générant une population de cellules ‘monocyte-like inflammatoires’ (P3, en rouge) qui augmente dans la muqueuse des patients souffrant de MC et de CU et sécrète des cytokines pro-inflammatoires et de l’IL-10. Une population de Mφ réparateurs spécifiquement différenciés en contexte inflammatoire (‘post-inflammatoires’, P4, en vert amande) est aussi présente en MC et en CU et sécrète, en plus de cytokines pro-inflammatoires, de l’IL-10 en quantité plus importante que les P3. Cette population P4 dériverait des cellules P3, par l’intermédiaire d’une population transitionnelle (Px, en orange clair), ces trois populations coexistant au sein du tissu inflammatoire. Des cDCs de type 1 (en vert olive, non étudiées dans notre étude qui s’est intéressée aux MNPs SIRPα⁺) et des cDCs de type 2 SIRPα⁺CD103⁻ (en bleu turquoise, comprises dans notre population P2 CD14⁻CD64⁻) cohabitent également avec les monocytes/Mφ CD14⁺CD64⁺ dans la muqueuse des patients atteints de MII.

Dans les MLNs, on retrouve dans les deux MII, une très faible quantité de cDC1 SIRPα⁻ (en vert kaki) et, parmi les cellules HLADR⁺SIRPα⁺, 4 sous-populations de DCs CD14⁻CD64⁻CD163⁻ : 1) les pDCs (en noir) sont les DCs majoritaires dans le ganglion dans les deux MII, et sont retrouvées en plus grande fréquence en MC qu’en CU ; 2) des cDCs CD14⁻CD64^{int}CD163^{int}CD11b⁺CD36⁺CD11c^{dim}CD1c⁻ (en orange foncé), détectées en proportion similaire en MC et en CU, pourrait correspondre à la population de cDCs inflammatoires (CD1c_B/DC3) nouvellement décrite dans le sang (CD1c^{dim}CD163^{dim}CD36^{dim}) ; 3) une population de cDC2 résidentes CD11c^{hi}CD1c⁺CD33⁺ (en bleu marine) est détectée en plus grande fréquence dans la CU ; 4) une faible quantité de cDC2 migratoires HLADR^{hi}CDR7⁺ (en bleu turquoise) est présente en MC et en CU.

La CU se distingue de la MC, par une fréquence accrue dans le MLN, d’une population de monocytes/Mφ CD14⁺CD64⁺CD163⁺. Ces cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ contiennent des *bona fide* Mφ HLADR^{hi}CD68⁺ (clusters 4 en vert menthe, 5 en vert clair et 7 vert sapin), mais aussi des monocytes HLADR^{dim}CD68^{dim} (cluster 6 en violet), l’augmentation des clusters 6 et cluster 7 contribuant à la fréquence élevée des cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁺ en CU comparé à la MC. Les Mφ CD169⁻ du cluster 7 ont un phénotype compatible avec les Mφ décrits dans la zone T chez la souris (TZM), tandis que les Mφ CD169⁺ des clusters 4 et 5 sont probablement sinusaux. Les cellules CD14⁺CD64⁺ ganglionnaires contiennent aussi des cellules CD163⁻ qui expriment faiblement HLADR en MC et en CU (clusters 1 en brun, 2 en bordeaux et 3 en bleu foncé), correspondant probablement à des monocytes. Alors que les Mφ CD14⁺CD64⁺CD163⁺HLADR^{hi} (clusters 4, 5 et 7) ganglionnaires ne sont probablement pas originaires de la muqueuse mais issus d’une colonisation par des monocytes circulants, les MNPs CD14⁺CD64⁺HLADR^{dim}, exprimant ou non CD163 (clusters 6, 1, 2 et 3), dériveraient, soit de monocytes circulants entrant directement dans les MLNs, soit de leurs homologues muqueux (P4 ou Px) qui pourraient avoir acquis des capacités migratoires.

C. SIMILITUDES ET DIFFÉRENCES DU PROFIL DES LYMPHOCYTES T HELPER ENTRE MC ET CU

C.1. SITE DE LA PLASTICITÉ DES TH17 ET TH17/TH1 : DANS LA MUQUEUSE OU DANS LES MLNs ?

Nous avons montré en MC et en CU que les MNPs pouvaient, via les cytokines qu'ils sécrètent, influencer les réponses de type Th17, Th17/Th1 et Th1*. Ces modifications témoignent de la plasticité des lymphocytes T mémoires puisque nous avons observé une induction, par les cellules innées et les cytokines pro-inflammatoires, de la sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-6 et de GM-CSF dans les lymphocytes Th17 isolés de la muqueuse et des MLNs des patients atteints de MII. Cependant, *in vivo*, il est difficile d'établir si cette plasticité et l'acquisition éventuelle d'un caractère pathogénique, a majoritairement lieu dans la muqueuse ou dans le ganglion mésentérique. Ces derniers sont d'abord décrits comme des sites inducteurs dans lesquels les lymphocytes T naïfs subissent une différenciation spécifique et reçoivent une empreinte les guidant vers leur tissu de destination. Il a été montré qu'une même stimulation antigénique pouvait être à l'origine d'une hétérogénéité intra-clonale, c'est-à-dire qu'un clone de lymphocytes T naïfs pouvait donner naissance à des cellules filles adoptant différents profils. Notamment, l'analyse des clones de cellules T mémoires humaines circulantes spécifiques de *C. albicans* montre que les cellules issues d'un même clone peuvent présenter des profils de type Th17 et Th1* et que l'induction de ces différents profils T helper se fait au moment de la polarisation des lymphocytes T naïfs (Becattini et al., 2015). Cependant, il a aussi été montré que des lymphocytes T mémoires de type Th17 étaient plastiques et pouvaient secondairement modifier leur profil, notamment sous l'influence de cytokines (Cosmi et al., 2014). Chez la souris, le rôle des MLNs et des plaques de Peyer dans l'induction et la sévérité de la maladie a été évalué dans un modèle de colite par transfert de cellules T CD4⁺CD45RB^{hi}. De manière

surprenante, la présence des MLNs ou des plaques de Peyer n'était pas requise pour induire la colite et leur absence n'avait pas d'impact sur la quantité de lymphocytes T CD4⁺ et leur sécrétion d'IL-17 et d'IFN- γ dans la lamina propria (Takebayashi et al., 2011). Cependant, dans un modèle d'inflammation iléale (injection d'anticorps anti-CD3), la présence des MLNs, mais pas des plaques de Peyer, était nécessaire au développement de l'iléite (Kawabe et al., 2016). Cette étude montre d'abord qu'à l'homéostasie, la présence des MLNs et du microbiote est indispensable au maintien du nombre de T_{EM} circulants $\alpha 4^+ \beta 7^+$ mais que ces derniers ne sont pas recrutés dans la muqueuse en l'absence d'inflammation. En effet, l'injection d'un anticorps anti- $\alpha 4$ à l'homéostasie n'affecte pas le nombre de lymphocytes T CD4⁺ présents dans la muqueuse qui est alors dépendant de la présence des plaques de Peyer. Au cours de l'inflammation induite par l'injection d'anticorps anti-CD3, le nombre de T_{EM} CD4⁺ circulants $\alpha 4^+ \beta 7^+$ et la fréquence des T_{EM} CD4⁺ IL17⁺IFN- γ^- et IL17⁺IFN- γ^+ (mais pas IL17⁺IFN- γ^+) dans la muqueuse intestinale, sont diminués significativement en l'absence de MLN et du microbiote. De manière intéressante, les T_{EM} $\alpha 4^+ \beta 7^+$ circulants ne produisent ni IL-17, ni IFN- γ durant l'iléite, suggérant une conversion des T_{EM} $\alpha 4^+ \beta 7^+$ IL-17⁻ en lymphocytes sécrétant des cytokines après leur recrutement dans le tissu (Kawabe et al., 2016). Cette observation est cohérente avec l'étude de Sano et al. qui montre que l'activation des Th17, in situ, dans la muqueuse intestinale, est nécessaire à la production d'IL-17 (Sano et al., 2015). De plus, une étude en scRNaseq montre, dans un modèle d'EAE, que les Th17 du ganglion évoluent d'un type Th17/préTh1 à un type Th17/Th1 effecteur puis mémoire au cours de leur migration dans le tissu où ils acquièrent un caractère pathogénique (Gaublomme et al., 2015). Ces études chez l'animal montrent que les ganglions mésentériques ont un rôle clé dans la genèse et l'empreinte des T_{EM} CD4⁺, mais que ceux-ci ne rempliraient leur

pleine fonction effectrice qu'en contexte d'inflammation après leur recrutement dans le tissu où ils acquerraient leur caractère pathogénique.

Cependant, notre étude sur les lymphocytes T des MLNs, suggère que la plasticité des T_{EM} Th17 pourrait déjà se produire dans le ganglion notamment sous l'influence de l'IL-1 β , de l'IL-12 et de l'IL-23, capables d'influencer les réponses Th17, Th17/Th1, Th8/Th17 et Th8/Th1. Premièrement, l'analyse de la signature moléculaire des T_{EM} Th17 des MLNs des patients atteints de MII montre qu'avant toute stimulation cytokinique *in vitro*, le profil moléculaire des lymphocytes CD4⁺ mémoires est différent en MC et en CU (annexe 7, Bsat et Chapuy et al, article accepté, *Frontiers in Immunology*, Mai 2019). En effet, en comparaison aux gènes exprimés en CU, les gènes surexprimés par les T_{EM} Th17 en MC (*GZMB, IL23R, IL12RB1, IL18RAP, IFNG, DPP4, IL21, IL7R, CCL5, CCL3, CCL4, CSF2*) représentent une signature plus pathogénique. A l'inverse, les gènes surexprimés en CU (*IL-9, CCR6, IL-1RN, IL-10, STAT-1, AHR, IL6ST*) plaident pour un profil de Th17 non pathogéniques en CU. Ceci suggère que, dans la MC, les T_{EM} Th17 ganglionnaires ont acquis leur signature pathogénique *in vivo*, notamment sous l'influence de diverses cytokines secrétées par les MNPs. En accord avec nos données (qui portent sur la population prédominante dans le MLN, les T_{EM} Th17), les lymphocytes CD4⁺ isolés des MLNs de patients atteints de MC secrètent, dans les mêmes conditions que dans notre étude (stimulation par antiCD3-antiCD28 suivie de PMA-ionomycine) plus d'IFN- γ et d'IL-17 (ce dernier détecté en faible quantité) que les lymphocytes isolés de patients avec CU ou de contrôles sains. L'expression de *Tbet* et de *RORC* est également augmentée en MC comparée à la CU (Sakuraba et al., 2009).

Nous discuterons dans les sections suivantes de l'influence de l'IL-1 β , de l'IL-12, de l'IL-23 et des MNPs, sur la plasticité des lymphocytes T CD4⁺ et Th17 de la muqueuse intestinale et des MLNs, dans les deux MII.

C.2. PROFIL CYTOKINIQUE ET PATHOGENICITE DES LYMPHOCYTES TH17, TH17/TH1 ET TH1 : DIFFÉRENCES ENTRE MC ET CU, GANGLION MÉSENTÉRIQUE ET MUQUEUSE ?

Chez la souris l'acquisition d'IFN- γ par les lymphocytes Th17 induit leur pathogénicité dans le modèle d'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE) (Ghoreschi et al., 2010; Lee et al., 2012) ainsi que dans le modèle de colite par transfert de cellules T (Ahern et al., 2010). Chez l'humain, ces lymphocytes IFN- γ ⁺IL-17⁺ sont retrouvés dans plusieurs pathologies auto-immunes ou inflammatoires dont les MII (Annunziato et al., 2007; Globig et al., 2014; Ramesh et al., 2014; Rovedatti et al., 2009). De plus, la production de GM-CSF, de TNF- α et d'IL-6 par les lymphocytes Th17 fait aussi partie de leur signature pathogénique dans le modèle murin d'EAE (Ghoreschi et al., 2010). Nos travaux montrent que l'IL-23, l'IL-12 et l'IL-1 β induisent un profil pathogénique différentiel dans les lymphocytes T muqueux et ganglionnaires.

L'IL-23 augmente les réponses de type Th17 et Th17/Th1 dans les lymphocytes CD4⁺ isolés de la muqueuse des patients atteints de MC (incluant les patients réfractaires au traitement), mais pas de CU. Les études portant sur le sang de patients atteints de MC montrent que les lymphocytes T CD161⁺CCR6⁺CD4⁺ circulants expriment l'IL-23R, et produisent de l'IL-17 et de l'IFN- γ sous stimulation par IL-23 (Kleinschek et al., 2009). De plus, Ramesh et al. montrent que l'IL-23 augmente le pourcentage de cellules T CD4⁺CD161⁺IFN- γ ⁺IL-17⁺, plus particulièrement dans les Th17/Th1 exprimant MDR1 et IL-23R qui s'accumulent dans la

muqueuse des patients avec MC (Ramesh et al., 2014). Par contre, l'exposition à l'IL-23 de clones Th17 isolés de la muqueuse de patients souffrant de MC et stimulés par des billes anti-CD3/anti-CD28 et de l'IL-2 pendant 7 jours, n'induisait pas d'augmentation d'IFN- γ dans le surnageant de culture (Annunziato et al., 2007). Cependant, ces mêmes auteurs ont rapporté, dans le surnageant de cultures de lymphocytes CD4⁺ muqueux stimulés par des billes anti-CD3/anti-CD28, une augmentation d'IFN- γ en présence d'IL-23 en MC et CU et une augmentation d'IL-17 en CU uniquement (Kobayashi et al., 2008). Dans les T_{EM} Th17 isolées des MLNs, l'IL-23 ne semblait pas contrôler les réponses Th17, Th17/Th1 et Th1, ni en MC ni en CU (résultats non montrés, Bsat et Chapuy et al, article accepté, *Frontiers in Immunology*, Mai 2019).

L'addition d'IL-12 recombinante à nos cultures de lymphocytes T CD4⁺ isolés de la muqueuse intestinale de patients ayant une MC ou une CU, entraîne une diminution de la fréquence des cellules produisant de l'IL-17 et une augmentation de celles produisant de l'IFN- γ , sans effet sur les doubles productrices IL-17/IFN- γ . Cet effet de l'IL-12 est cohérent avec l'étude d'Annunziato et al. qui montrait que l'IL-12 augmentait l'expression d'IFN- γ et T-bet et diminuait l'expression d'IL-17 et de ROR γ t dans des clones Th17 isolés de la muqueuse de patients avec MC (Annunziato et al., 2007), favorisant ainsi la plasticité des Th17 vers des Th1*. De même, en MC et en CU, l'IL-12 augmente la sécrétion d'IFN- γ et diminue la sécrétion d'IL-17 dans le surnageant de culture de LMPC (Rovedatti et al., 2009) ou de lymphocytes CD4⁺ (Kobayashi et al., 2008), stimulés par anti-CD3/anti-CD28. Ceci corrobore les observations sur les lymphocytes Th17/Th1 circulants qui augmentent leur proportion de cellules sécrétant de l'IFN- γ et réduisent la proportion de cellules produisant de l'IL-17 en réponse à l'IL-12 (Duhon and Campbell, 2014). D'autre part, dans notre étude, l'IL-12 augmente la sécrétion de GM-CSF

et d'IL-6 dans le surnageant de culture de lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse. De même, l'IL-12, dont l'action est renforcée en présence d'IL-1 β , augmente la sécrétion de GM-CSF dans des lymphocytes Th17/Th1 CCR6⁺CXCR3⁺ circulants humains (Duhon and Campbell, 2014). Nous montrons aussi que l'IL-12, mais pas l'IL-23, régulent la sécrétion d'IL-8 par les lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale isolés de patients atteints de CU mais pas de MC. Plus particulièrement, l'IL-12 augmente les réponses de type Th8/Th1 et Th8/Th17/Th1. Même si l'importance de l'IL-8 dans la pathophysiologie de la CU a été rapportée (Mitsuyama et al., 1994), le rôle pathogénique de la sécrétion d'IL-8 par les lymphocytes T est difficile à affirmer. L'expression de l'ARN de l'IL-8 est augmentée dans la muqueuse inflammatoire des patients atteints de CU, et le niveau d'expression de l'IL-8 corrèle avec la sévérité endoscopique en CU (Mitsuyama et al., 1994). Toutefois, les lymphocytes T sont à l'origine d'une très faible part de la sécrétion d'IL-8 dans la muqueuse intestinale, où la production d'IL-8 est principalement assurée par les neutrophiles et les MNPs. Cependant, dans un modèle murin de colite, les niveaux d'IL-8 augmentent avant l'influx de neutrophiles, suggérant une possible implication des lymphocytes IL-8⁺ au début de la maladie (Mitsuyama et al., 1994). D'autre part, dans des lésions chroniques de MC, la production d'IL-8 a été principalement détectée dans des cellules CD3⁺, suggérant aussi un rôle de l'IL-8 dans le maintien de la maladie (Brandt et al., 2000). Nous avons cependant observé des niveaux très faibles de production d'IL-8 par les lymphocytes CD4⁺ muqueux en MC, *ex-vivo* et après culture, qui n'étaient régulés ni par les MNPs, ni par l'addition d'IL-1 β , d'IL-12 ou d'IL-23 exogène. Ces différences de réponse pourraient s'expliquer en partie par le fait que l'IL-8 elle-même augmente la sécrétion d'IL-8 par les lymphocytes T (Gesser et al., 1995). Ainsi, l'IL-8 présente dans la muqueuse des patients avec CU (Mitsuyama et al., 1994) pourrait contribuer à favoriser la production d'IL-8 par les

lymphocytes T CD4⁺ en CU. Nous ne pouvons toutefois pas démontrer la pathogénicité des lymphocytes T produisant de l'IL-8 chez l'humain. Cependant, l'étude de la sécrétion cytokinique *ex-vivo* des lymphocytes T CD4⁺IL-8⁺ de la muqueuse des patients atteints de CU (après 4h de stimulation par PMA-ionomycine) montre que 40% d'entre eux co-sécrètent du GM-CSF et/ou de l'IL-6 et/ou du TNF- α . De plus, l'IL-12 augmente la production de GM-CSF et de TNF- α par les T_{EM} Th17 CD4⁺ des MLNs de patients atteints de CU, suggérant la pathogénicité de ces cellules et le rôle de l'IL-12 dans l'acquisition de celle-ci.

Nous montrons aussi que l'IL-1 β augmente les réponses de type Th8/Th17 et Th8/Th17/Th1 dans les lymphocytes CD4⁺ muqueux en CU mais pas en MC. En cohérence avec cet effet de l'IL-1 β , les niveaux d'IL-8 corrélerent avec les niveaux d'IL-1 β en CU (Mitsuyama et al., 1994). Pourtant, l'addition d'IL-1 β n'augmente pas le pourcentage de cellules IL-8⁺ dans les lymphocytes T circulants ayant reçu une stimulation du TCR (Gasch et al., 2014), mais la flagelline qui se trouve en grande quantité dans la lumière intestinale, augmente la production d'IL-8 par les lymphocytes T CD4⁺ circulants de nouveau-nés (Gibbons et al., 2014). Cette différence de réponse à l'IL-1 β entre les T circulants et tissulaires, suggère qu'en plus de l'IL-1 β (et de l'IL-12), d'autres molécules peuvent moduler la production d'IL-8 par les lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse intestinale, et pourrait conduire à leur pathogénicité.

Par ailleurs, aussi bien chez les patients atteints de MC que de CU, l'IL-1 β favorise l'augmentation des réponses de type Th17 et Th17/Th1 dans les lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse intestinale. Cet effet sur la réponse Th17/Th1 est également observé sur les T_{EM} Th17 isolés des MLNs de patients atteints de CU tandis qu'une tendance à l'augmentation de la réponse Th17/Th1 est observée en MC (Bsat et Chapuy et al, article accepté, *Frontiers in*

Immunology, Mai 2019). Ces observations sont en cohérence avec le fait que l'IL-1 β est essentielle à la coproduction d'IFN- γ et d'IL-17 par des lymphocytes Th17 humains circulants, induits spécifiquement en présence de *Candida albicans*, alors qu'elle limite leur production d'IL-10 (Zielinski et al., 2012). De plus, L'IL-1 β a une action synergique avec l'IL-12 en augmentant fortement la réponse à l'IL-12 des lymphocytes Th17/Th1 CCR6⁺CXCR3⁺ circulants humains (augmentation de l'expression de T-bet et de la sécrétion d'IFN- γ) (Duhon and Campbell, 2014). L'IL-1 β , qui est augmentée dans la muqueuse intestinale des patients atteints de MII (Casini-Raggi et al., 1995), a été récemment identifiée comme le principal régulateur des gènes constituant la signature pathogénique des Th17 circulants humains (Hu and Notarbartolo, 2017). Toutefois, dans notre étude, le profil de sécrétion cytokinique induit par l'IL-1 β est différent selon la maladie puisque l'IL-1 β induit la sécrétion de GM-CSF, de TNF- α et d'IL-6 par les lymphocytes T CD4 muqueux en MC mais pas en CU. Cette différence pourrait être en lien avec l'absence d'effet de l'IL-23 sur les lymphocytes T CD4⁺ de la muqueuse dans la CU puisqu'un effet synergique entre l'IL-1 β et l'IL-23 a été rapporté. En effet, dans le modèle de colite par transfert de cellules T, l'IL-1 β joue un rôle clé dans l'accumulation et la survie de lymphocytes Th17 en ayant une action synergique avec l'IL-23. Cette dernière augmente l'expression de l'IL-1R dans les lymphocytes T et elles agissent donc de concert pour promouvoir la colite (Coccia et al., 2012). Ainsi, l'IL-1 β pourrait favoriser la sécrétion d'IFN- γ dans les lymphocytes mémoires en CU, sans être apte à induire une signature pathogénique complète dans cette maladie.

En conclusion, l'étude de l'effet des cytokines sur les lymphocytes T mémoires de la muqueuse et des MLNs de patients atteints de MII confirme, en accord avec la littérature chez la souris et

chez l'humain, l'effet fondamental de l'IL-23 dans l'amplification des réponses Th17 et Th17/Th1 dans la muqueuse des patients atteints de MC. L'absence de réponse à l'IL-23 dans le MLN suggère que d'autres signaux sont nécessaires pour amplifier la sécrétion cytokinique (Gaublomme et al., 2015; Kawabe et al., 2016), probablement en provenance du microbiote et des cellules épithéliales (Sano et al., 2015). Nous n'avons pas pu tester directement l'effet de la neutralisation de l'IL-23 dans notre modèle de co-cultures en raison de la non-accessibilité de l'anticorps neutralisant ; et l'interprétation de l'absence d'effet du blocage de l'anti-IL12p40 est rendue difficile par les effets contradictoires de l'IL-12 et de l'IL-23 sur les réponses Th17 et Th17/Th1. Néanmoins, l'efficacité thérapeutique du risankizumab (anticorps anti-IL-23p19), en cours d'essai clinique dans la MC, corrobore ces conclusions (Sands et al., 2017). A l'inverse, nos données ne suggèrent pas que l'IL-23 serait une cible intéressante dans le traitement de la CU.

L'IL-1 β a un effet similaire sur les réponses Th17 et Th17/Th1 dans la muqueuse, et Th17/Th1 dans les MLNs, des patients atteints de MC et de CU. Alors qu'elle induit un profil plus pathogénique en termes de sécrétion de GM-CSF, de TNF- α , et d'IL-6 dans la MC que dans la CU, elle favorise la production d'IL-8 par lymphocytes mémoires de la muqueuse et des MLN en CU, qui pourraient avoir un rôle pathogénique. Sa neutralisation pourrait donc avoir un rôle thérapeutique dans les deux maladies même si, tel que discuté dans la section A5 des résultats, son utilisation reste problématique en raison des effets indésirables potentiels d'un tel blocage.

Enfin, l'IL-12 a un effet comparable sur l'augmentation de la production d'IFN- γ par les lymphocytes T mémoires et la conversion des T_{EM} Th17 en Th1*, dans la muqueuse et les MLNs, dans les deux maladies. Cependant, elle favorise la production d'IL-8 par les lymphocytes T mémoires dans la muqueuse et dans le MLN, en CU mais pas en MC. De plus,

elle induit, *in vitro*, une signature moléculaire pathogénique dans les T_{EM} Th17 isolés des MLNs en MC et en CU. La différence de signature moléculaire observée *in vivo* dans les T_{EM} Th17 entre la MC et la CU pourrait peut-être être en partie liée à la non-disponibilité de l'IL-12 dans les MLNs de patients atteints de CU. Cependant, une étude des MNPs ClassII⁺CD11c⁺HLADR^{+/bright} dans les MLNs de patients atteints de MC et de CU, montrait qu'ils ne produisaient pas d'IL12p70 après culture avec *E. faecalis* ni en MC, ni en CU (Sakuraba et al., 2009). Toutefois, la neutralisation de l'IL-12 devrait avoir un effet bénéfique par son action dans la muqueuse dans les deux maladies. Le rôle du blocage de l'IL-12 est difficile à évaluer en MC, puisque le risankizumab (blocage de l'IL-23 uniquement) semble aussi efficace que l'ustekinumab (blocage de l'IL12p40, commun à l'IL-12 et à l'IL-23). Un rôle bénéfique de l'anti-IL12p40 a aussi été rapporté dans la CU et pourrait, selon nos données, être lié au blocage de l'IL-12 plus qu'à celui de l'IL-23. De plus, certains patients ne répondent pas au risankizumab, ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes dans la pathogénèse des MII.

Les rôles de l'IL-1 β , de l'IL-12 et de l'IL-23 sur les réponses Th17, Th17/Th1 et Th1 sont résumés dans la Figure 15.

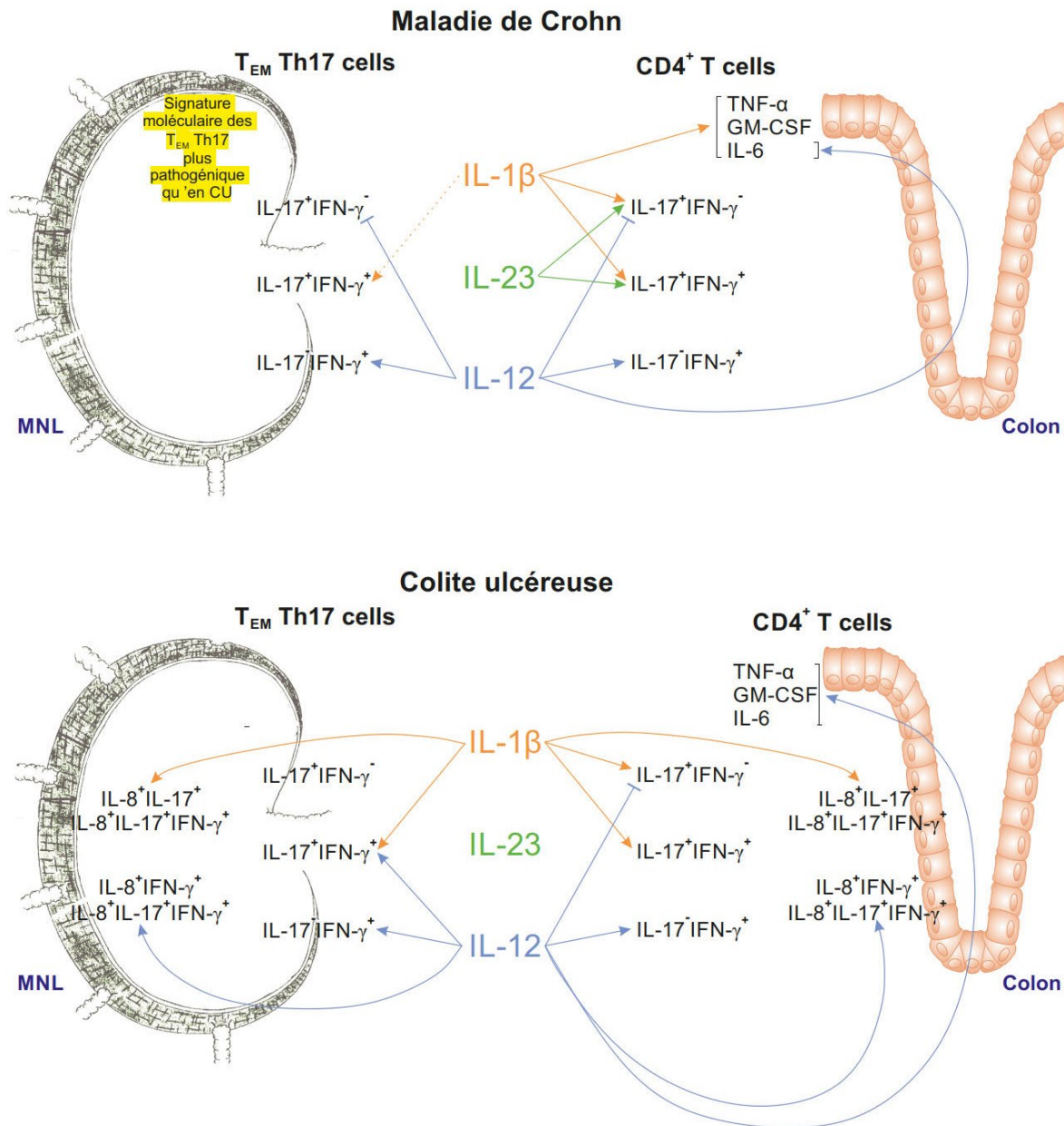


FIGURE 15 : EFFETS DE L'IL-1B, L'IL-12, L'IL-23 SUR LES RÉPONSES TH17, TH17/TH1 ET TH1

Avant toute stimulation cytokinique in vitro, le profil moléculaire des T_{EM} Th17 ganglionnaires est plus pathogénique en MC qu'en CU. L'IL-1β augmente les réponses Th17 et Th17/Th1 dans la muqueuse, et Th17/Th1 dans les MLNs, des patients atteints de MC et de CU. Elle induit la sécrétion de GM-CSF, TNF-α et IL-6 dans les T CD4⁺ muqueux en MC mais pas en CU. Elle augmente les réponses de type Th8/Th17 et Th8/Th17/Th1 dans les lymphocytes T mémoires de la muqueuse et des MLNs, en CU mais pas en MC. L'IL-23 augmente les réponses de type Th17 et Th17/Th1 dans les lymphocytes CD4⁺ muqueux des patients atteints de MC mais pas de CU. Dans les T_{EM} Th17 isolés des MLNs, elle n'a pas d'effet sur les réponses Th17, Th17/Th1 et Th1, ni en MC ni en CU. L'IL-12 favorise la production d'IFN-γ par les T CD4⁺ mémoires dans la muqueuse et la conversion des T_{EM} Th17 en Th1* dans les MLNs, et diminue la fréquence des Th17, en MC et en CU. Elle augmente la sécrétion de GM-CSF, TNF-α et IL-6 dans les T CD4⁺ muqueux en CU et d'IL-6 seulement, en MC. Dans la muqueuse et dans les MLNs, l'IL-12 augmente les réponses de type Th8/Th1 et Th8/Th17/Th1 en CU mais pas en MC.

D. CONTRIBUTION DES CELLULES INNEES INTESTINALES A LA PLASTICITE DES LYMPHOCYTES T

Nous montrons que les MNPs CD64⁺CD163⁻ (P3), et non CD64⁺CD163⁺ (P4), de la muqueuse intestinale augmentent les réponses mémoires de type Th17 et Th17/Th1 dans la MC et la CU, et pourraient ainsi contribuer au maintien et à l'exacerbation de l'inflammation intestinale. Cet effet est dépendant de l'IL-1 β dans les deux pathologies. Si les réponses Th17 et Th17/Th1 semblent donc régulées de manière similaire par les P3 dans la muqueuse des patients avec MC et CU, les P3 ont un effet différentiel selon la maladie sur la réponse IL-8. En effet, en CU seulement, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ muqueux produisant de l'IL-8, conjointement avec de l'IL-17 et de l'IFN- γ , augmente en coculture avec les cellules P3, via l'IL-1 β qu'elles sécrètent. Cette différence peut être donc attribuée à une induction spécifique par les MNPs ou à une réponse distincte des lymphocytes T, tel qu'indiqué dans la section précédente. Sans exclure formellement la première hypothèse, trois arguments plaident en faveur en faveur d'une spécificité de la réponse T propre à la CU: 1) les similitudes des cellules P3 dans les deux maladies, notamment en termes de phénotype et de sécrétion cytokinique, 2) l'absence de production d'IL-8 *ex-vivo* par les lymphocytes T en MC, 3) l'effet différentiel *in vitro* sur les lymphocytes T, de l'IL-1 β , de l'IL-12 et de l'IL-23.

Dans le MLN, nous avons également montré, en MC, le rôle des DCs CD14⁻CD64⁻CD163⁻ dans la plasticité des T_{CM} Th17. Ces DCs sont capables d'augmenter les réponses Th1 d'une manière dépendante de l'IL-12, cette dernière induisant la conversion de T_{CM} Th17 en Th1*. En CU, nos données préliminaires sur deux patients ne montrent pas d'effet des DCs CD14⁻CD64⁻CD163⁻ sur la réponse des T_{CM} Th17.

Nous avons aussi étudié l'impact d'autres cellules de l'immunité innée sur les réponses Th17 et Th17/Th1, et avons montré que les basophiles, mieux décrits pour leur implication sur les réponses de type 2, étaient capables d'augmenter les réponses de type Th17 et Th17/Th1 dans des lymphocytes T mémoires isolés des MLNs de patients atteints de MC et de CU. Plus particulièrement, ils augmentent la sécrétion d'IL-17 et d'IL-17/IFN- γ , mais pas d'IFN- γ , dans les lymphocytes T mémoires exprimant CCR7 (T_{CM} et T_{EM} CCR7⁺), qui leur confère la capacité de recirculer (Bromley et al., 2013; Debes et al., 2005). On peut donc spéculer que *in vivo*, les basophiles, exprimant eux même CCR7 qui leur confère une capacité migratoire (Lim et al., 2006), interagissent avec les lymphocytes T mémoires CCR7⁺ dans la muqueuse, mais aussi dans le MLN pour les renforcer. Nous avons d'ailleurs confirmé la présence de basophiles dans le MLN en MC et en CU par notre étude en cytométrie de masse. Nous n'avons pas observé de réponse différentielle des lymphocytes T mémoires CCR7⁺ aux basophiles, en terme de sécrétion d'IL-17 et d'IFN γ , ni d'IL-4 et d'IL-9, entre la MC et la CU. Cependant, dans la muqueuse des patients atteints de MII, les niveaux d'ARN de la TSLP, qui infère des fonctions pro-inflammatoires aux basophiles dans un modèle murin d'œsophagite à éosinophiles et induit une basophilie (Noti et al., 2013), sont augmentés en CU et diminués en MC (Rimoldi et al., 2005; Tanaka et al., 2010). Nous avons observé une basophilie dans les deux maladies mais plusieurs de nos co-cultures ont été faites avec des basophiles circulants allogéniques qui nous empêche de conclure à un rôle différentiel des basophiles eux-mêmes dans l'induction des réponses Th17 et Th17/Th1 entre la MC et la CU. Nous n'avons pas étudié l'impact des neutrophiles sur les réponses T mémoires mais il a été montré que les neutrophiles pouvaient sécréter de l'IL-23 dans la muqueuse des patients atteints de MII (Kvedaraite et al., 2015), et nous pouvons donc spéculer qu'ils pourraient aussi participer à l'amplification des réponses Th17 et Th17/Th1. Par contre,

chez la souris, les éosinophiles régulent négativement les réponses Th17 dans l'intestin grêle en supprimant, via leur sécrétion d'IL-1Ra (antagoniste compétitif de l'IL-1 β), la différenciation et le maintien des lymphocytes Th17 (Sugawara et al., 2016).

Nos observations sur l'effet des cellules innées sur les réponses Th17, Th17/Th1 et Th1 sont résumés dans la figure 16.

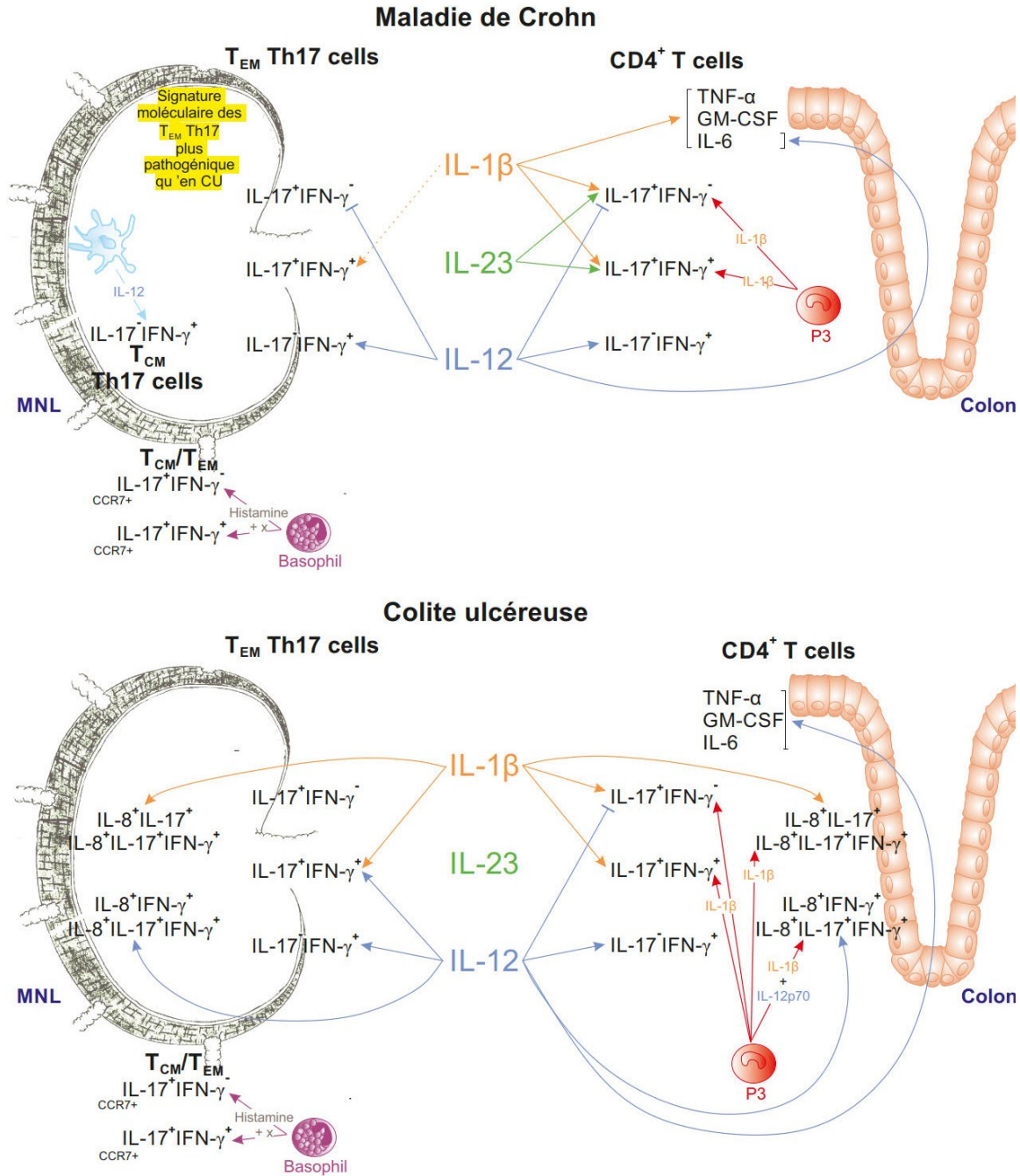


FIGURE 16 : EFFETS DE L'IL-1 β , L'IL-12, L'IL-23, DES BASOPHILES ET DES CELLULES $CD64^+CD163^-$ SUR LES RÉPONSES TH17, TH17/TH1 ET TH1

Les effets de l'IL-1 β , l'IL-12 et l'IL-23 sont résumés dans la figure 15. Dans la muqueuse colique, les MNP s $HLADR^+SIRP\alpha^+CD64^+CD163^-$ (P3) augmentent les réponses mémoires de type Th17 et Th17/Th1 en MC et en CU. En CU mais pas en MC, ils favorisent également les réponses de type Th8/Th17, Th8/Th17/Th1 via l'IL-1 β qu'ils sécrètent et Th8/Th1 via l'IL-1 β et l'IL-12 qu'ils sécrètent. Dans les MLNs, en MC mais pas en CU, les DCs $CD14^+CD64^+CD163^-$ augmentent les réponses Th1 d'une manière dépendante de l'IL-12, qui induit la conversion de T_{CM} Th17 en Th1*. Les basophiles favorisent aussi les réponses mémoires de type Th17 et Th17/Th1 dans les T_{CM} et T_{EM} $CCR7^+$ isolés des MLNs, via entre autres, l'histamine, en MC et en CU.

Globalement, l'ensemble des données suggèrent que les T_{EM} Th17 du MLN sont capables de plasticité vers un phénotype Th17/Th1 et Th1* en MC et en CU. En MC, *in vivo*, l'acquisition d'un phénotype pathogénique semble déjà initiée dans le MLN. Nos données montrent qu'il peut encore être rehaussé dans la muqueuse puisque l'exposition des Th17 muqueux à des MNPs CD163⁻ (P3) augmente la réponse Th17/Th1, via l'IL-1β qu'ils sécrètent et probablement l'IL-23. En CU, même si les T_{EM} Th17 des MLNs répondent à la stimulation par l'IL-1β, l'IL-12 et l'IL-23 *in vitro*, les données suggèrent qu'ils n'acquièrent pas un profil pathogénique *in vivo* dans le MLN. Leur caractère pathogénique pourrait plutôt être acquis dans la muqueuse, tel que le suggère l'augmentation de la fréquence des lymphocytes CD4⁺ IL-17⁺IFN-γ⁺ en présence des P3 et de l'IL-1β qu'ils sécrètent. De plus, la coculture avec des MNPs CD163⁻ (P3) et l'addition d'IL-1β et d'IL-12 à des lymphocytes T CD4⁺ muqueux favorise la production d'IL-8, conjointement à celle d'IFN-γ et d'IL-17. Ceci est cohérent avec le fait que l'IL-1β augmente la sécrétion d'IL-8 dans des clones de T_{EM} Th17 circulants, et que ces cellules Th17/Th8 attirent directement les neutrophiles, participant ainsi à la pathogénèse de la CU (Pelletier et al., 2010). En conclusion, les arguments sus-jacents sont en accord avec le fait que la CU serait principalement une maladie de la muqueuse intestinale alors que la MC est une maladie pénétrante impliquant d'autres acteurs comme les MLNs et le tissu adipeux.

E. IMPLICATIONS CLINIQUES ET THERAPEUTIQUES

Notre travail apporte une meilleure compréhension de la nature et du rôle des cellules innées, et plus particulièrement des MNPs, dans les MII. Ces données s'insèrent dans un vaste champ de recherche visant à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de ces maladies dans le but d'améliorer leur prise en charge. Les MII englobent un spectre de maladies qui varient dans leur localisation anatomique, leur sévérité, leur évolution, et leur réponse au traitement. La définition de trois entités distinctes (MC, CU et colite indéterminée) n'est pas suffisante pour appréhender complètement la complexité de la maladie, tant au moment du diagnostic qu'au cours de son évolution. De nombreux travaux visent donc à mieux stratifier les patients dans le but de pouvoir prédire l'évolution de leur maladie et de mieux adapter leur traitement. Il a d'ailleurs été montré que le pronostic de la maladie était meilleur avec une surveillance rapprochée des patients et une adaptation du traitement basée sur des critères objectifs et non seulement sur l'amélioration clinique (Colombel et al., 2018). Les MII étant d'origine plurifactorielle, différentes approches sont proposées afin de définir une stratification fonctionnelle, basée sur des biomarqueurs diagnostiques, corrélés à la sévérité de la maladie et/ou prédictifs de l'évolution et de la réponse au traitement.

La sévérité des MII est évaluée sur des critères cliniques et endoscopiques à l'aide de score d'activité et de sévérité. Certaines de ces données (jeune âge au diagnostic, extension de la maladie, besoin de stéroïdes, sévérité endoscopique en MC et CU et maladie pénétrante, atteinte périanale en MC) ont été corrélées à un mauvais pronostic de la maladie. Les études ont montré que la prise en charge de la maladie devait avoir pour cible, non seulement la rémission clinique mais aussi la rémission muqueuse, qui est associée à un meilleur pronostic (Neurath and Travis, 2012). De nombreux travaux visent donc à établir des biomarqueurs peu invasifs pour évaluer

cette réponse. Des corrélations positives avec l'activité endoscopique de la MC ont été démontrées avec des marqueurs couramment utilisés en clinique comme la CRP et la calprotectine fécale et sont de bons reflets de maladies modérées à sévères. Cependant, la CRP a une mauvaise valeur prédictive positive puisque presque la moitié des patients ont une CRP dans les limites de la normale malgré une inflammation intestinale (Solem et al., 2005). La calprotectine fécale a une très bonne valeur prédictive négative et devrait être un outil précieux dans la surveillance des patients, sous réserve de définir des seuils reproductibles (Mumolo et al., 2018). Dans le cadre de travaux de recherche plus fondamentale, il a aussi été montré, par exemple, qu'un index de dysbiose corrèlerait avec l'activité clinique de la maladie dans une cohorte pédiatrique de MC (Gevers et al., 2014) ; ou que les niveaux de tryptophane sérique étaient inversement corrélés à l'activité clinique de la maladie (Nikolaus et al., 2017).

Tel que discuté plus haut, nos données ont permis de mettre en évidence des différences entre la MC et la CU en termes de distribution des MNPs dans les MLNs mais pas dans la muqueuse. Les résultats obtenus dans les MLNs ne pourraient donc servir qu'en cas de chirurgie du patient. Si nos données ne peuvent donc pas être facilement exploitées pour différencier la MC de la CU, elles pourraient présenter un intérêt dans l'évaluation de la sévérité et du pronostic de la maladie. Notre approche par l'immunophénotypage du tissu, montre que la fréquence des cellules monocyte-like CD163⁺ (P3) et non des M ϕ (P4), ainsi que la fréquence et l'activation des neutrophiles, corrèlent avec la sévérité endoscopique de la MC, évaluée par le SES-CD. Si cette observation plaide pour un caractère pathogénique de ces cellules, l'intérêt de l'immunophénotypage du tissu pour évaluer la sévérité de la maladie est limité puisqu'il nécessite de réaliser une endoscopie avec biopsie. Par contre, la présence de certaines populations cellulaires dans la muqueuse pourrait avoir une valeur pronostique. La cinétique de

la fréquence des P3 au cours de la maladie mériterait donc une évaluation prospective afin de déterminer sa valeur pronostique et/ou la réponse au traitement. Il faut noter qu'une étude génétique récente montre que des polymorphismes des gènes *FOXO3*, *XACT*, *IGFBP1*, et de la région du *CMH* (qui sont différents des gènes de susceptibilité aux MII) prédisent l'évolution de la MC (Lee et al., 2017). De manière intéressante, ces gènes sont particulièrement enrichis dans les macrophages, ainsi que dans les monocytes et les cellules dendritiques, mettant une fois de plus en lumière l'importance des MNPs dans la pérennisation de la maladie.

Durant les dernières années, les intenses activités de recherche dans tous les domaines impliqués dans la physiopathologie des MII (génétique, barrière épithéliale, microbiote, diète, réponse immunitaire) ont permis le développement de nombreuses thérapies. Uhlig *et al.* ont récemment résumé l'ensemble des thérapies validées ou en cours de développement en fonction de leur base physiopathologique (Figure 17) (Uhlig and Powrie, 2018). Certaines ont fait la preuve de leur efficacité (anti-TNF α , anti-IL-12p40, anti-IL-23, anti- α 4 β 7, JAK/STAT inhibiteur, anti-S1P) alors que d'autres nécessitent plus d'investigations pour confirmer leur utilité (cellules T régulatrices, inhibiteurs de ROR γ t), ou ont échoué en raison d'effets adverses (anti-IL-17) ou de non-efficacité (anti-IFN- γ , anti-IL-10, anti-SMAD7 antisense) (Uhlig and Powrie, 2018).

Le choix thérapeutique induit par la disponibilité de ces traitements conduit à un besoin urgent d'outils permettant d'évaluer et de prédire la réponse aux traitements. Une étude a par exemple montré la corrélation entre la présence de TNF- α dans la muqueuse intestinale et la réponse au traitement par anti-TNF- α (Atreya et al., 2014). De même, l'augmentation de l'oncostatin M dans la muqueuse de patients atteints de MII, prédit une non-réponse aux anti-TNF- α (West et

al., 2017). Une autre étude montre, chez les patients non-répondeurs au traitement par anti-TNF- α , une accumulation de lymphocytes T CD4⁺TNFR2⁺IL-23R⁺. En présence d'IL-23, produite par les cellules CD14⁺ de la muqueuse, ces lymphocytes sont résistants à l'apoptose induite par les anti-TNF- α (Schmitt et al., 2018). De plus, Franco Leal *et al.* ont montré que les gènes de l'IL-1 β et de l'IL-17A restaient surexprimés chez les patients réfractaires aux anti-TNF- α (Leal et al., 2015). Nous avons montré que, quels que soient l'âge, le sexe, la localisation, le comportement de la maladie et son traitement, l'augmentation des réponses Th17 et Th17/Th1 par les cellules P3 étaient largement dépendantes de l'IL-1 β en MC et en CU, et probablement aussi dépendante de l'IL-23 en MC. Cibler l'IL-1 β dans certains sous-groupes de patients chez qui l'antagonisation du TNF- α et/ou de l'IL-23 aurait échoué serait peut-être bénéfique. Cependant, même si des antagonistes de l'IL-1 β ont été utilisés dans certaines formes d'IBD monogéniques (Shouval et al., 2016a), leurs effets secondaires potentiels et le rôle protecteur de l'IL-1 β dans la muqueuse (un cas de MII a été décrit sous Anakinra (Hugle et al., 2017)) pourraient limiter son utilisation à grande échelle.

Dès lors, il serait envisageable de cibler, non pas une cytokine ou une voie de signalisation, mais le recrutement, l'activation et/ou la survie des cellules pathogéniques. Par exemple, Camus et al. ont montré qu'un risque élevé de rechute était associé à l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺NKG2D⁺ qu'il pourrait être utile de cibler spécifiquement (Camus et al., 2014). D'autres ont spécifiquement ciblé les monocytes et les granulocytes circulants par une aphérèse qui s'est montré utile sur de petites cohortes de patients pédiatriques (Tanaka et al., 2017). S'il paraît effectivement intéressant de cibler les cellules P3 qui s'accumulent dans la muqueuse des patients atteints de MII, la prudence est cependant de mise puisque ces cellules sont plastiques et que les macrophages réparateurs en dérivent probablement. Cette notion est aussi confirmée par

une étude récente qui montre que le vedolizumab qui cible l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, empêche le recrutement de macrophages réparateurs dans le tissu et nuit à la cicatrisation muqueuse (ECCO, oral presentation 008, Schleier et al, 2018). Il faut donc plutôt poursuivre les efforts de recherche vers des thérapies qui favorisent la transformation des monocytes pro-inflammatoires en macrophages protecteurs afin de limiter l'inflammation et de réparer les dommages épithéliaux ; ou envisager un traitement séquentiel qui se limitent à la phase la plus active de la maladie. En effet, la pathophysiologie des MII se caractérise par un processus dynamique. Nous avons montré que les cellules P3 étaient augmentées dans la muqueuse inflammatoire quel que soit le contexte clinique et le traitement. Cependant, il a été rapporté que le profil cytokinique varie dans la muqueuse des patients atteints de MC en fonction des phases de la maladie (avant l'apparition des lésions, dans des lésions précoces ou tardives) (Zorzi et al., 2013). De plus, une étude très récente du profil protéomique sérique et du profil transcriptomique muqueux après traitement par anti-TNF- α ou vedolizumab montrent les changements spécifiques induits par chaque traitement et notamment, chez les patients réfractaires à l'infliximab et au vedolizumab, l'augmentation, dans la muqueuse et le sérum, d'IL-8 qu'il pourrait être intéressant de cibler (ECCO, oral presentation 003, de Bruyn et al, 2018).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons donc caractérisé dans ce travail, le phénotype, le profil moléculaire et la fonction des MNPs dans le colon et les cMLNs de patients atteints de MC et de CU. Cette étude s'inscrit dans la continuité de l'abondante littérature existante chez la souris et apporte une vue extensive des MNPs chez l'humain en contexte inflammatoire. Notamment, l'analyse des populations à l'échelle d'une seule cellule caractérise, pour la première fois par cette méthode, les MNPs de la muqueuse intestinale dans les MII, et la description précise de leur profil moléculaire permet la mise en perspective et la synthèse de nombreuses données parcellaires de la littérature. L'adjonction à ces résultats de données fonctionnelles sur la réponse T mémoire dans la muqueuse inflammatoire renforce encore l'originalité et la pertinence de ce travail. De plus, nous avons montré que la fréquence des monocyte-like inflammatoires (P3) et non celle des macrophages (P4), corrélient avec la sévérité endoscopique en MC. Notre travail a aussi caractérisé pour la première fois dans les MII, les MNPs des MLNs péri-coliques par leur profil transcriptionnel et leurs caractéristiques phénotypiques précises par des techniques de cytométrie de masse multi-couleurs. Enfin, nous avons étudié d'autres cellules de l'immunité innée, les granulocytes, les plus fréquents (neutrophiles) et les plus rares (basophiles), qui pourraient participer aussi de la pathogénèse de la maladie.

Ce travail ouvre donc de nombreuses perspectives. Il s'est limité au colon mais les données de la littérature (Bernardo et al., 2018; Bogaert et al., 2010) et nos données préliminaires montrent que la distribution et la fonction des MNPs iléaux sont probablement différentes et méritent donc d'être étudiées de manière indépendante. Il a porté sur une cohorte d'adultes et pourrait être étendu aux MII de l'adolescent, qui pourraient avoir des spécificités, telle que le suggère par

exemple l'association de certains polymorphismes géniques avec un âge de début plus précoce (Cleynen et al., 2016). Nous nous sommes limités à étudier les interactions cellulaires entre les MNPs et les lymphocytes T mais l'étude de la coopération entre les différentes cellules présentes dans le milieu (MNPs, granulocytes, ILC, lymphocytes, cellules épithéliales, cellules mésenchymateuses) est indispensable à une meilleure compréhension des interactions cellulaires *in vivo*. Les récents développements d'intestin *in vitro* ('gut on a chip') (Mittal et al., 2018) sont un outil qui devrait permettre d'appréhender ces interactions cellulaires ainsi que celles avec l'environnement microbien. L'importance de ce dernier a en effet été montrée dans de nombreuses études et notamment ses interactions avec les acteurs de l'immunité innée. Par exemple, il vient d'être rapporté que les IgG spécifiques de bactéries commensales sont augmentées dans la CU et favorisent, via leur interaction avec CD32a présents à la surface des MNPs intestinaux, la sécrétion d'IL-1 β et ainsi la réponse Th17 (Castro-Dopico et al., 2019). Étant donné que les altérations du microbiote semblent causales dans les MII (Yilmaz and Juillerat, 2019), la dissection des interactions précises entre le microbiote et les cellules de l'immunité, notamment innée, sont d'un intérêt majeur pour la compréhension des mécanismes initiant la maladie. De plus, de nombreuses études visent actuellement à mieux caractériser le microbiote dans les MII dans le but de stratifier la maladie et d'établir des signatures microbiennes pronostiques de l'évolution. Ainsi Yilmaz et al. ont récemment établi qu'une association spécifique d'espèces bactériennes dans le microbiote muqueux caractérise les MC récurrentes et ne répondant pas au traitement par anti-TNF α (Yilmaz and Juillerat, 2019). Aussi, l'étude PROTECT révèle une signature microbienne spécifique, dans les biopsies rectales de patients pédiatriques atteints de CU, qui est associée à une rémission sans corticoïdes à 52 semaines (Hyams et al., 2019). L'étude du microbiome s'intègre aussi plus largement dans des

études en cours visant à stratifier la maladie à plusieurs niveaux, en étudiant en même temps plusieurs strates de données moléculaires provenant d'un même patient ('multi-omics data') (Imhann et al., 2019). Dans notre étude, comme dans la plupart des études visant jusqu'à maintenant à stratifier la maladie (Haberman et al., 2014), nous avons comparé l'immunophénotype chez des patients ayant des diagnostics établis de MC ou de CU. Des études de 'multi-omics', intégrant l'immunophénotypage tissulaire, permettront de redéfinir de manière non biaisée la stratification des MII (Weiser and Simon, 2018), en la basant sur des données physiopathologiques (moléculaires et protéiques, de l'hôte et de l'environnement bactérien), dans le but d'améliorer la prise en charge par une médecine plus personnalisée. Elles pourront ainsi contribuer à définir des outils d'aide au diagnostic et/ou ayant une valeur pronostique, notamment sur la réponse au traitement, afin d'améliorer la prise en charge individuelle. Enfin, une meilleure compréhension de la pathogénèse de la maladie a pour but ultime la prévention des MII, dont la prévalence en fait un problème majeur de santé publique.

RÉFÉRENCES

- Human microbiome project consortium 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486:207-214.
- Acosta-Rodriguez, E.V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nature immunology* 8:639-646.
- Ahern, P.P., C. Schiering, S. Buonocore, M.J. McGeachy, D.J. Cua, K.J. Maloy, and F. Powrie. 2010. Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells. *Immunity* 33:279-288.
- Akhade, A.S., and A. Qadri. 2015. T-cell receptor activation of human CD4(+) T cells shifts the innate TLR response from CXCL8(hi) IFN-gamma(null) to CXCL8(lo) IFN-gamma(hi). *European journal of immunology* 45:2628-2637.
- Alcantara-Hernandez, M., R. Leylek, L.E. Wagar, E.G. Engleman, T. Keler, M.P. Marinkovich, M.M. Davis, G.P. Nolan, and J. Idoyaga. 2017. High-Dimensional Phenotypic Mapping of Human Dendritic Cells Reveals Interindividual Variation and Tissue Specialization. *Immunity* 47:1037-1050.e1036.
- Amre, D.K., S. D'Souza, K. Morgan, G. Seidman, P. Lambrette, G. Grimard, D. Israel, D. Mack, P. Ghadirian, C. Deslandres, V. Chotard, B. Budai, L. Law, E. Levy, and E.G. Seidman. 2007. Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *The American journal of gastroenterology* 102:2016-2025.
- Ananthakrishnan, A.N., C.N. Bernstein, D. Iliopoulos, A. Macpherson, M.F. Neurath, R.A.R. Ali, S.R. Vavricka, and C. Fiocchi. 2018. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 15:39-49.
- Ananthakrishnan, A.N., L.M. Higuchi, E.S. Huang, H. Khalili, J.M. Richter, C.S. Fuchs, and A.T. Chan. 2012. Aspirin, nonsteroidal anti-inflammatory drug use, and risk for Crohn disease and ulcerative colitis: a cohort study. *Annals of internal medicine* 156:350-359.
- Ananthakrishnan, A.N., H. Khalili, G.G. Konijeti, L.M. Higuchi, P. de Silva, C.S. Fuchs, W.C. Willett, J.M. Richter, and A.T. Chan. 2014. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 63:776-784.
- Ananthakrishnan, A.N., H. Khalili, G.G. Konijeti, L.M. Higuchi, P. de Silva, J.R. Korzenik, C.S. Fuchs, W.C. Willett, J.M. Richter, and A.T. Chan. 2013. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* 145:970-977.
- Andoh, A., Y. Deguchi, O. Inatomi, Y. Yagi, S. Bamba, T. Tsujikawa, and Y. Fujiyama. 2006. Immunohistochemical study of chymase-positive mast cells in inflammatory bowel disease. *Oncology reports* 16:103-107.
- Andoh, A., H. Imaeda, T. Aomatsu, O. Inatomi, S. Bamba, M. Sasaki, Y. Saito, T. Tsujikawa, and Y. Fujiyama. 2011. Comparison of the fecal microbiota profiles between ulcerative colitis and Crohn's disease using terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Journal of gastroenterology* 46:479-486.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi, and S. Romagnani. 2007. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 204:1849-1861.
- Asano, K., N. Takahashi, M. Ushiki, M. Monya, F. Aihara, E. Kuboki, S. Moriyama, M. Iida, H. Kitamura, C.H. Qiu, T. Watanabe, and M. Tanaka. 2015. Intestinal CD169(+) macrophages initiate mucosal inflammation by secreting CCL8 that recruits inflammatory monocytes. *Nature communications* 6:7802.
- Atarashi, K., T. Tanoue, M. Ando, N. Kamada, Y. Nagano, S. Narushima, W. Suda, A. Imaoka, H. Setoyama, T. Nagamori, E. Ishikawa, T. Shima, T. Hara, S. Kado, T. Jinnohara, H. Ohno, T. Kondo, K. Toyooka, E. Watanabe, S. Yokoyama, S. Tokoro, H. Mori, Y. Noguchi, H. Morita, Ivanov, II, T. Sugiyama, G. Nunez, J.G. Camp, M. Hattori, Y. Umesaki, and K. Honda. 2015. Th17 Cell Induction by Adhesion of Microbes to Intestinal Epithelial Cells. *Cell* 163:367-380.
- Atarashi, K., T. Tanoue, K. Oshima, W. Suda, Y. Nagano, H. Nishikawa, S. Fukuda, T. Saito, S. Narushima, K. Hase, S. Kim, J.V. Fritz, P. Wilmes, S. Ueha, K. Matsushima, H. Ohno, B. Olle, S. Sakaguchi, T. Taniguchi, H. Morita, M. Hattori, and K. Honda. 2013. Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500:232-236.
- Atreya, R., H. Neumann, C. Neufert, M.J. Waldner, U. Billmeier, Y. Zopf, M. Willma, C. App, T. Munster, H. Kessler, S. Maas, B. Gebhardt, R. Heimke-Brinck, E. Reuter, F. Dorje, T.T. Rau, W. Uter, T.D. Wang, R. Kiesslich, M.

- Vieth, E. Hannappel, and M.F. Neurath. 2014. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease. *Nature medicine* 20:313-318.
- Baba, N., V.Q. Van, K. Wakahara, M. Rubio, G. Fortin, B. Panzini, G. Soucy, R. Wassef, C. Richard, R. Tamaz, R. Lahaie, E.J. Bernard, Y. Caussignac, R. Leduc, R. Lougnarath, C. Bergeron, M.A. Racicot, F. Bergeron, M.A. Panzini, P. Demetter, D. Franchimont, K. Schakel, G. Weckbecker, F. Kolbinger, C. Heusser, T. Huber, K. Welzenbach, and M. Sarfati. 2013. CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1beta and TNF. *The Journal of experimental medicine* 210:1251-1263.
- Bain, C.C., C.L. Scott, H. Uronen-Hansson, S. Gudjonsson, O. Jansson, O. Grip, M. Guillems, B. Malissen, W.W. Agace, and A.M. Mowat. 2013. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal immunology* 6:498-510.
- Bajpai, G., C. Schneider, N. Wong, A. Bredemeyer, and M. Hulsmans. 2018. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. 24:1234-1245.
- Baratin, M., L. Simon, A. Jorquera, C. Ghigo, D. Dembele, J. Nowak, R. Gentek, S. Wienert, F. Klauschen, B. Malissen, M. Dalod, and M. Bajenoff. 2017. T Cell Zone Resident Macrophages Silently Dispose of Apoptotic Cells in the Lymph Node. *Immunity* 47:349-362.e345.
- Barman, S., H. Kayama, D. Okuzaki, T. Ogino, H. Osawa, H. Matsuno, T. Mizushima, M. Mori, J. Nishimura, and K. Takeda. 2016. Identification of a human intestinal myeloid cell subset that regulates gut homeostasis. *International immunology* 28:533-545.
- Bauche, D., B. Joyce-Shaikh, R. Jain, J. Grein, K.S. Ku, W.M. Blumenschein, S.C. Ganal-Vonarburg, D.C. Wilson, T.K. McClanahan, R.W. Malefyt, A.J. Macpherson, L. Annamalai, J.H. Yearley, and D.J. Cua. 2018. LAG3(+) Regulatory T Cells Restrain Interleukin-23-Producing CX3CR1(+) Gut-Resident Macrophages during Group 3 Innate Lymphoid Cell-Driven Colitis. *Immunity* 49:342-352.e345.
- Becattini, S., D. Latorre, F. Mele, M. Foglierini, C. De Gregorio, A. Cassotta, B. Fernandez, S. Kelderman, T.N. Schumacher, D. Corti, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2015. T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4(+) T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science (New York, N.Y.)* 347:400-406.
- Beck, P.L., J.A. Cotton, J.M. Platnich, D.A. Muruve, A.G. Buret, and H. Jijon. 2016. Interleukin-8 in gastrointestinal inflammation and malignancy: induction and clinical consequences. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research* 13.
- Bellomo, A., R. Gentek, M. Bajenoff, and M. Baratin. 2018. Lymph node macrophages: Scavengers, immune sentinels and trophic effectors. *Cellular immunology* 330:168-174.
- Beltran, C.J., L.E. Nunez, D. Diaz-Jimenez, N. Farfan, E. Candia, C. Heine, F. Lopez, M.J. Gonzalez, R. Quera, and M.A. Hermoso. 2010. Characterization of the novel ST2/IL-33 system in patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 16:1097-1107.
- Benchimol, E.I., G.G. Kaplan, A.R. Otley, G.C. Nguyen, F.E. Underwood, A. Guttman, J.L. Jones, B.K. Potter, C.A. Catley, Z.J. Nugent, Y. Cui, D. Tanyingoh, N. Mojaverian, A. Bitton, M.W. Carroll, J. deBruyn, T.J.B. Dummer, W. El-Matary, A.M. Griffiths, K. Jacobson, M.E. Kuenzig, D. Leddin, L.M. Lix, D.R. Mack, S.K. Murthy, J.N.P. Sanchez, H. Singh, L.E. Targownik, M. Vutcovici, and C.N. Bernstein. 2017. Rural and Urban Residence During Early Life is Associated with Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Inception and Birth Cohort Study. *The American journal of gastroenterology* 112:1412-1422.
- Bennike, T.B., T.G. Carlsen, T. Ellingsen, O.K. Bonderup, H. Glerup, M. Bogsted, G. Christiansen, S. Birkelund, A. Stensballe, and V. Andersen. 2015. Neutrophil Extracellular Traps in Ulcerative Colitis: A Proteome Analysis of Intestinal Biopsies. *Inflammatory bowel diseases* 21:2052-2067.
- Berg, J. 2016. Gene-environment interplay. *Science (New York, N.Y.)* 354:15.
- Beriou, G., E.M. Bradshaw, E. Lozano, C.M. Costantino, W.D. Hastings, T. Orban, W. Elyaman, S.J. Khoury, V.K. Kuchroo, C. Baecher-Allan, and D.A. Hafler. 2010. TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 185:46-54.
- Bernardo, D., L. Durant, E.R. Mann, E. Bassity, E. Montalvillo, R. Man, R. Vora, D. Reddi, F. Bayiroglu, L. Fernandez-Salazar, N.R. English, S.T. Peake, J. Landy, G.H. Lee, G. Malietzis, Y.H. Siaw, A.U. Muruganathan, P. Hendy, E. Sanchez-Recio, R.K. Phillips, J.A. Garrote, P. Scott, J. Parkhill, M. Paulsen, A.L. Hart, H.O. Al-Hassi, E. Arranz, A.W. Walker, S.R. Carding, and S.C. Knight. 2016. Chemokine (C-C Motif) Receptor 2 Mediates Dendritic Cell Recruitment to the Human Colon but Is Not Responsible for Differences Observed in

- Dendritic Cell Subsets, Phenotype, and Function Between the Proximal and Distal Colon. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 2:22-39.e25.
- Bernardo, D., A.C. Marin, S. Fernandez-Tome, A. Montalban-Arques, A. Carrasco, E. Tristan, L. Ortega-Moreno, I. Mora-Gutierrez, A. Diaz-Guerra, R. Caminero-Fernandez, P. Miranda, F. Casals, M. Caldas, M. Jimenez, S. Casabona, F. De la Morena, M. Esteve, C. Santander, M. Chaparro, and J.P. Gisbert. 2018. Human intestinal pro-inflammatory CD11c(high)CCR2(+)/CX3CR1(+) macrophages, but not their tolerogenic CD11c(-)CCR2(-)CX3CR1(-) counterparts, are expanded in inflammatory bowel disease. *Mucosal immunology* 11:1114-1126.
- Bernink, J.H., L. Krabbendam, K. Germar, E. de Jong, K. Gronke, M. Kofoed-Nielsen, J.M. Munneke, M.D. Hazenberg, J. Villaudy, C.J. Buskens, W.A. Bemelman, A. Diefenbach, B. Blom, and H. Spits. 2015. Interleukin-12 and -23 Control Plasticity of CD127(+) Group 1 and Group 3 Innate Lymphoid Cells in the Intestinal Lamina Propria. *Immunity* 43:146-160.
- Bernink, J.H., C.P. Peters, M. Munneke, A.A. te Velde, S.L. Meijer, K. Weijer, H.S. Hreggvidsdottir, S.E. Heinsbroek, N. Legrand, C.J. Buskens, W.A. Bemelman, J.M. Mjosberg, and H. Spits. 2013. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature immunology* 14:221-229.
- Biancheri, P., A. Di Sabatino, F. Ammoscato, F. Facciotti, F. Caprioli, R. Curciarello, S.S. Hoque, A. Ghanbari, I. Joe-Njoku, P. Giuffrida, L. Rovedatti, J. Geginat, G.R. Corazza, and T.T. MacDonald. 2014. Absence of a role for interleukin-13 in inflammatory bowel disease. *European journal of immunology* 44:370-385.
- Billmeier, U., W. Dieterich, M.F. Neurath, and R. Atreya. 2016. Molecular mechanism of action of anti-tumor necrosis factor antibodies in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology* 22:9300-9313.
- Bischoff, S.C. 2016. Mast cells in gastrointestinal disorders. *European journal of pharmacology* 778:139-145.
- Biswas, A., Y.J. Liu, L. Hao, A. Mizoguchi, N.H. Salzman, C.L. Bevins, and K.S. Kobayashi. 2010. Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14739-14744.
- Bogaert, S., D. Laukens, H. Peeters, L. Melis, K. Olievier, N. Boon, G. Verbruggen, J. Vandesompele, D. Elewaut, and M. De Vos. 2010. Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease. *BMC immunology* 11:61.
- Bouguen, G., A. Langlois, M. Djouina, J. Branche, D. Koriche, E. Dewaeles, A. Mongy, J. Auwerx, J.F. Colombel, P. Desreumaux, L. Dubuquoy, and B. Bertin. 2015. Intestinal steroidogenesis controls PPARgamma expression in the colon and is impaired during ulcerative colitis. *Gut* 64:901-910.
- Brandt, E., J.F. Colombel, N. Ectors, L. Gambiez, D. Emilie, K. Geboes, M. Capron, and P. Desreumaux. 2000. Enhanced production of IL-8 in chronic but not in early ileal lesions of Crohn's disease (CD). *Clinical and experimental immunology* 122:180-185.
- Brasseit, J., E. Althaus-Steiner, M. Faderl, N. Dickgreber, L. Saurer, V. Genitsch, T. Dolowschiak, H. Li, D. Finke, W.D. Hardt, K.D. McCoy, A.J. Macpherson, N. Corazza, M. Noti, and C. Mueller. 2015. CD4 T cells are required for both development and maintenance of disease in a new mouse model of reversible colitis. *Mucosal immunology*
- Brennan, G.T., S.D. Melton, S.J. Spechler, and L.A. Feagins. 2017. Clinical Implications of Histologic Abnormalities in Ileocolonic Biopsies of Patients With Crohn's Disease in Remission. *Journal of clinical gastroenterology* 51:43-48.
- Broadhurst, M.J., J.M. Leung, V. Kashyap, J.M. McCune, U. Mahadevan, J.H. McKerrow, and P. Loke. 2010. IL-22+ CD4+ T cells are associated with therapeutic trichuris trichiura infection in an ulcerative colitis patient. *Science translational medicine* 2:60ra88.
- Bromley, S.K., S. Yan, M. Tomura, O. Kanagawa, and A.D. Luster. 2013. Recirculating memory T cells are a unique subset of CD4+ T cells with a distinct phenotype and migratory pattern. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190:970-976.
- Browne, A.S., and C.R. Kelly. 2017. Fecal Transplant in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology clinics of North America* 46:825-837.
- Bruno, M.E., E.W. Rogier, R.I. Arsenescu, D.R. Flomenhoft, C.J. Kurkjian, G.I. Ellis, and C.S. Kaetzel. 2015. Correlation of Biomarker Expression in Colonic Mucosa with Disease Phenotype in Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Digestive diseases and sciences* 60:2976-2984.

- Brynjolfsson, S.F., M.K. Magnusson, P.L. Kong, T. Jensen, J.L. Kuijper, K. Hakansson, C.B. Read, V.W. Stennicke, H. Sjovall, and M. Jo Wick. 2016. An Antibody Against Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1 (TREM-1) Dampens Proinflammatory Cytokine Secretion by Lamina Propria Cells from Patients with IBD. *Inflammatory bowel diseases* 22:1803-1811.
- Bsat, M., L. Chapuy, N. Baba, M. Rubio, B. Panzini, R. Wassef, C. Richard, G. Soucy, H. Mehta, and M. Sarfati. 2015. Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients. *Journal of leukocyte biology* 98:671-681.
- Bujko, A., N. Atlasy, and O.J.B. Landsverk. 2018. Transcriptional and functional profiling defines human small intestinal macrophage subsets. 215:441-458.
- Buonocore, S., P.P. Ahern, H.H. Uhlig, Ivanov, I., D.R. Littman, K.J. Maloy, and F. Powrie. 2010. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature* 464:1371-1375.
- Cader, M.Z., and A. Kaser. 2013. Recent advances in inflammatory bowel disease: mucosal immune cells in intestinal inflammation. *Gut* 62:1653-1664.
- Cadwell, K., K.K. Patel, N.S. Maloney, T.C. Liu, A.C. Ng, C.E. Storer, R.D. Head, R. Xavier, T.S. Stappenbeck, and H.W. Virgin. 2010. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine. *Cell* 141:1135-1145.
- Calderon-Gomez, E., H. Bassolas-Molina, R. Mora-Buch, I. Dotti, N. Planell, M. Esteller, M. Gallego, M. Marti, C. Garcia-Martin, C. Martinez-Torro, I. Ordas, S. Singh, J. Panes, D. Benitez-Ribas, and A. Salas. 2016. Commensal-Specific CD4(+) Cells From Patients With Crohn's Disease Have a T-Helper 17 Inflammatory Profile. *Gastroenterology* 151:489-500.e483.
- Camus, M., S. Esses, B. Pariente, L. Le Bourhis, C. Douay, V. Chardiny, I. Mocan, K. Benlagha, E. Clave, A. Toubert, L. Mayer, and M. Allez. 2014. Oligoclonal expansions of mucosal T cells in Crohn's disease predominate in NKG2D-expressing CD4 T cells. *Mucosal immunology* 7:325-334.
- Casini-Raggi, V., L. Kam, Y.J. Chong, C. Fiocchi, T.T. Pizarro, and F. Cominelli. 1995. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154:2434-2440.
- Castro-Dopico, T., T.W. Dennison, J.R. Ferdinand, R.J. Mathews, A. Fleming, D. Clift, B.J. Stewart, C. Jing, K. Strongili, L.I. Labzin, E.J.M. Monk, K. Saeb-Parsy, C.E. Bryant, S. Clare, M. Parkes, and M.R. Clatworthy. 2019. Anti-commensal IgG Drives Intestinal Inflammation and Type 17 Immunity in Ulcerative Colitis. *Immunity* 50:1099-1114.e1010.
- Cebula, A., M. Seweryn, G.A. Rempala, S.S. Pabla, R.A. McIndoe, T.L. Denning, L. Bry, P. Kraj, P. Kisielow, and L. Ignatowicz. 2013. Thymus-derived regulatory T cells contribute to tolerance to commensal microbiota. *Nature* 497:258-262.
- Cerovic, V., S.A. Houston, C.L. Scott, A. Aumeunier, U. Yrlid, A.M. Mowat, and S.W. Milling. 2013. Intestinal CD103(-) dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal immunology* 6:104-113.
- Cerovic, V., S.A. Houston, J. Westlund, L. Utraiainen, E.S. Davison, C.L. Scott, C.C. Bain, T. Joeris, W.W. Agace, R.A. Kroccek, A.M. Mowat, U. Yrlid, and S.W. Milling. 2015. Lymph-borne CD8alpha+ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8+ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal immunology* 8:38-48.
- Chapuy L, B.M., Sarkizova S, Rubio M, Therrien A, Wassef E, Bouin M, Orlicka K, Weber A, Hacoheh N, Villani AC, Sarfati M. 2018. Two distinct colonic CD14+ subsets characterized by single cell RNA profiling in Crohn's disease. *Mucosal immunology*
- Chapuy, L., M. Bsat, H. Mehta, M. Rubio, K. Wakahara, V.Q. Van, N. Baba, C. Cheong, T.J. Yun, B. Panzini, R. Wassef, C. Richard, R. Tamaz, G. Soucy, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2014. Basophils increase in Crohn disease and ulcerative colitis and favor mesenteric lymph node memory TH17/TH1 response. *The Journal of allergy and clinical immunology* 134:978-981.e971.
- Chassaing, B., and A. Darfeuille-Michaud. 2011. The commensal microbiota and enteropathogens in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140:1720-1728.
- Cheong, C., I. Matos, J.H. Choi, D.B. Dandamudi, E. Shrestha, M.P. Longhi, K.L. Jeffrey, R.M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, H. Koh, A. Rodriguez, J. Idoyaga, M. Pack, K. Velinzon, C.G. Park, and R.M. Steinman. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143:416-429.

- Choung, R.S., F. Princen, T.P. Stockfisch, J. Torres, A.C. Maue, C.K. Porter, F. Leon, B. De Vroey, S. Singh, M.S. Riddle, J.A. Murray, and J.F. Colombel. 2016. Serologic microbial associated markers can predict Crohn's disease behaviour years before disease diagnosis. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 43:1300-1310.
- Christophi, G.P., R. Rong, P.G. Holtzapple, P.T. Massa, and S.K. Landas. 2012. Immune markers and differential signaling networks in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 18:2342-2356.
- Ciofani, M., A. Madar, C. Galan, M. Sellars, K. Mace, F. Pauli, A. Agarwal, W. Huang, C.N. Parkhurst, M. Muratet, K.M. Newberry, S. Meadows, A. Greenfield, Y. Yang, P. Jain, F.K. Kirigin, C. Birchmeier, E.F. Wagner, K.M. Murphy, R.M. Myers, R. Bonneau, and D.R. Littman. 2012. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151:289-303.
- Clark, G.J., L. Jamriska, M. Rao, and D.N. Hart. 2007. Monocytes immunoselected via the novel monocyte specific molecule, CD300e, differentiate into active migratory dendritic cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 30:303-311.
- Cleynen, I., G. Boucher, L. Jostins, L.P. Schumm, S. Zeissig, T. Ahmad, V. Andersen, J.M. Andrews, V. Annese, S. Brand, S.R. Brant, J.H. Cho, M.J. Daly, M. Dubinsky, R.H. Duerr, L.R. Ferguson, A. Franke, R.B. Gearry, P. Goyette, H. Hakonarson, J. Halfvarson, J.R. Hov, H. Huang, N.A. Kennedy, L. Kupcinskas, I.C. Lawrance, J.C. Lee, J. Satsangi, S. Schreiber, E. Theatre, A.E. van der Meulen-de Jong, R.K. Weersma, D.C. Wilson, M. Parkes, S. Vermeire, J.D. Rioux, J. Mansfield, M.S. Silverberg, G. Radford-Smith, D.P. McGovern, J.C. Barrett, and C.W. Lees. 2016. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 387:156-167.
- Coccia, M., O.J. Harrison, C. Schiering, M.J. Asquith, B. Becher, F. Powrie, and K.J. Maloy. 2012. IL-1beta mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *The Journal of experimental medicine* 209:1595-1609.
- Colombel, J.F., R. Panaccione, P. Bossuyt, M. Lukas, F. Baert, T. Vanasek, A. Danalioglu, G. Novacek, A. Armuzzi, X. Hebuterne, S. Travis, S. Danese, W. Reinisch, W.J. Sandborn, P. Rutgeerts, D. Hommes, S. Schreiber, E. Neimark, B. Huang, Q. Zhou, P. Mendez, J. Petersson, K. Wallace, A.M. Robinson, R.B. Thakkar, and G. D'Haens. 2018. Effect of tight control management on Crohn's disease (CALM): a multicentre, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet* 390:2779-2789.
- Coombes, J.L., K.R. Siddiqui, C.V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C.M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204:1757-1764.
- Coskun, M., S. Vermeire, and O.H. Nielsen. 2017. Novel Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Disease. *Trends in pharmacological sciences* 38:127-142.
- Cosmi, L., F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2014. Th17 and non-classic Th1 cells in chronic inflammatory disorders: two sides of the same coin. *International archives of allergy and immunology* 164:171-177.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, M. Capone, E. Cardilicchia, F. Frosali, V. Querci, R. Angeli, A. Matucci, M. Fambrini, F. Liotta, P. Parronchi, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2010. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4(+) T cells that produce both IL-17A and IL-4. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:222-230 e221-224.
- Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik, and A. Cortot. 2011. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140:1785-1794.
- Cros, J., N. Cagnard, K. Woollard, N. Patey, S.Y. Zhang, B. Senechal, A. Puel, S.K. Biswas, D. Moshous, C. Picard, J.P. Jais, D. D'Cruz, J.L. Casanova, C. Trouillet, and F. Geissmann. 2010. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33:375-386.
- D'Haens, G.R., K. Geboes, M. Peeters, F. Baert, F. Penninckx, and P. Rutgeerts. 1998. Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 114:262-267.
- Danese, S., J. Rudzinski, W. Brandt, J.L. Dupas, L. Peyrin-Biroulet, Y. Bouhnik, D. Kleczkowski, P. Uebel, M. Lukas, M. Knutsson, F. Erlandsson, M.B. Hansen, and S. Keshav. 2015. Tralokinumab for moderate-to-severe UC: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase IIa study. *Gut* 64:243-249.
- Daperno, M., G. D'Haens, G. Van Assche, F. Baert, P. Bulois, V. Maunoury, R. Sostegni, R. Rocca, A. Pera, A. Gevers, J.Y. Mary, J.F. Colombel, and P. Rutgeerts. 2004. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 60:505-512.

- De Schepper, S., S. Verheijden, J. Aguilera-Lizarraga, M.F. Viola, W. Boesmans, N. Stakenborg, I. Voytyuk, I. Smidt, B. Boeckx, I. Dierckx de Casterle, V. Baekelandt, E. Gonzalez Dominguez, M. Mack, I. Depoortere, B. De Strooper, B. Sprangers, U. Himmelreich, S. Soenen, M. Guilliams, P. Vanden Berghe, E. Jones, D. Lambrechts, and G. Boeckxstaens. 2018. Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis. *Cell*
- de Souza, H.S., and C. Fiocchi. 2016. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 13:13-27.
- de Souza, H.S.P., C. Fiocchi, and D. Iliopoulos. 2017. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 14:739-749.
- Debes, G.F., C.N. Arnold, A.J. Young, S. Krautwald, M. Lipp, J.B. Hay, and E.C. Butcher. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature immunology* 6:889-894.
- DeBrosse, C.W., J.W. Case, P.E. Putnam, M.H. Collins, and M.E. Rothenberg. 2006. Quantity and distribution of eosinophils in the gastrointestinal tract of children. *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 9:210-218.
- Desch, A.N., S.L. Gibbings, R. Goyal, R. Kolde, J. Bednarek, T. Bruno, J.E. Slansky, J. Jacobelli, R. Mason, Y. Ito, E. Messier, G.J. Randolph, M. Prabagar, S.M. Atif, E. Segura, R.J. Xavier, D.L. Bratton, W.J. Janssen, P.M. Henson, and C.V. Jakubzick. 2016. Flow Cytometric Analysis of Mononuclear Phagocytes in Nondiseased Human Lung and Lung-Draining Lymph Nodes. *American journal of respiratory and critical care medicine* 193:614-626.
- Diehl, G.E., R.S. Longman, J.X. Zhang, B. Breart, C. Galan, A. Cuesta, S.R. Schwab, and D.R. Littman. 2013. Microbiota restricts trafficking of bacteria to mesenteric lymph nodes by CX(3)CR1(hi) cells. *Nature* 494:116-120.
- Dige, A., M.K. Magnusson, L. Ohman, C.L. Hvas, J. Kelsen, M.J. Wick, and J. Agnholt. 2016. Reduced numbers of mucosal DR(int) macrophages and increased numbers of CD103(+) dendritic cells during anti-TNF-alpha treatment in patients with Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 51:692-699.
- Dombrowicz, D., S. Nutten, P. Desreumaux, C. Neut, G. Torpier, M. Peeters, J.F. Colombel, and M. Capron. 2001. Role of the high affinity immunoglobulin E receptor in bacterial translocation and intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 193:25-34.
- Domingo, C., X. Pomaes, N. Angril, N. Rudi, M.J. Amengual, and R.M. Mirapeix. 2013. Effectiveness of omalizumab in non-allergic severe asthma. *Journal of biological regulators and homeostatic agents* 27:45-53.
- Dominguez-Villar, M., and D.A. Hafler. 2018. Regulatory T cells in autoimmune disease. *Nature immunology*
- Dubucquoi, S., A. Janin, O. Klein, P. Desreumaux, P. Quandalle, A. Cortot, M. Capron, and J.F. Colombel. 1995. Activated eosinophils and interleukin 5 expression in early recurrence of Crohn's disease. *Gut* 37:242-246.
- Dubuquoy, L., E.A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J.F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124:1265-1276.
- Duhon, T., and D.J. Campbell. 2014. IL-1beta promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193:120-129.
- Durek, P., K. Nordstrom, G. Gasparoni, A. Salhab, C. Kressler, M. de Almeida, K. Bassler, T. Ulas, F. Schmidt, J. Xiong, P. Glazar, F. Klironomos, A. Sinha, S. Kinkley, X. Yang, L. Arrigoni, A.D. Amirabad, F.B. Ardakani, L. Feuerbach, O. Gorka, P. Ebert, F. Muller, N. Li, S. Frischbutter, S. Schlickeiser, C. Cendon, S. Frohler, B. Felder, N. Gasparoni, C.D. Imbusch, B. Hutter, G. Zipprich, Y. Tauchmann, S. Reinke, G. Wassilew, U. Hoffmann, A.S. Richter, L. Sieverling, H.D. Chang, U. Syrbe, U. Kalus, J. Eils, B. Brors, T. Manke, J. Ruland, T. Lengauer, N. Rajewsky, W. Chen, J. Dong, B. Sawitzki, H.R. Chung, P. Rosenstiel, M.H. Schulz, J.L. Schultze, A. Radbruch, J. Walter, A. Hamann, and J.K. Polansky. 2016. Epigenomic Profiling of Human CD4(+) T Cells Supports a Linear Differentiation Model and Highlights Molecular Regulators of Memory Development. *Immunity* 45:1148-1161.
- Eckman, J.A., P.M. Sterba, D. Kelly, V. Alexander, M.C. Liu, B.S. Bochner, D.W. Macglashan, Jr., and S.S. Saini. 2010. Effects of omalizumab on basophil and mast cell responses using an intranasal cat allergen challenge. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:889-895 e887.

- Eizenberg-Magar, I., J. Rimer, I. Zaretsky, D. Lara-Astiaso, S. Reich-Zeliger, and N. Friedman. 2017. Diverse continuum of CD4(+) T-cell states is determined by hierarchical additive integration of cytokine signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114:E6447-e6456.
- Eken, A., A.K. Singh, P.M. Treuting, and M. Oukka. 2014. IL-23R+ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal immunology* 7:143-154.
- Elkadri, A.A., J.M. Stempak, T.D. Walters, S. Lal, A.M. Griffiths, A.H. Steinhart, and M.S. Silverberg. 2013. Serum antibodies associated with complex inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 19:1499-1505.
- Esterhazy, D., J. Loschko, M. London, V. Jove, T.Y. Oliveira, and D. Mucida. 2016. Classical dendritic cells are required for dietary antigen-mediated induction of peripheral T(reg) cells and tolerance. 17:545-555.
- Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo. 2013. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature reviews. Immunology*
- Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo. 2014. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nature reviews. Immunology* 14:24-35.
- Farrell, H.E., N. Davis-Poynter, K. Bruce, C. Lawler, L. Dolken, M. Mach, and P.G. Stevenson. 2015. Lymph Node Macrophages Restrict Murine Cytomegalovirus Dissemination. *Journal of virology* 89:7147-7158.
- Feagan, B.G., P. Rutgeerts, B.E. Sands, S. Hanauer, J.F. Colombel, W.J. Sandborn, G. Van Assche, J. Axler, H.J. Kim, S. Danese, I. Fox, C. Milch, S. Sankoh, T. Wyant, J. Xu, and A. Parikh. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *The New England journal of medicine* 369:699-710.
- Flores-Langarica, A., J.L. Marshall, S. Bobat, E. Mohr, J. Hitchcock, E.A. Ross, R.E. Coughlan, M. Khan, N. Van Rooijen, I.R. Henderson, I.C. MacLennan, and A.F. Cunningham. 2011. T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *European journal of immunology* 41:2654-2665.
- Fonseca-Camarillo, G., and J.K. Yamamoto-Furusho. 2013. High gene expression of CXCL8 is associated with the presence of extraintestinal manifestations and long-term disease in patients with ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* 19:E22-23.
- Forbes, J.D., G. Van Domselaar, and C.N. Bernstein. 2016. Microbiome Survey of the Inflamed and Noninflamed Gut at Different Compartments Within the Gastrointestinal Tract of Inflammatory Bowel Disease Patients. *Inflammatory bowel diseases* 22:817-825.
- Fortin, G., M. Raymond, V.Q. Van, M. Rubio, P. Gautier, M. Sarfati, and D. Franchimont. 2009. A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRPalpha+CD103- dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 206:1995-2011.
- Foster, B., D.D. Metcalfe, and C. Prussin. 2003. Human dendritic cell 1 and dendritic cell 2 subsets express FcepsilonRI: correlation with serum IgE and allergic asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 112:1132-1138.
- Fournier, B.M., and C.A. Parkos. 2012. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 5:354-366.
- Franze, E., R. Caruso, C. Stolfi, M. Sarra, M.L. Cupi, F. Caprioli, I. Monteleone, F. Zorzi, D. De Nitto, A. Colantoni, L. Biancone, F. Pallone, and G. Monteleone. 2013. Lesional accumulation of CD163-expressing cells in the gut of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS one* 8:e69839.
- Frolkis, A.D., J. Dykeman, M.E. Negron, J. Debruyne, N. Jette, K.M. Fiest, T. Frolkis, H.W. Barkema, K.P. Rioux, R. Panaccione, S. Ghosh, S. Wiebe, and G.G. Kaplan. 2013. Risk of surgery for inflammatory bowel diseases has decreased over time: a systematic review and meta-analysis of population-based studies. *Gastroenterology* 145:996-1006.
- Fuchs, A., W. Vermi, J.S. Lee, S. Lonardi, S. Gilfillan, R.D. Newberry, M. Cella, and M. Colonna. 2013. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity* 38:769-781.
- Furusawa, Y., Y. Obata, S. Fukuda, T.A. Endo, G. Nakato, D. Takahashi, Y. Nakanishi, C. Uetake, K. Kato, T. Kato, M. Takahashi, N.N. Fukuda, S. Murakami, E. Miyauchi, S. Hino, K. Atarashi, S. Onawa, Y. Fujimura, T. Lockett, J.M. Clarke, D.L. Topping, M. Tomita, S. Hori, O. Ohara, T. Morita, H. Koseki, J. Kikuchi, K. Honda, K. Hase, and H. Ohno. 2013. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 504:446-450.

- Fuss, I.J., F. Heller, M. Boirivant, F. Leon, M. Yoshida, S. Fichtner-Feigl, Z. Yang, M. Exley, A. Kitani, R.S. Blumberg, P. Mannon, and W. Strober. 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *The Journal of clinical investigation* 113:1490-1497.
- Fuss, I.J., M. Neurath, M. Boirivant, J.S. Klein, C. de la Motte, S.A. Strong, C. Fiocchi, and W. Strober. 1996. 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157:1261-1270.
- Gagliani, N., M.C. Amezcua Vesely, A. Iseppon, L. Brockmann, H. Xu, N.W. Palm, M.R. de Zoete, P. Licona-Limon, R.S. Paiva, T. Ching, C. Weaver, X. Zi, X. Pan, R. Fan, L.X. Garmire, M.J. Cotton, Y. Drier, B. Bernstein, J. Geginat, B. Stockinger, E. Esplugues, S. Huber, and R.A. Flavell. 2015. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* 523:221-225.
- Garley, M., and E. Jablonska. 2018. Heterogeneity Among Neutrophils. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 66:21-30.
- Gasch, M., T. Goroll, M. Bauer, D. Hinz, N. Schutze, T. Polte, D. Kesper, J.C. Simon, J. Hackermuller, I. Lehmann, and G. Herberth. 2014. Generation of IL-8 and IL-9 producing CD4(+) T cells is affected by Th17 polarizing conditions and AHR ligands. *Mediators of inflammation* 2014:182549.
- Gathungu, G., M.O. Kim, J.P. Ferguson, Y. Sharma, W. Zhang, S.M. Ng, E. Bonkowski, K. Ning, L.A. Simms, A.R. Croft, J.M. Stempak, N. Walker, N. Huang, Y. Xiao, M.S. Silverberg, B. Trapnell, J.H. Cho, G.L. Radford-Smith, and L.A. Denson. 2013. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies: a marker of aggressive Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 19:1671-1680.
- Gaublomme, J.T., N. Yosef, Y. Lee, R.S. Gertner, L.V. Yang, C. Wu, P.P. Pandolfi, T. Mak, R. Satija, A.K. Shalek, V.K. Kuchroo, H. Park, and A. Regev. 2015. Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* 163:1400-1412.
- Gaujoux, R., E. Starosvetsky, N. Maimon, F. Vallania, H. Bar-Yoseph, S. Pressman, R. Weisshof, I. Goren, K. Rabinowitz, M. Waterman, H. Yanai, I. Dotan, E. Sabo, Y. Chowers, P. Khatri, and S.S. Shen-Orr. 2018. Cell-centred meta-analysis reveals baseline predictors of anti-TNFalpha non-response in biopsy and blood of patients with IBD. *Gut*
- Gelbmann, C.M., S. Mestermann, V. Gross, M. Kollinger, J. Scholmerich, and W. Falk. 1999. Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 45:210-217.
- Geremia, A., C.V. Arancibia-Carcamo, M.P. Fleming, N. Rust, B. Singh, N.J. Mortensen, S.P. Travis, and F. Powrie. 2011. IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. *The Journal of experimental medicine* 208:1127-1133.
- Gerlach, K., Y. Hwang, A. Nikolaev, R. Atreya, H. Dornhoff, S. Steiner, H.A. Lehr, S. Wirtz, M. Vieth, A. Waisman, F. Rosenbauer, A.N. McKenzie, B. Weigmann, and M.F. Neurath. 2014. TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nature immunology* 15:676-686.
- Gerlach, K., A.N. McKenzie, M.F. Neurath, and B. Weigmann. 2015. IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue barriers* 3:e983777.
- Gesser, B., B. Deleuran, M. Lund, C. Vestergard, N. Lohse, M. Deleuran, S.L. Jensen, S.S. Pedersen, K. Thestrup-Pedersen, and C.G. Larsen. 1995. Interleukin-8 induces its own production in CD4+ T lymphocytes: a process regulated by interleukin 10. *Biochemical and biophysical research communications* 210:660-669.
- Gevaert, P., L. Calus, T. Van Zele, K. Blomme, N. De Ruyck, W. Bauters, P. Hellings, G. Brusselle, D. De Bacquer, P. van Cauwenberge, and C. Bachert. 2013. Omalizumab is effective in allergic and nonallergic patients with nasal polyps and asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* 131:110-116 e111.
- Gevers, D., S. Kugathasan, L.A. Denson, Y. Vazquez-Baeza, W. Van Treuren, B. Ren, E. Schwager, D. Knights, S.J. Song, M. Yassour, X.C. Morgan, A.D. Kostic, C. Luo, A. Gonzalez, D. McDonald, Y. Haberman, T. Walters, S. Baker, J. Rosh, M. Stephens, M. Heyman, J. Markowitz, R. Baldassano, A. Griffiths, F. Sylvester, D. Mack, S. Kim, W. Crandall, J. Hyams, C. Huttenhower, R. Knight, and R.J. Xavier. 2014. The treatment-naive microbiome in new-onset Crohn's disease. *Cell host & microbe* 15:382-392.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X.P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid,

- D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467:967-971.
- Gibbons, D., P. Fleming, A. Virasami, M.L. Michel, N.J. Sebire, K. Costeloe, R. Carr, N. Klein, and A. Hayday. 2014. Interleukin-8 (CXCL8) production is a signatory T cell effector function of human newborn infants. *Nature medicine* 20:1206-1210.
- Ginhoux, F., and S. Jung. 2014. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature reviews. Immunology* 14:392-404.
- Globig, A.M., N. Hennecke, B. Martin, M. Seidl, G. Ruf, P. Hasselblatt, R. Thimme, and B. Bengsch. 2014. Comprehensive intestinal T helper cell profiling reveals specific accumulation of IFN-gamma+IL-17+coproducing CD4+ T cells in active inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 20:2321-2329.
- Gonzalez-Dominguez, E., R. Samaniego, J.L. Flores-Sevilla, S.F. Campos-Campos, G. Gomez-Campos, A. Salas, V. Campos-Pena, A.L. Corbi, P. Sanchez-Mateos, and C. Sanchez-Torres. 2015. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *Journal of leukocyte biology* 98:453-466.
- Goodrich, J.K., J.L. Waters, A.C. Poole, J.L. Sutter, O. Koren, R. Blehman, M. Beaumont, W. Van Treuren, R. Knight, J.T. Bell, T.D. Spector, A.G. Clark, and R.E. Ley. 2014. Human genetics shape the gut microbiome. *Cell* 159:789-799.
- Goudot, C., A. Coillard, A.C. Villani, P. Gueguen, A. Cros, S. Sarkizova, T.L. Tang-Huau, M. Bohec, S. Baulande, N. Hacohen, S. Amigorena, and E. Segura. 2017. Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47:582-596.e586.
- Grainger, J.R., and J.E. Konkel. 2017. Macrophages in gastrointestinal homeostasis and inflammation. 469:527-539.
- Grainger, J.R., E.A. Wohlfert, I.J. Fuss, N. Bouladoux, M.H. Askenase, F. Legrand, L.Y. Koo, J.M. Brenchley, I.D. Fraser, and Y. Belkaid. 2013. Inflammatory monocytes regulate pathologic responses to commensals during acute gastrointestinal infection. *Nature medicine* 19:713-721.
- Granlund, A., A. Flatberg, A.E. Ostvik, I. Drozdov, B.I. Gustafsson, M. Kidd, V. Beisvag, S.H. Torp, H.L. Waldum, T.C. Martinsen, J.K. Damas, T. Espevik, and A.K. Sandvik. 2013. Whole genome gene expression meta-analysis of inflammatory bowel disease colon mucosa demonstrates lack of major differences between Crohn's disease and ulcerative colitis. *PLoS one* 8:e56818.
- Granot, T., T. Senda, D.J. Carpenter, N. Matsuoka, J. Weiner, C.L. Gordon, M. Miron, B.V. Kumar, A. Griesemer, S.H. Ho, H. Lerner, J.J. Thome, T. Connors, B. Reizis, and D.L. Farber. 2017. Dendritic Cells Display Subset and Tissue-Specific Maturation Dynamics over Human Life. *Immunity* 46:504-515.
- Gray, E.E., and J.G. Cyster. 2012. Lymph node macrophages. *Journal of innate immunity* 4:424-436.
- Grimm, M.C., W.E. Pullman, G.M. Bennett, P.J. Sullivan, P. Pavli, and W.F. Doe. 1995. Direct evidence of monocyte recruitment to inflammatory bowel disease mucosa. *Journal of gastroenterology and hepatology* 10:387-395.
- Griseri, T., B.S. McKenzie, C. Schiering, and F. Powrie. 2012. Dysregulated hematopoietic stem and progenitor cell activity promotes interleukin-23-driven chronic intestinal inflammation. *Immunity* 37:1116-1129.
- Guilliams, M., C.A. Dutertre, C.L. Scott, N. McGovern, D. Sichien, S. Chakarov, S. Van Gassen, J. Chen, M. Poidinger, S. De Prijck, S.J. Tavernier, I. Low, S.E. Irac, C.N. Mattar, H.R. Sumatoh, G.H. Low, T.J. Chung, D.K. Chan, K.K. Tan, T.L. Hon, E. Fossum, B. Bogen, M. Choolani, J.K. Chan, A. Larbi, H. Luche, S. Henri, Y. Saeys, E.W. Newell, B.N. Lambrecht, B. Malissen, and F. Ginhoux. 2016. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* 45:669-684.
- Guilliams, M., F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, and S. Yona. 2014. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature reviews. Immunology* 14:571-578.
- Guilliams, M., and C.L. Scott. 2017. Does niche competition determine the origin of tissue-resident macrophages? *Nature reviews. Immunology* 17:451-460.
- Guilliams, M., and L. van de Laar. 2015. A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System. *Frontiers in immunology* 6:406.
- Gunther, C., J. Starke, N. Zimmermann, and K. Schakel. 2012. Human 6-sulfo LacNAc (sIa) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clinical and experimental dermatology* 37:169-176.

- Haberman, Y., T.L. Tickle, P.J. Dexheimer, M.O. Kim, D. Tang, R. Karns, R.N. Baldassano, J.D. Noe, J. Rosh, J. Markowitz, M.B. Heyman, A.M. Griffiths, W.V. Crandall, D.R. Mack, S.S. Baker, C. Huttenhower, D.J. Keljo, J.S. Hyams, S. Kugathasan, T.D. Walters, B. Aronow, R.J. Xavier, D. Gevers, and L.A. Denson. 2014. Pediatric Crohn disease patients exhibit specific ileal transcriptome and microbiome signature. *The Journal of clinical investigation* 124:3617-3633.
- Hand, T.W., L.M. Dos Santos, N. Bouladoux, M.J. Molloy, A.J. Pagan, M. Pepper, C.L. Maynard, C.O. Elson, 3rd, and Y. Belkaid. 2012. Acute gastrointestinal infection induces long-lived microbiota-specific T cell responses. *Science (New York, N.Y.)* 337:1553-1556.
- Haniffa, M., A. Shin, V. Bigley, N. McGovern, P. Teo, P. See, P.S. Wasan, X.N. Wang, F. Malinarich, B. Malleret, A. Larbi, P. Tan, H. Zhao, M. Poidinger, S. Pagan, S. Cookson, R. Dickinson, I. Dimmick, R.F. Jarrett, L. Renia, J. Tam, C. Song, J. Connolly, J.K. Chan, A. Gehring, A. Bertoletti, M. Collin, and F. Ginhoux. 2012. Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells. *Immunity* 37:60-73.
- Hansel, A., C. Gunther, W. Baran, M. Bidier, H.M. Lorenz, M. Schmitz, M. Bachmann, T. Dobel, A.H. Enk, and K. Schakel. 2013. Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity* 40:1-8.
- Hansel, A., C. Gunther, J. Ingwersen, J. Starke, M. Schmitz, M. Bachmann, M. Meurer, E.P. Rieber, and K. Schakel. 2011. Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *The Journal of allergy and clinical immunology* 127:787-794.e781-789.
- Harada, K., A. Toyonaga, K. Mitsuyama, E. Sasaki, and K. Tanikawa. 1994. Role of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in rat experimental colitis. *Digestion* 55:179-184.
- Harbour, S.N., C.L. Maynard, C.L. Zindl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver. 2015. Th17 cells give rise to Th1 cells that are required for the pathogenesis of colitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:7061-7066.
- Heidkamp, G.F., J. Sander, C.H.K. Lehmann, L. Heger, N. Eissing, A. Baranska, J.J. Luhr, A. Hoffmann, K.C. Reimer, A. Lux, S. Soder, A. Hartmann, J. Zenk, T. Ulas, N. McGovern, C. Alexiou, B. Spriewald, A. Mackensen, G. Schuler, B. Schauf, A. Forster, R. Repp, P.A. Fasching, A. Purbojo, R. Cesnjevar, E. Ullrich, F. Ginhoux, A. Schlitzer, F. Nimmerjahn, J.L. Schultze, and D. Dudziak. 2016. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Science immunology* 1:
- Heller, F., P. Florian, C. Bojarski, J. Richter, M. Christ, B. Hillenbrand, J. Mankertz, A.H. Gitter, N. Burgel, M. Fromm, M. Zeitz, I. Fuss, W. Strober, and J.D. Schulzke. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 129:550-564.
- Hepworth, M.R., L.A. Monticelli, T.C. Fung, C.G. Ziegler, S. Grunberg, R. Sinha, A.R. Mantegazza, H.L. Ma, A. Crawford, J.M. Angelosanto, E.J. Wherry, P.A. Koni, F.D. Bushman, C.O. Elson, G. Eberl, D. Artis, and G.F. Sonnenberg. 2013. Innate lymphoid cells regulate CD4 T-cell responses to intestinal commensal bacteria. *Nature*
- Hetzenecker, A.M., M.C. Seidl, K. Kosovac, H. Herfarth, S. Kellermeier, F. Obermeier, W. Falk, J. Schoelmerich, M. Hausmann, and G. Rogler. 2012. Downregulation of the ubiquitin-proteasome system in normal colonic macrophages and reinduction in inflammatory bowel disease. *Digestion* 86:34-47.
- Hill, D.A., M.C. Siracusa, M.C. Abt, B.S. Kim, D. Kobuley, M. Kubo, T. Kambayashi, D.F. Larosa, E.D. Renner, J.S. Orange, F.D. Bushman, and D. Artis. 2012. Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation. *Nature medicine* 18:538-546.
- Hirota, K., J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D.J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A.J. Potocnik, and B. Stockinger. 2011. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nature immunology* 12:255-263.
- Hirota, K., J.E. Turner, M. Villa, J.H. Duarte, J. Demengeot, O.M. Steinmetz, and B. Stockinger. 2013. Plasticity of Th17 cells in Peyer's patches is responsible for the induction of T cell-dependent IgA responses. *Nature immunology* 14:372-379.
- Hoeffel, G., and F. Ginhoux. 2015. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Frontiers in immunology* 6:486.
- Honda, K., and D.R. Littman. 2016. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 535:75-84.

- Hostmann, A., K. Kapp, M. Beutner, J.P. Ritz, C. Loddenkemper, R. Ignatius, R. Duchmann, S. Daum, J. Grone, H. Hotz, H.J. Buhr, M. Zeitz, and R. Ullrich. 2013. Dendritic cells from human mesenteric lymph nodes in inflammatory and non-inflammatory bowel diseases: subsets and function of plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 139:100-108.
- Houston, S.A., V. Cerovic, C. Thomson, J. Brewer, A.M. Mowat, and S. Milling. 2016. The lymph nodes draining the small intestine and colon are anatomically separate and immunologically distinct. *Mucosal immunology* 9:468-478.
- Hovhannisyan, Z., J. Treatman, D.R. Littman, and L. Mayer. 2011. Characterization of interleukin-17-producing regulatory T cells in inflamed intestinal mucosa from patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 140:957-965.
- Hoving, J.C., F. Kirstein, N.E. Nieuwenhuizen, L.C. Fick, E. Hobeika, M. Reth, and F. Brombacher. 2012. B cells that produce immunoglobulin E mediate colitis in BALB/c mice. *Gastroenterology* 142:96-108.
- Hu, D., and S. Notarbartolo. 2017. Transcriptional signature of human pro-inflammatory TH17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis. 8:1600.
- Huang, W., B. Thomas, R.A. Flynn, S.J. Gavzy, L. Wu, S.V. Kim, J.A. Hall, E.R. Miraldi, C.P. Ng, F. Rigo, S. Meadows, N.R. Montoya, N.G. Herrera, A.I. Domingos, F. Rastinejad, R.M. Myers, F.V. Fuller-Pace, R. Bonneau, H.Y. Chang, O. Acuto, and D.R. Littman. 2015a. DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions. *Nature* 528:517-522.
- Huang, Y.H., Y.F. Cao, Z.Y. Jiang, S. Zhang, and F. Gao. 2015b. Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development. *World journal of gastroenterology* 21:4216-4224.
- Hueber, W., B.E. Sands, S. Lewitzky, M. Vandemeulebroecke, W. Reinisch, P.D. Higgins, J. Wehkamp, B.G. Feagan, M.D. Yao, M. Karczewski, J. Karczewski, N. Pezous, S. Bek, G. Bruin, B. Mellgard, C. Berger, M. Londei, A.P. Bertolino, G. Tougas, and S.P. Travis. 2012. Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* 61:1693-1700.
- Hugle, B., F. Speth, and J.P. Haas. 2017. Inflammatory bowel disease following anti-interleukin-1-treatment in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Pediatric rheumatology online journal* 15:16.
- Hyams, J.S., S. Davis Thomas, N. Gotman, Y. Haberman, R. Karns, M. Schirmer, A. Mo, D.R. Mack, B. Boyle, A.M. Griffiths, N.S. LeLeiko, C.G. Sauer, D.J. Keljo, J. Markowitz, S.S. Baker, J. Rosh, R.N. Baldassano, A. Patel, M. Pfefferkorn, A. Otley, M. Heyman, J. Noe, M. Oliva-Hemker, P.A. Rufo, J. Strople, D. Ziring, S.L. Guthery, B. Sudel, K. Benkov, P. Wali, D. Moulton, J. Evans, M.D. Kappelman, M.A. Marquis, F.A. Sylvester, M.H. Collins, S. Venkateswaran, M. Dubinsky, V. Tangpricha, K.L. Spada, B. Saul, J. Wang, J. Serrano, K. Hommel, U.M. Marigorta, G. Gibson, R.J. Xavier, S. Kugathasan, T. Walters, and L.A. Denson. 2019. Clinical and biological predictors of response to standardised paediatric colitis therapy (PROTECT): a multicentre inception cohort study. *Lancet*
- Iboshi, Y., K. Nakamura, E. Ihara, T. Iwasa, H. Akiho, N. Harada, M. Nakamuta, and R. Takayanagi. 2014. Multigene analysis unveils distinctive expression profiles of helper T-cell-related genes in the intestinal mucosa that discriminate between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 20:967-977.
- Ichiyama, K., A. Gonzalez-Martin, B.S. Kim, H.Y. Jin, W. Jin, W. Xu, M. Sabouri-Ghomi, S. Xu, P. Zheng, C. Xiao, and C. Dong. 2016. The MicroRNA-183-96-182 Cluster Promotes T Helper 17 Cell Pathogenicity by Negatively Regulating Transcription Factor Foxo1 Expression. *Immunity* 44:1284-1298.
- Iliev, I.D., V.A. Funari, K.D. Taylor, Q. Nguyen, C.N. Reyes, S.P. Strom, J. Brown, C.A. Becker, P.R. Fleshner, M. Dubinsky, J.I. Rotter, H.L. Wang, D.P. McGovern, G.D. Brown, and D.M. Underhill. 2012. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. *Science (New York, N.Y.)* 336:1314-1317.
- Imhann, F., K.J. Van der Velde, R. Barbieri, R. Alberts, M.D. Voskuil, A. Vich Vila, V. Collij, L.M. Spekhorst, K.W.J. Van der Sloot, V. Peters, H.M. Van Dullemen, M.C. Visschedijk, E.A.M. Festen, M.A. Swertz, G. Dijkstra, and R.K. Weersma. 2019. The 1000IBD project: multi-omics data of 1000 inflammatory bowel disease patients; data release 1. *BMC gastroenterology* 19:5.
- Jaensson, E., H. Uronen-Hansson, O. Pabst, B. Eksteen, J. Tian, J.L. Coombes, P.L. Berg, T. Davidsson, F. Powrie, B. Johansson-Lindbom, and W.W. Agace. 2008. Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine* 205:2139-2149.

- Jakubzick, C., E.L. Gautier, S.L. Gibbins, D.K. Sojka, A. Schlitzer, T.E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J.R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D.W. Riches, W.M. Yokoyama, F. Ginhoux, P.M. Henson, and G.J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39:599-610.
- Jakubzick, C.V., G.J. Randolph, and P.M. Henson. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature reviews. Immunology* 17:349-362.
- Jantchou, P., S. Morois, F. Clavel-Chapelon, M.C. Boutron-Ruault, and F. Carbonnel. 2010. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *The American journal of gastroenterology* 105:2195-2201.
- Joeris, T., K. Muller-Luda, W.W. Agace, and A.M. Mowat. 2017. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal immunology* 10:845-864.
- Jostins, L., S. Ripke, R.K. Weersma, R.H. Duerr, D.P. McGovern, K.Y. Hui, J.C. Lee, L.P. Schumm, Y. Sharma, C.A. Anderson, J. Essers, M. Mitrovic, K. Ning, I. Cleynen, E. Theatre, S.L. Spain, S. Raychaudhuri, P. Goyette, Z. Wei, C. Abraham, J.P. Achkar, T. Ahmad, L. Amininejad, A.N. Ananthakrishnan, V. Andersen, J.M. Andrews, L. Baidoo, T. Balschun, P.A. Bampton, A. Bitton, G. Boucher, S. Brand, C. Buning, A. Cohain, S. Cichon, M. D'Amato, D. De Jong, K.L. Devaney, M. Dubinsky, C. Edwards, D. Ellinghaus, L.R. Ferguson, D. Franchimont, K. Fransen, R. Gearty, M. Georges, C. Gieger, J. Glas, T. Haritunians, A. Hart, C. Hawkey, M. Hedl, X. Hu, T.H. Karlsen, L. Kupcinkas, S. Kugathasan, A. Latiano, D. Laukens, I.C. Lawrance, C.W. Lees, E. Louis, G. Mahy, J. Mansfield, A.R. Morgan, C. Mowat, W. Newman, O. Palmieri, C.Y. Ponsioen, U. Potocnik, N.J. Prescott, M. Regueiro, J.I. Rotter, R.K. Russell, J.D. Sanderson, M. Sans, J. Satsangi, S. Schreiber, L.A. Simms, J. Sventoraityte, S.R. Targan, K.D. Taylor, M. Tremelling, H.W. Verspaget, M. De Vos, C. Wijmenga, D.C. Wilson, J. Winkelmann, R.J. Xavier, S. Zeissig, B. Zhang, C.K. Zhang, H. Zhao, M.S. Silverberg, V. Annese, H. Hakonarson, S.R. Brant, G. Radford-Smith, C.G. Mathew, J.D. Rioux, E.E. Schadt, M.J. Daly, A. Franke, M. Parkes, S. Vermeire, J.C. Barrett, and J.H. Cho. 2012. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 491:119-124.
- Kamada, N., T. Hisamatsu, H. Honda, T. Kobayashi, H. Chinen, M.T. Kitazume, T. Takayama, S. Okamoto, K. Koganei, A. Sugita, T. Kanai, and T. Hibi. 2009. Human CD14+ macrophages in intestinal lamina propria exhibit potent antigen-presenting ability. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183:1724-1731.
- Kamada, N., T. Hisamatsu, S. Okamoto, H. Chinen, T. Kobayashi, T. Sato, A. Sakuraba, M.T. Kitazume, A. Sugita, K. Koganei, K.S. Akagawa, and T. Hibi. 2008. Unique CD14 intestinal macrophages contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis. *The Journal of clinical investigation* 118:2269-2280.
- Kamada, N., S.U. Seo, G.Y. Chen, and G. Nunez. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology* 13:321-335.
- Kamanaka, M., S. Huber, L.A. Zenewicz, N. Gagliani, C. Rathinam, W. O'Connor, Jr., Y.Y. Wan, S. Nakae, Y. Iwakura, L. Hao, and R.A. Flavell. 2011. Memory/effector (CD45RB(lo)) CD4 T cells are controlled directly by IL-10 and cause IL-22-dependent intestinal pathology. *The Journal of experimental medicine* 208:1027-1040.
- Kang, O.H., D.K. Kim, Y.A. Choi, H.J. Park, J. Tae, C.S. Kang, S.C. Choi, Y.H. Nah, H.K. Lee, and Y.M. Lee. 2006. Suppressive effect of non-anaphylactogenic anti-IgE antibody on the development of dextran sulfate sodium-induced colitis. *International journal of molecular medicine* 18:893-899.
- Kaplan, G.G., J. Hubbard, J. Korzenik, B.E. Sands, R. Panaccione, S. Ghosh, A.J. Wheeler, and P.J. Villeneuve. 2010. The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *The American journal of gastroenterology* 105:2412-2419.
- Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annual review of immunology* 28:573-621.
- Kawabe, T., N. Suzuki, S. Yamaki, S.L. Sun, A. Asao, Y. Okuyama, T. So, Y. Iwakura, and N. Ishii. 2016. Mesenteric lymph nodes contribute to proinflammatory Th17-cell generation during inflammation of the small intestine in mice. *European journal of immunology* 46:1119-1131.
- Keller, M., Z. Spanou, P. Schaerli, M. Britschgi, N. Yawalkar, M. Seitz, P.M. Villiger, and W.J. Pichler. 2005. T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175:7678-7686.

- Kelsen, J.R., R.N. Baldassano, D. Artis, and G.F. Sonnenberg. 2015. Maintaining intestinal health: the genetics and immunology of very early onset inflammatory bowel disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology* 1:462-476.
- Kiernan, M.G., J.C. Coffey, K. McDermott, P.D. Cotter, R. Cabrera-Rubio, P.A. Kiely, and C.P. Dunne. 2019. The Human Mesenteric Lymph Node Microbiome Differentiates Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's & colitis* 13:58-66.
- Kim, B.S., K. Wang, M.C. Siracusa, S.A. Saenz, J.R. Brestoff, L.A. Monticelli, M. Noti, E.D. Tait Wojno, T.C. Fung, M. Kubo, and D. Artis. 2014. Basophils promote innate lymphoid cell responses in inflamed skin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 193:3717-3725.
- Kim, K.S., S.W. Hong, D. Han, J. Yi, J. Jung, B.G. Yang, J.Y. Lee, M. Lee, and C.D. Surh. 2016. Dietary antigens limit mucosal immunity by inducing regulatory T cells in the small intestine. *Science (New York, N.Y.)* 351:858-863.
- Kim, T.S., and T.J. Braciale. 2009. Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8+ T cell responses. *PLoS one* 4:e4204.
- Kishi, Y., T. Kondo, and S. Xiao. 2016. Protein C receptor (PROCR) is a negative regulator of Th17 pathogenicity. *PLoS one* 11:e0152501.
- Kleinewietfeld, M., A. Manzel, J. Titze, H. Kvakan, N. Yosef, R.A. Linker, D.N. Muller, and D.A. Hafler. 2013. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic T17 cells. *Nature* 501:232-236.
- Kleinschek, M.A., K. Boniface, S. Sadekova, J. Grein, E.E. Murphy, S.P. Turner, L. Raskin, B. Desai, W.A. Faubion, R. de Waal Malefyt, R.H. Pierce, T. McClanahan, and R.A. Kastelein. 2009. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine* 206:525-534.
- Klement, E., R.V. Cohen, J. Boxman, A. Joseph, and S. Reif. 2004. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition* 80:1342-1352.
- Ko, H.J., J.L. Brady, V. Ryg-Cornejo, D.S. Hansen, D. Vremec, K. Shortman, Y. Zhan, and A.M. Lew. 2014. GM-CSF-responsive monocyte-derived dendritic cells are pivotal in Th17 pathogenesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 192:2202-2209.
- Kobayashi, K.S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O. Henegariu, N. Inohara, G. Nunez, and R.A. Flavell. 2005. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science (New York, N.Y.)* 307:731-734.
- Kobayashi, T., S. Okamoto, T. Hisamatsu, N. Kamada, H. Chinen, R. Saito, M.T. Kitazume, A. Nakazawa, A. Sugita, K. Koganei, K. Isobe, and T. Hibi. 2008. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 57:1682-1689.
- Kokten, T., S. Gibot, P. Lepage, S. D'Alessio, J. Hablot, N.C. Ndiaye, H. Busby-Venner, C. Monot, B. Garnier, D. Moulin, J.Y. Jouzeau, F. Hansmannel, S. Danese, J.L. Gueant, S. Muller, and L. Peyrin-Biroulet. 2017. TREM-1 inhibition restores impaired autophagy activity and reduces colitis in mice. *J Crohns Colitis* 11:1230-1239.
- Kokten, T., S. Gibot, P. Lepage, S. D'Alessio, J. Hablot, N.C. Ndiaye, H. Busby-Venner, C. Monot, B. Garnier, D. Moulin, J.Y. Jouzeau, F. Hansmannel, S. Danese, J.L. Gueant, S. Muller, and L. Peyrin-Biroulet. 2018. TREM-1 Inhibition Restores Impaired Autophagy Activity and Reduces Colitis in Mice. *Journal of Crohn's & colitis* 12:230-244.
- Komohara, Y., K. Ohnishi, and M. Takeya. 2017. Possible functions of CD169-positive sinus macrophages in lymph nodes in anti-tumor immune responses. *Cancer science* 108:290-295.
- Kontoyiannis, D., M. Pasparakis, T.T. Pizarro, F. Cominelli, and G. Kollias. 1999. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 10:387-398.
- Krausgruber, T., C. Schiering, K. Adelman, O.J. Harrison, A. Chomka, C. Pearson, P.P. Ahern, M. Shale, M. Oukka, and F. Powrie. 2016. T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4(+) T cell responses in the intestine. *Nature communications* 7:11627.
- Kryczek, I., L. Wang, K. Wu, W. Li, E. Zhao, T. Cui, S. Wei, Y. Liu, Y. Wang, L. Vatan, W. Szeliga, J.K. Greenson, J. Rolinski, W. Zgodzinski, E. Huang, K. Tao, G. Wang, and W. Zou. 2016. Inflammatory regulatory T cells in the microenvironments of ulcerative colitis and colon carcinoma. *Oncoimmunology* 5:e1105430.

- Kryczek, I., K. Wu, E. Zhao, S. Wei, L. Vatan, W. Szeliga, E. Huang, J. Greenson, A. Chang, J. Rolinski, P. Radwan, J. Fang, G. Wang, and W. Zou. 2011a. IL-17+ regulatory T cells in the microenvironments of chronic inflammation and cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 186:4388-4395.
- Kryczek, I., E. Zhao, Y. Liu, Y. Wang, L. Vatan, W. Szeliga, J. Moyer, A. Klimczak, A. Lange, and W. Zou. 2011b. Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Science translational medicine* 3:104ra100.
- Kuhl, A.A., U. Erben, L.I. Kredel, and B. Siegmund. 2015. Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in immunology* 6:613.
- Kumar, B.V., T.J. Connors, and D.L. Farber. 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* 48:202-213.
- Kumar, B.V., W. Ma, M. Miron, T. Granot, R.S. Guyer, D.J. Carpenter, T. Senda, X. Sun, S.H. Ho, H. Lerner, A.L. Friedman, Y. Shen, and D.L. Farber. 2017. Human Tissue-Resident Memory T Cells Are Defined by Core Transcriptional and Functional Signatures in Lymphoid and Mucosal Sites. *Cell reports* 20:2921-2934.
- Kvedaraite, E., M. Lourda, M. Idestrom, P. Chen, S. Olsson-Akefeldt, M. Forkel, D. Gavhed, U. Lindfors, J. Mjosberg, J.I. Henter, and M. Svensson. 2015. Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut*
- Lamas, B., M.L. Richard, V. Leducq, and H.P. Pham. 2016. CARD9 impacts colitis by altering gut microbiota metabolism of tryptophan into aryl hydrocarbon receptor ligands. 22:598-605.
- Lampinen, M., M. Backman, O. Winqvist, F. Rorsman, A. Ronnblom, P. Sangfelt, and M. Carlson. 2008. Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *Journal of leukocyte biology* 84:1392-1399.
- Langlet, C., S. Tamoutounour, S. Henri, H. Luche, L. Ardouin, C. Gregoire, B. Malissen, and M. Guilliams. 2012. CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188:1751-1760.
- Langmead, B., and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods* 9:357-359.
- Langmead, B., C. Trapnell, M. Pop, and S.L. Salzberg. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* 10:R25.
- Lantz, C.S., J. Boesiger, C.H. Song, N. Mach, T. Kobayashi, R.C. Mulligan, Y. Nawa, G. Dranoff, and S.J. Galli. 1998. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392:90-93.
- Leal, R.F., N. Planell, R. Kajekar, J.J. Lozano, I. Ordas, I. Dotti, M. Esteller, M.C. Masamunt, H. Parmar, E. Ricart, J. Panes, and A. Salas. 2015. Identification of inflammatory mediators in patients with Crohn's disease unresponsive to anti-TNFalpha therapy. *Gut* 64:233-242.
- Lee, J.C., D. Biasci, R. Roberts, R.B. Gearry, J.C. Mansfield, T. Ahmad, and N.J. Prescott. 2017. Genome-wide association study identifies distinct genetic contributions to prognosis and susceptibility in Crohn's disease. 49:262-268.
- Lee, J.S., and D.J. Cua. 2015. IL-26 AMPs up the T(H)17 arsenal. *Nature immunology* 16:897-898.
- Lee, J.S., C.M. Tato, B. Joyce-Shaikh, F. Gulan, C. Cayatte, Y. Chen, W.M. Blumenschein, M. Judo, G. Ayanoglu, T.K. McClanahan, X. Li, and D.J. Cua. 2015. Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability. *Immunity* 43:727-738.
- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F.J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D.A. Hafler, R.A. Sobel, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 13:991-999.
- Lemmens, B., I. Arijis, G. Van Assche, X. Sagaert, K. Geboes, M. Ferrante, P. Rutgeerts, S. Vermeire, and G. De Hertogh. 2013. Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflammatory bowel diseases* 19:1194-1201.
- Leung, J.M., M. Davenport, M.J. Wolff, K.E. Wiens, W.M. Abidi, M.A. Poles, I. Cho, T. Ullman, L. Mayer, and P. Loke. 2014. IL-22-producing CD4+ cells are depleted in actively inflamed colitis tissue. *Mucosal immunology* 7:124-133.
- Levine, J.H., E.F. Simonds, S.C. Bendall, K.L. Davis, A.D. Amir el, M.D. Tadmor, O. Litvin, H.G. Fienberg, A. Jager, E.R. Zunder, R. Finck, A.L. Gedman, I. Radtke, J.R. Downing, D. Pe'er, and G.P. Nolan. 2015. Data-Driven Phenotypic Dissection of AML Reveals Progenitor-like Cells that Correlate with Prognosis. *Cell* 162:184-197.

- Li, B., and C.N. Dewey. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12:323.
- Li, J., and A. Ueno. 2017. Crossover Subsets of CD4(+) T Lymphocytes in the Intestinal Lamina Propria of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. 62:2357-2368.
- Li, J., A. Ueno, M. Fort Gasia, J. Luidier, T. Wang, C. Hirota, H.B. Jijon, M. Deane, M. Tom, R. Chan, H.W. Barkema, P.L. Beck, G.G. Kaplan, R. Panaccione, J. Qian, M. Iacucci, X. Gui, and S. Ghosh. 2016. Profiles of Lamina Propria T Helper Cell Subsets Discriminate Between Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Inflammatory bowel diseases* 22:1779-1792.
- Li, Q., D. Wang, S. Hao, X. Han, Y. Xia, X. Li, Y. Chen, M. Tanaka, and C.H. Qiu. 2017a. CD169 Expressing Macrophage, a Key Subset in Mesenteric Lymph Nodes Promotes Mucosal Inflammation in Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Frontiers in immunology* 8:669.
- Li, S.Q., N. Su, P. Gong, H.B. Zhang, J. Liu, D. Wang, Y.P. Sun, Y. Zhang, F. Qian, B. Zhao, Y. Yu, and R.D. Ye. 2017b. The Expression of Formyl Peptide Receptor 1 is Correlated with Tumor Invasion of Human Colorectal Cancer. *Scientific reports* 7:5918.
- Lim, L.H., M.M. Burdick, S.A. Hudson, F.B. Mustafa, K. Konstantopoulos, and B.S. Bochner. 2006. Stimulation of human endothelium with IL-3 induces selective basophil accumulation in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176:5346-5353.
- Lira, S.A. 2005. A passport into the lymph node. *Nature immunology* 6:866-868.
- Lissner, D., M. Schumann, A. Batra, L.I. Kredel, A.A. Kuhl, U. Erben, C. May, J.D. Schulzke, and B. Siegmund. 2015. Monocyte and M1 Macrophage-induced Barrier Defect Contributes to Chronic Intestinal Inflammation in IBD. *Inflammatory bowel diseases* 21:1297-1305.
- Liu, J.Z., S. van Sommeren, H. Huang, S.C. Ng, R. Alberts, A. Takahashi, S. Ripke, J.C. Lee, L. Jostins, T. Shah, S. Abedian, J.H. Cheon, J. Cho, N.E. Dayani, L. Franke, Y. Fuyuno, A. Hart, R.C. Juyal, G. Juyal, W.H. Kim, A.P. Morris, H. Poustchi, W.G. Newman, V. Midha, T.R. Orchard, H. Vahedi, A. Sood, J.Y. Sung, R. Malekzadeh, H.J. Westra, K. Yamazaki, S.K. Yang, J.C. Barrett, B.Z. Alizadeh, M. Parkes, T. Bk, M.J. Daly, M. Kubo, C.A. Anderson, and R.K. Weersma. 2015. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nature genetics* 47:979-986.
- Loddo, I., and C. Romano. 2015. Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis. *Frontiers in immunology* 6:551.
- Longman, R.S., G.E. Diehl, D.A. Victorio, J.R. Huh, C. Galan, E.R. Miraldi, A. Swaminath, R. Bonneau, E.J. Scherl, and D.R. Littman. 2014. CX(3)CR1(+) mononuclear phagocytes support colitis-associated innate lymphoid cell production of IL-22. *The Journal of experimental medicine* 211:1571-1583.
- Loschko, J., H.A. Schreiber, G.J. Rieke, D. Esterhazy, M.M. Meredith, V.A. Pedicord, K.H. Yao, S. Caballero, E.G. Pamer, D. Mucida, and M.C. Nussenzweig. 2016. Absence of MHC class II on cDCs results in microbial-dependent intestinal inflammation. *The Journal of experimental medicine*
- Luck, W., M. Becker, B. Niggemann, and U. Wahn. 1997. In vitro release of eosinophil cationic protein from peripheral eosinophils reflects disease activity in childhood Crohn disease and ulcerative colitis. *European journal of pediatrics* 156:921-924.
- Luu, M., U. Steinhoff, and A. Visekruna. 2017. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. *Clinical & translational immunology* 6:e156.
- Maggi, L., R. Cimaz, M. Capone, V. Santarlasci, V. Querci, G. Simonini, F. Nencini, F. Liotta, S. Romagnani, E. Maggi, F. Annunziato, and L. Cosmi. 2014. Brief report: etanercept inhibits the tumor necrosis factor alpha-driven shift of Th17 lymphocytes toward a nonclassic Th1 phenotype in juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 66:1372-1377.
- Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, M.C. Rossi, V. Querci, A. Mazzoni, R. Cimaz, R. De Palma, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, L. Cosmi, and F. Annunziato. 2012. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. *European journal of immunology* 42:3180-3188.
- Magnusson, M.K., S.F. Brynjolfsson, A. Dige, H. Uronen-Hansson, L.G. Borjesson, J.L. Bengtsson, S. Gudjonsson, L. Ohman, J. Agnholt, H. Sjoval, W.W. Agace, and M.J. Wick. 2016. Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH(+) cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation. *Mucosal immunology* 9:171-182.
- Magro, F. 2013. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 7:827-851.

- Magro, F., C. Langner, A. Driessen, A. Ensari, K. Geboes, G.J. Mantzaris, V. Villanacci, G. Becheanu, P. Borralho Nunes, G. Cathomas, W. Fries, A. Jouret-Mourin, C. Mescoli, G. de Petris, C.A. Rubio, N.A. Shepherd, M. Vieth, and R. Eliakim. 2013. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's & colitis* 7:827-851.
- Maloy, K.J., and F. Powrie. 2011. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* 474:298-306.
- Mann, E.R., D. Bernardo, N.R. English, J. Landy, H.O. Al-Hassi, S.T. Peake, R. Man, T.R. Elliott, H. Spranger, G.H. Lee, A. Parian, S.R. Brant, M. Lazarev, A.L. Hart, X. Li, and S.C. Knight. 2016. Compartment-specific immunity in the human gut: properties and functions of dendritic cells in the colon versus the ileum. *Gut* 65:256-270.
- Mann, E.R., J.D. Landy, D. Bernardo, S.T. Peake, A.L. Hart, H.O. Al-Hassi, and S.C. Knight. 2013. Intestinal dendritic cells: Their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunology letters* 150:30-40.
- Mann, E.R., and X. Li. 2014. Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World journal of gastroenterology* 20:9653-9664.
- Masopust, D., and J.M. Schenkel. 2013. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nature reviews. Immunology* 13:309-320.
- Masterson, J.C., K.E. Capocelli, L. Hosford, K. Biette, E.N. McNamee, E.F. de Zoeten, R. Harris, S.D. Fernando, P. Jedlicka, C. Protheroe, J.J. Lee, and G.T. Furuta. 2015a. Eosinophils and IL-33 Perpetuate Chronic Inflammation and Fibrosis in a Pediatric Population with Stricture Crohn's Ileitis. *Inflammatory bowel diseases* 21:2429-2440.
- Masterson, J.C., E.N. McNamee, S.A. Fillon, L. Hosford, R. Harris, S.D. Fernando, P. Jedlicka, R. Iwamoto, E. Jacobsen, C. Protheroe, H.K. Eltzschig, S.P. Colgan, M. Arita, J.J. Lee, and G.T. Furuta. 2015b. Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut* 64:1236-1247.
- Matsuzaki, K., R. Hokari, S. Kato, Y. Tsuzuki, H. Tanaka, C. Kurihara, A. Iwai, A. Kawaguchi, S. Nagao, K. Itoh, K. Nagata, and S. Miura. 2003. Differential expression of CCR5 and CCR2 on infiltrated cells in colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology* 18:1081-1088.
- Maurer, M., K. Rosen, H.J. Hsieh, S. Saini, C. Grattan, A. Gimenez-Arnau, S. Agarwal, R. Doyle, J. Canvin, A. Kaplan, and T. Casale. 2013. Omalizumab for the treatment of chronic idiopathic or spontaneous urticaria. *The New England journal of medicine* 368:924-935.
- Maxwell, J.R., Y. Zhang, W.A. Brown, C.L. Smith, F.R. Byrne, M. Fiorino, E. Stevens, J. Bigler, J.A. Davis, J.B. Rottman, A.L. Budelsky, A. Symons, and J.E. Towne. 2015. Differential Roles for Interleukin-23 and Interleukin-17 in Intestinal Immunoregulation. *Immunity* 43:739-750.
- Mazzoni, A., V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, M.C. Rossi, V. Querci, R. De Palma, H.D. Chang, A. Thiel, R. Cimaz, F. Liotta, L. Cosmi, E. Maggi, A. Radbruch, S. Romagnani, J. Dong, and F. Annunziato. 2015. Demethylation of the RORC2 and IL17A in Human CD4+ T Lymphocytes Defines Th17 Origin of Nonclassic Th1 Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194:3116-3126.
- McGovern, D.P., S. Kugathasan, and J.H. Cho. 2015. Genetics of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 149:1163-1176.e1162.
- Meyer Zu Horste, G., D. Przybylski, M.A. Schramm, C. Wang, A. Schnell, Y. Lee, R. Sobel, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2018. Fas Promotes T Helper 17 Cell Differentiation and Inhibits T Helper 1 Cell Development by Binding and Sequestering Transcription Factor STAT1. *Immunity* 48:556-569.e557.
- Meyer Zu Horste, G., C. Wu, C. Wang, L. Cong, M. Pawlak, Y. Lee, W. Elyaman, S. Xiao, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2016. RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell reports* 16:392-404.
- Middel, P., D. Raddatz, B. Gunawan, F. Haller, and H.J. Radzun. 2006. Increased number of mature dendritic cells in Crohn's disease: evidence for a chemokine mediated retention mechanism. *Gut* 55:220-227.
- Milling, S.W., C.D. Jenkins, U. Yrlid, V. Cerovic, H. Edmond, V. McDonald, M. Nassar, and G. Macpherson. 2009. Steady-state migrating intestinal dendritic cells induce potent inflammatory responses in naive CD4+ T cells. *Mucosal immunology* 2:156-165.
- Minar, P., Y. Haberman, I. Jurickova, T. Wen, M.E. Rothenberg, M.O. Kim, S.A. Saeed, R.N. Baldassano, M. Stephens, J. Markowitz, J. Rosh, W.V. Crandall, M.B. Heyman, D.R. Mack, A.M. Griffiths, S.S. Baker, J.S. Hyams, S. Kugathasan, and L.A. Denson. 2014. Utility of neutrophil Fcγ receptor I (CD64) index as a

- biomarker for mucosal inflammation in pediatric Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 20:1037-1048.
- Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, K. Watanabe, H. Tateishi, T. Nishiyama, T. Saiki, H. Ikeda, O. Tsuruta, and K. Tanikawa. 1994. IL-8 as an important chemoattractant for neutrophils in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical and experimental immunology* 96:432-436.
- Mittal, R., F.W. Woo, C.S. Castro, M.A. Cohen, J. Karanxha, J. Mittal, T. Chhibber, and V.M. Jhaveri. 2018. Organ-on-chip models: Implications in drug discovery and clinical applications. *Journal of cellular physiology*
- Mizoguchi, A., A. Yano, H. Himuro, Y. Ezaki, T. Sadanaga, and E. Mizoguchi. 2018. Clinical importance of IL-22 cascade in IBD. *Journal of gastroenterology* 53:465-474.
- Mowat, A.M., and W.W. Agace. 2014. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews. Immunology* 14:667-685.
- Mowat, A.M., C.L. Scott, and C.C. Bain. 2017. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nature medicine* 23:1258-1270.
- Mumolo, M.G., L. Bertani, L. Ceccarelli, G. Laino, G. Di Fluri, E. Albano, G. Tapete, and F. Costa. 2018. From bench to bedside: Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases clinical setting. *World journal of gastroenterology* 24:3681-3694.
- Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdts, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn. 2014. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41:14-20.
- N, A.G., J.A. Quintana, S. Garcia-Silva, M. Mazariegos, A. Gonzalez de la Aleja, J.A. Nicolas-Avila, W. Walter, J.M. Adrover, G. Crainiciuc, V.K. Kuchroo, C.V. Rothlin, H. Peinado, A. Castrillo, M. Ricote, and A. Hidalgo. 2017. Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages. *The Journal of experimental medicine* 214:1281-1296.
- Nakano, H., K.L. Lin, M. Yanagita, C. Charbonneau, D.N. Cook, T. Kakiuchi, and M.D. Gunn. 2009. Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature immunology* 10:394-402.
- Nalleweg, N., M.T. Chiriac, E. Podstawa, C. Lehmann, T.T. Rau, R. Atreya, E. Krauss, G. Hundorfean, S. Fichtner-Feigl, A. Hartmann, C. Becker, and J. Mudter. 2015. IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. *Gut* 64:743-755.
- Neurath, M.F., S. Finotto, and L.H. Glimcher. 2002a. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine* 8:567-573.
- Neurath, M.F., and S.P. Travis. 2012. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut* 61:1619-1635.
- Neurath, M.F., B. Weigmann, S. Finotto, J. Glickman, E. Nieuwenhuis, H. Iijima, A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, J. Mudter, P.R. Galle, A. Bhan, F. Autschbach, B.M. Sullivan, S.J. Szabo, L.H. Glimcher, and R.S. Blumberg. 2002b. The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *The Journal of experimental medicine* 195:1129-1143.
- Ng, S.C., H.Y. Shi, N. Hamidi, F.E. Underwood, W. Tang, E.I. Benchimol, R. Panaccione, S. Ghosh, J.C.Y. Wu, F.K.L. Chan, J.J.Y. Sung, and G.G. Kaplan. 2018. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 390:2769-2778.
- Ng, S.C., W. Tang, R.W. Leong, M. Chen, Y. Ko, C. Studd, O. Niewiadomski, S. Bell, M.A. Kamm, H.J. de Silva, A. Kasturiratne, Y.U. Senanayake, C.J. Ooi, K.L. Ling, D. Ong, K.L. Goh, I. Hilmi, Q. Ouyang, Y.F. Wang, P. Hu, Z. Zhu, Z. Zeng, K. Wu, X. Wang, B. Xia, J. Li, P. Pisespongsa, S. Manatsathit, S. Aniwana, M. Simadibrata, M. Abdullah, S.W. Tsang, T.C. Wong, A.J. Hui, C.M. Chow, H.H. Yu, M.F. Li, K.K. Ng, J. Ching, J.C. Wu, F.K. Chan, and J.J. Sung. 2015. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. *Gut* 64:1063-1071.
- Ni, J., G.D. Wu, L. Albenberg, and V.T. Tomov. 2017. Gut microbiota and IBD: causation or correlation? *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology* 14:573-584.
- Nielsen, O.H., I. Kirman, N. Rudiger, J. Hendel, and B. Vainer. 2003. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 38:180-185.
- Nikolaus, S., B. Schulte, N. Al-Massad, F. Thieme, D.M. Schulte, J. Bethge, A. Rehman, F. Tran, K. Aden, R. Hasler, N. Moll, G. Schutze, M.J. Schwarz, G.H. Waetzig, P. Rosenstiel, M. Krawczak, S. Szymczak, and S. Schreiber.

2017. Increased Tryptophan Metabolism Is Associated With Activity of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 153:1504-1516.e1502.
- Nimmo, E.R., J.G. Prendergast, M.C. Aldhous, N.A. Kennedy, P. Henderson, H.E. Drummond, B.H. Ramsahoye, D.C. Wilson, C.A. Semple, and J. Satsangi. 2012. Genome-wide methylation profiling in Crohn's disease identifies altered epigenetic regulation of key host defense mechanisms including the Th17 pathway. *Inflammatory bowel diseases* 18:889-899.
- Norman, J.M., S.A. Handley, M.T. Baldrige, L. Droit, C.Y. Liu, B.C. Keller, A. Kambal, C.L. Monaco, G. Zhao, P. Fleshner, T.S. Stappenbeck, D.P. McGovern, A. Keshavarzian, E.A. Mutlu, J. Sauk, D. Gevers, R.J. Xavier, D. Wang, M. Parkes, and H.W. Virgin. 2015. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease. *Cell* 160:447-460.
- Noti, M., E.D. Wojno, B.S. Kim, M.C. Siracusa, P.R. Giacomini, M.G. Nair, A.J. Benitez, K.R. Ruymann, A.B. Muir, D.A. Hill, K.R. Chikwava, A.E. Moghaddam, Q.J. Sattentau, A. Alex, C. Zhou, J.H. Yearley, P. Menard-Katcher, M. Kubo, K. Obata-Ninomiya, H. Karasuyama, M.R. Comeau, T. Brown-Whitehorn, R. de Waal Malefyt, P.M. Sleiman, H. Hakonarson, A. Cianferoni, G.W. Falk, M.L. Wang, J.M. Spergel, and D. Artis. 2013. Thymic stromal lymphopoietin-elicited basophil responses promote eosinophilic esophagitis. *Nature medicine* 19:1005-1013.
- Ogino, T., J. Nishimura, S. Barman, H. Kayama, S. Uematsu, D. Okuzaki, H. Osawa, N. Haraguchi, M. Uemura, T. Hata, I. Takemasa, T. Mizushima, H. Yamamoto, K. Takeda, Y. Doki, and M. Mori. 2013. Increased Th17-inducing activity of CD14+ CD163 low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 145:1380-1391.e1381.
- Ohnishi, K., Y. Komohara, Y. Saito, Y. Miyamoto, M. Watanabe, H. Baba, and M. Takeya. 2013. CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer science* 104:1237-1244.
- Okada, S., J.G. Markle, E.K. Deenick, F. Mele, D. Averbuch, M. Lagos, M. Alzahrani, S. Al-Muhsen, R. Halwani, C.S. Ma, N. Wong, C. Soudais, L.A. Henderson, H. Marzouqa, J. Shamma, M. Gonzalez, R. Martinez-Barricarte, C. Okada, D.T. Avery, D. Latorre, C. Deswarte, F. Jabot-Hanin, E. Torrado, J. Fountain, A. Belkadi, Y. Itan, B. Boisson, M. Migaud, C.S. Arlehamn, A. Sette, S. Breton, J. McCluskey, J. Rossjohn, J.P. de Villartay, D. Moshous, S. Hambleton, S. Latour, P.D. Arkwright, C. Picard, O. Lantz, D. Engelhard, M. Kobayashi, L. Abel, A.M. Cooper, L.D. Notarangelo, S. Boisson-Dupuis, A. Puel, F. Sallusto, J. Bustamante, S.G. Tangye, and J.L. Casanova. 2015. IMMUNODEFICIENCIES. Impairment of immunity to *Candida* and *Mycobacterium* in humans with bi-allelic RORC mutations. *Science (New York, N.Y.)* 349:606-613.
- Olszak, T., D. An, S. Zeissig, M.P. Vera, J. Richter, A. Franke, J.N. Glickman, R. Siebert, R.M. Baron, D.L. Kasper, and R.S. Blumberg. 2012. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science (New York, N.Y.)* 336:489-493.
- Ono, E., M. Taniguchi, N. Higashi, H. Mita, K. Kajiwara, H. Yamaguchi, S. Tatsuno, Y. Fukutomi, H. Tanimoto, K. Sekiya, C. Oshikata, T. Tsuburai, N. Tsurikisawa, M. Otomo, Y. Maeda, M. Hasegawa, E. Miyazaki, T. Kumamoto, and K. Akiyama. 2010. CD203c expression on human basophils is associated with asthma exacerbation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125:483-489 e483.
- Opiari, A., and L. Franchi. 2015. Role of inflammasomes in intestinal inflammation and Crohn's disease. *Inflammatory bowel diseases* 21:173-181.
- Palm, N.W., M.R. de Zoete, T.W. Cullen, N.A. Barry, J. Stefanowski, L. Hao, P.H. Degnan, J. Hu, I. Peter, W. Zhang, E. Ruggiero, J.H. Cho, A.L. Goodman, and R.A. Flavell. 2014. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* 158:1000-1010.
- Panduro, M., C. Benoist, and D. Mathis. 2016. Tissue Tregs. *Annual review of immunology* 34:609-633.
- Paramsothy, S., M.A. Kamm, N.O. Kaakoush, A.J. Walsh, J. van den Bogaerde, D. Samuel, R.W.L. Leong, S. Connor, W. Ng, R. Paramsothy, W. Xuan, E. Lin, H.M. Mitchell, and T.J. Borody. 2017. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 389:1218-1228.
- Pascal, V., M. Pozuelo, N. Borruel, F. Casellas, D. Campos, A. Santiago, X. Martinez, E. Varela, G. Sarrabayrouse, K. Machiels, S. Vermeire, H. Sokol, F. Guarner, and C. Manichanh. 2017. A microbial signature for Crohn's disease. *Gut* 66:813-822.
- Pedros, C., F. Duguet, A. Saoudi, and M. Chabod. 2016. Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology* 22:974-995.

- Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M.A. Cassatella. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 115:335-343.
- Peloquin, J.M., G. Goel, E.J. Villablanca, and R.J. Xavier. 2016. Mechanisms of Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Annual review of immunology* 34:31-64.
- Persson, E.K., H. Uronen-Hansson, M. Semmrich, A. Rivollier, K. Hagerbrand, J. Marsal, S. Gudjonsson, U. Hakansson, B. Reizis, K. Kotarsky, and W.W. Agace. 2013. IRF4 transcription-factor-dependent CD103(+)CD11b(+) dendritic cells drive mucosal T helper 17 cell differentiation. *Immunity* 38:958-969.
- Peters, C.P., J.M. Mjosberg, J.H. Bernink, and H. Spits. 2016. Innate lymphoid cells in inflammatory bowel diseases. *Immunology letters* 172:124-131.
- Peters, L.A., J. Perrigoue, A. Mortha, A. Iuga, W.M. Song, E.M. Neiman, S.R. Llewellyn, A. Di Narzo, B.A. Kidd, S.E. Telesco, Y. Zhao, A. Stojmirovic, J. Sendeck, K. Shameer, R. Miotto, B. Losic, H. Shah, E. Lee, M. Wang, J.J. Faith, A. Kasarskis, C. Brodmerkel, M. Curran, A. Das, J.R. Friedman, Y. Fukui, M.B. Humphrey, B.M. Iritani, N. Sibinga, T.K. Tarrant, C. Argmann, K. Hao, P. Roussos, J. Zhu, B. Zhang, R. Dobrin, L.F. Mayer, and E.E. Schadt. 2017. A functional genomics predictive network model identifies regulators of inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 49:1437-1449.
- Plantinga, M., M. Williams, M. Vanheerswynghels, K. Deswarte, F. Branco-Madeira, W. Toussaint, L. Vanhoutte, K. Neyt, N. Killeen, B. Malissen, H. Hammad, and B.N. Lambrecht. 2013. Conventional and monocyte-derived CD11b(+) dendritic cells initiate and maintain T helper 2 cell-mediated immunity to house dust mite allergen. *Immunity* 38:322-335.
- Polytarchou, C., D.W. Hommes, T. Palumbo, M. Hatzia Apostolou, M. Koutsoumpa, G. Koukos, A.E. van der Meulen-de Jong, A. Oikonomopoulos, W.K. van Deen, C. Vorvis, O.B. Serebrennikova, E. Birli, J. Choi, L. Chang, P.A. Anton, P.N. Tsihli, C. Pothoulakis, H.W. Verspaget, and D. Iliopoulos. 2015. MicroRNA214 Is Associated With Progression of Ulcerative Colitis, and Inhibition Reduces Development of Colitis and Colitis-Associated Cancer in Mice. *Gastroenterology* 149:981-992.e911.
- Powrie, F., M.W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L.B. Caddle, and R.L. Coffman. 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1:553-562.
- Punkenburg, E., T. Vogler, M. Buttner, K. Amann, M. Waldner, R. Atreya, B. Abendroth, J. Mudter, S. Merkel, E. Gallmeier, S. Rose-John, M.F. Neurath, and K. Hildner. 2015. Batf-dependent Th17 cells critically regulate IL-23 driven colitis-associated colon cancer. *Gut*
- Quevrain, E., M.A. Maubert, C. Michon, F. Chain, R. Marquant, J. Tailhades, S. Miquel, L. Carlier, L.G. Bermudez-Humaran, B. Pigneur, O. Lequin, P. Kharrat, G. Thomas, D. Rainteau, C. Aubry, N. Breyner, C. Afonso, S. Lavielle, J.P. Grill, G. Chassaing, J.M. Chatel, G. Trugnan, R. Xavier, P. Langella, H. Sokol, and P. Seksik. 2016. Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease. *Gut* 65:415-425.
- Ramesh, R., L. Kozhaya, K. McKevitt, I.M. Djuretic, T.J. Carlson, M.A. Quintero, J.L. McCauley, M.T. Abreu, D. Unutmaz, and M.S. Sundrud. 2014. Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *The Journal of experimental medicine* 211:89-104.
- Rawla, P., T. Sunkara, and J.P. Raj. 2018. Role of biologics and biosimilars in inflammatory bowel disease: current trends and future perspectives. *Journal of inflammation research* 11:215-226.
- Reinisch, W., D.W. Hommes, G. Van Assche, J.F. Colombel, J.P. Gendre, B. Oldenburg, A. Teml, K. Geboes, H. Ding, L. Zhang, M. Tang, M. Cheng, S.J. van Deventer, P. Rutgeerts, and T. Pearce. 2006. A dose escalating, placebo controlled, double blind, single dose and multidose, safety and tolerability study of fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 55:1138-1144.
- Reinisch, W., J. Panes, S. Khurana, G. Toth, F. Hua, G.M. Comer, M. Hinz, K. Page, M. O'Toole, T.M. Moorehead, H. Zhu, Y. Sun, and F. Cataldi. 2015. Anrukinzumab, an anti-interleukin 13 monoclonal antibody, in active UC: efficacy and safety from a phase IIa randomised multicentre study. *Gut* 64:894-900.
- Richter, L., O.J.B. Landsverk, N. Atlasy, A. Bujko, S. Yaqub, R. Horneland, O. Oyen, E.M. Aandahl, K.E.A. Lundin, H.G. Stunnenberg, E.S. Baekkevold, and F.L. Jahnsen. 2018. Transcriptional profiling reveals monocyte-related macrophages phenotypically resembling DC in human intestine. *Mucosal immunology* 11:1512-1523.

- Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G.M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena, and M. Rescigno. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6:507-514.
- Rivera-Nieves, J., T. Olson, G. Bamias, A. Bruce, M. Solga, R.F. Knight, S. Hoang, F. Cominelli, and K. Ley. 2005. L-selectin, alpha 4 beta 1, and alpha 4 beta 7 integrins participate in CD4+ T cell recruitment to chronically inflamed small intestine. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174:2343-2352.
- Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *The Journal of experimental medicine* 200:725-735.
- Rivollier, A., J. He, A. Kole, V. Valatas, and B.L. Kelsall. 2012. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *The Journal of experimental medicine* 209:139-155.
- Rocchi, A., E.I. Benchimol, C.N. Bernstein, A. Bitton, B. Feagan, R. Panaccione, K.W. Glasgow, A. Fernandes, and S. Ghosh. 2012. Inflammatory bowel disease: a Canadian burden of illness review. *Can J Gastroenterol* 26:811-817.
- Rodriguez Gomez, M., Y. Talke, C. Hofmann, I. Ketelsen, F. Hermann, B. Reich, N. Goebel, K. Schmidbauer, N. Dunger, H. Bruhl, K. Renner, S.N. Syed, and M. Mack. 2013. Basophils control T-cell responses and limit disease activity in experimental murine colitis. *Mucosal immunology*
- Romagnani, S. 1999. Th1/Th2 cells. *Inflammatory bowel diseases* 5:285-294.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, R. Bacchetta, and M. Battaglia. 2014. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications. *Current topics in microbiology and immunology* 380:39-68.
- Rosen, M.J., R. Karns, J.E. Vallance, R. Bezold, A. Waddell, M.H. Collins, Y. Haberman, P. Minar, R.N. Baldassano, J.S. Hyams, S.S. Baker, R. Kellermayer, J.D. Noe, A.M. Griffiths, J.R. Rosh, W.V. Crandall, M.B. Heyman, D.R. Mack, M.D. Kappelman, J. Markowitz, D.E. Moulton, N.S. Leleiko, T.D. Walters, S. Kugathasan, K.T. Wilson, S.P. Hogan, and L.A. Denson. 2017. Mucosal Expression of Type 2 and Type 17 Immune Response Genes Distinguishes Ulcerative Colitis From Colon-Only Crohn's Disease in Treatment-Naive Pediatric Patients. *Gastroenterology* 152:1345-1357.e1347.
- Rovedatti, L., T. Kudo, P. Biancheri, M. Sarra, C.H. Knowles, D.S. Rampton, G.R. Corazza, G. Monteleone, A. Di Sabatino, and T.T. Macdonald. 2009. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* 58:1629-1636.
- Rubtsov, Y.P., J.P. Rasmussen, E.Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W.R. Henderson, Jr., W. Muller, and A.Y. Rudensky. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28:546-558.
- Ruemmele, F.M. 2016. Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Annals of nutrition & metabolism* 68 Suppl 1:33-41.
- Sairenji, T., K.L. Collins, and D.V. Evans. 2017. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Primary care* 44:673-692.
- Sakuraba, A., T. Sato, N. Kamada, M. Kitazume, A. Sugita, and T. Hibi. 2009. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137:1736-1745.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
- Sandborn, W.J., B.G. Feagan, P. Rutgeerts, S. Hanauer, J.F. Colombel, B.E. Sands, M. Lukas, R.N. Fedorak, S. Lee, B. Bressler, I. Fox, M. Rosario, S. Sankoh, J. Xu, K. Stephens, C. Milch, and A. Parikh. 2013. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine* 369:711-721.
- Sander, J., S.V. Schmidt, B. Cirovic, N. McGovern, O. Papantonopoulou, A.L. Hardt, A.C. Aschenbrenner, C. Kreer, T. Quast, A.M. Xu, L.M. Schmidleithner, H. Theis, L.D. Thi Huong, H.R.B. Sumatoh, M.A.R. Lauterbach, J. Schulte-Schrepping, P. Gunther, J. Xue, K. Bassler, T. Ulas, K. Klee, N. Katzmarski, S. Herresthal, W. Krebs, B. Martin, E. Latz, K. Handler, M. Kraut, W. Kolanus, M. Beyer, C.S. Falk, B. Wiegmann, S. Burgdorf, N.A. Melosh, E.W. Newell, F. Ginhoux, A. Schlitzer, and J.L. Schultze. 2017. Cellular Differentiation of Human Monocytes Is Regulated by Time-Dependent Interleukin-4 Signaling and the Transcriptional Regulator NCOR2. *Immunity* 47:1051-1066.e1012.

- Sands, B.E., J. Chen, B.G. Feagan, M. Penney, W.A. Rees, S. Danese, P.D.R. Higgins, P. Newbold, R. Faggioni, K. Patra, J. Li, P. Klekotka, C. Morehouse, E. Pulkstenis, J. Drappa, R. van der Merwe, and R.A. Gasser, Jr. 2017. Efficacy and Safety of MEDI2070, an Antibody Against Interleukin 23, in Patients With Moderate to Severe Crohn's Disease: A Phase 2a Study. *Gastroenterology* 153:77-86.e76.
- Sano, T., W. Huang, J.A. Hall, Y. Yang, A. Chen, S.J. Gavzy, J.Y. Lee, J.W. Ziel, E.R. Miraldi, A.I. Domingos, R. Bonneau, and D.R. Littman. 2015. An IL-23R/IL-22 Circuit Regulates Epithelial Serum Amyloid A to Promote Local Effector Th17 Responses. *Cell* 163:381-393.
- Sarfati, M., K. Wakahara, L. Chapuy, and G. Delespesse. 2015. Mutual Interaction of Basophils and T Cells in Chronic Inflammatory Diseases. *Frontiers in immunology* 6:399.
- Sathaliyawala, T., M. Kubota, N. Yudanin, D. Turner, P. Camp, J.J. Thome, K.L. Bickham, H. Lerner, M. Goldstein, M. Sykes, T. Kato, and D.L. Farber. 2013. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. *Immunity* 38:187-197.
- Schenk, M., A. Bouchon, F. Seibold, and C. Mueller. 2007. TREM-1--expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. *The Journal of clinical investigation* 117:3097-3106.
- Schenkel, J.M., and D. Masopust. 2014. Tissue-resident memory T cells. *Immunity* 41:886-897.
- Schlitzer, A., N. McGovern, P. Teo, T. Zelante, K. Atarashi, D. Low, A.W. Ho, P. See, A. Shin, P.S. Wasan, G. Hoeffel, B. Malleret, A. Heiseke, S. Chew, L. Jardine, H.A. Purvis, C.M. Hilken, J. Tam, M. Poidinger, E.R. Stanley, A.B. Krug, L. Renia, B. Sivasankar, L.G. Ng, M. Collin, P. Ricciardi-Castagnoli, K. Honda, M. Haniffa, and F. Ginhoux. 2013. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses. *Immunity* 38:970-983.
- Schmitt, H., U. Billmeier, W. Dieterich, T. Rath, S. Sonnenwald, S. Reid, S. Hirschmann, K. Hildner, M.J. Waldner, J. Mudter, A. Hartmann, R. Grutzmann, C. Neufert, T. Munster, M.F. Neurath, and R. Atreya. 2018. Expansion of IL-23 receptor bearing TNFR2+ T cells is associated with molecular resistance to anti-TNF therapy in Crohn's disease. *Gut*
- Schreiber, S., S. Nikolaus, J. Hampe, J. Hamling, I. Koop, B. Groessner, H. Lochs, and A. Raedler. 1999. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1beta in relapse of Crohn's disease. *Lancet* 353:459-461.
- Schridde, A., C.C. Bain, J.U. Mayer, J. Montgomery, E. Pollet, B. Denecke, S.W.F. Milling, S.J. Jenkins, M. Dalod, S. Henri, B. Malissen, O. Pabst, and A. McL Mowat. 2017. Tissue-specific differentiation of colonic macrophages requires TGFbeta receptor-mediated signaling. *Mucosal immunology* 10:1387-1399.
- Schroder, M., G.R. Melum, O.J. Landsverk, A. Bujko, S. Yaqub, E. Gran, H. Aamodt, E.S. Baekkevold, F.L. Jahnsen, and L. Richter. 2016. CD1c-Expression by Monocytes - Implications for the Use of Commercial CD1c+ Dendritic Cell Isolation Kits. 11:e0157387.
- Schroeder, J.T. 2011. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *Immunological reviews* 242:144-160.
- Scott, C.L., C.C. Bain, P.B. Wright, D. Sichien, K. Kotarsky, E.K. Persson, K. Luda, M. Guilliams, B.N. Lambrecht, W.W. Agace, S.W. Milling, and A.M. Mowat. 2015. CCR2(+)/CD103(-) intestinal dendritic cells develop from DC-committed precursors and induce interleukin-17 production by T cells. *Mucosal immunology* 8:327-339.
- See, P., C.A. Dutertre, and J. Chen. 2017. Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. 356:
- Sefik, E., N. Geva-Zatorsky, S. Oh, L. Konnikova, D. Zemmour, A.M. McGuire, D. Burzyn, A. Ortiz-Lopez, M. Lobera, J. Yang, S. Ghosh, A. Earl, S.B. Snapper, R. Jupp, D. Kasper, D. Mathis, and C. Benoist. 2015. MUCOSAL IMMUNOLOGY. Individual intestinal symbionts induce a distinct population of RORgamma(+) regulatory T cells. *Science (New York, N.Y.)* 349:993-997.
- Segura, E., and S. Amigorena. 2013. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in immunology* 34:440-445.
- Segura, E., and V. Soumelis. 2017. Of Human DC Migrants and Residents. *Immunity* 46:342-344.
- Segura, E., M. Touzot, A. Bohineust, A. Cappuccio, G. Chiochia, A. Hosmalin, M. Dalod, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2013. Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38:336-348.
- Segura, E., J. Valladeau-Guilemond, M.H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, and S. Amigorena. 2012. Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 209:653-660.

- Serbina, N.V., T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, and E.G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
- Shah, S.C., J.F. Colombel, B.E. Sands, and N. Narula. 2016. Mucosal Healing Is Associated With Improved Long-term Outcomes of Patients With Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 14:1245-1255.e1248.
- Shaw, T.N., and S.A. Houston. 2018. Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4 and CD4 expression. 215:1507-1518.
- Shouval, D.S., A. Biswas, Y.H. Kang, A.E. Griffith, L. Konnikova, I.D. Mascanfroni, N.S. Redhu, S.M. Frei, M. Field, A.L. Doty, J.D. Goldsmith, A.K. Bhan, A. Loizides, B. Weiss, B. Yerushalmi, T. Yanagi, X. Lui, F.J. Quintana, A.M. Muise, C. Klein, B.H. Horwitz, S.C. Glover, A. Bousvaros, and S.B. Snapper. 2016a. Interleukin 1 Beta Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Patients with IL10 Receptor Deficiency. *Gastroenterology*
- Shouval, D.S., A. Biswas, Y.H. Kang, A.E. Griffith, L. Konnikova, I.D. Mascanfroni, N.S. Redhu, S.M. Frei, M. Field, A.L. Doty, J.D. Goldsmith, A.K. Bhan, A. Loizides, B. Weiss, B. Yerushalmi, T. Yanagi, X. Lui, F.J. Quintana, A.M. Muise, C. Klein, B.H. Horwitz, S.C. Glover, A. Bousvaros, and S.B. Snapper. 2016b. Interleukin 1beta Mediates Intestinal Inflammation in Mice and Patients With Interleukin 10 Receptor Deficiency. *Gastroenterology* 151:1100-1104.
- Sichien, D., B.N. Lambrecht, M. Guilliams, and C.L. Scott. 2017. Development of conventional dendritic cells: from common bone marrow progenitors to multiple subsets in peripheral tissues. *Mucosal immunology*
- Siddiqui, K.R., S. Laffont, and F. Powrie. 2010. E-cadherin marks a subset of inflammatory dendritic cells that promote T cell-mediated colitis. *Immunity* 32:557-567.
- Siegel, C.A., H. Horton, L.S. Siegel, K.D. Thompson, T. Mackenzie, S.K. Stewart, P.W. Rice, J.M. Stempak, S. Dezfoli, T. Haritunians, A. Levy, M. Baek, R. Milgrom, P.S. Dulai, S.R. Targan, M.S. Silverberg, M.C. Dubinsky, and D.P. McGovern. 2016. A validated web-based tool to display individualised Crohn's disease predicted outcomes based on clinical, serologic and genetic variables. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 43:262-271.
- Simpson, S.J., S. Shah, M. Comiskey, Y.P. de Jong, B. Wang, E. Mizoguchi, A.K. Bhan, and C. Terhorst. 1998. T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells. *The Journal of experimental medicine* 187:1225-1234.
- Singh, S.P., H.H. Zhang, H. Tsang, P.J. Gardina, T.G. Myers, V. Nagarajan, C.H. Lee, and J.M. Farber. 2015. PLZF regulates CCR6 and is critical for the acquisition and maintenance of the Th17 phenotype in human cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194:4350-4361.
- Siracusa, M.C., B.S. Kim, J.M. Spergel, and D. Artis. 2013. Basophils and allergic inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* 132:789-801.
- Siracusa, M.C., S.A. Saenz, D.A. Hill, B.S. Kim, M.B. Headley, T.A. Doering, E.J. Wherry, H.K. Jessup, L.A. Siegel, T. Kambayashi, E.C. Dudek, M. Kubo, A. Cianferoni, J.M. Spergel, S.F. Ziegler, M.R. Comeau, and D. Artis. 2011. TSLP promotes interleukin-3-independent basophil haematopoiesis and type 2 inflammation. *Nature* 477:229-233.
- Smith, P.D., L.E. Smythies, R. Shen, T. Greenwell-Wild, M. Gliozzi, and S.M. Wahl. 2011. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. *Mucosal immunology* 4:31-42.
- Smythies, L.E., M. Sellers, R.H. Clements, M. Mosteller-Barnum, G. Meng, W.H. Benjamin, J.M. Orenstein, and P.D. Smith. 2005. Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation* 115:66-75.
- Sokol, C.L., G.M. Barton, A.G. Farr, and R. Medzhitov. 2008. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9:310-318.
- Sokol, H., P. Seksik, J.P. Furet, O. Firmesse, I. Nion-Larmurier, L. Beaugerie, J. Cosnes, G. Corthier, P. Marteau, and J. Dore. 2009. Low counts of Faecalibacterium prausnitzii in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases* 15:1183-1189.
- Solem, C.A., E.V. Loftus, Jr., W.J. Tremaine, W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister, and W.J. Sandborn. 2005. Correlation of C-reactive protein with clinical, endoscopic, histologic, and radiographic activity in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* 11:707-712.

- Song, X., D. Dai, X. He, S. Zhu, Y. Yao, H. Gao, J. Wang, F. Qu, J. Qiu, H. Wang, X. Li, N. Shen, and Y. Qian. 2015. Growth Factor FGF2 Cooperates with Interleukin-17 to Repair Intestinal Epithelial Damage. *Immunity* 43:488-501.
- Stadhouders, R., E. Lubberts, and R.W. Hendriks. 2018. A cellular and molecular view of T helper 17 cell plasticity in autoimmunity. *Journal of autoimmunity* 87:1-15.
- Steel, A.W., C.M. Mela, J.O. Lindsay, B.G. Gazzard, and M.R. Goodier. 2011. Increased proportion of CD16(+) NK cells in the colonic lamina propria of inflammatory bowel disease patients, but not after azathioprine treatment. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 33:115-126.
- Stockinger, B., and S. Omenetti. 2017. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature reviews. Immunology* 17:535-544.
- Sugawara, R., E.J. Lee, M.S. Jang, E.J. Jeun, C.P. Hong, J.H. Kim, A. Park, C.H. Yun, S.W. Hong, Y.M. Kim, J.Y. Seoh, Y. Jung, C.D. Surh, M. Miyasaka, B.G. Yang, and M.H. Jang. 2016. Small intestinal eosinophils regulate Th17 cells by producing IL-1 receptor antagonist. *The Journal of experimental medicine* 213:555-567.
- Sullivan, B.M., H.E. Liang, J.K. Bando, D. Wu, L.E. Cheng, J.K. McKerrow, C.D. Allen, and R.M. Locksley. 2011. Genetic analysis of basophil function in vivo. *Nature immunology* 12:527-535.
- Takebayashi, K., I. Kobozev, D.V. Ostanin, L. Gray, F. Karlsson, S.A. Robinson-Jackson, M. Kosloski-Davidson, A.B. Dooley, S. Zhang, and M.B. Grisham. 2011. Role of the gut-associated and secondary lymphoid tissue in the induction of chronic colitis. *Inflammatory bowel diseases* 17:268-278.
- Takehita, M., K. Suzuki, Y. Kassai, M. Takiguchi, Y. Nakayama, Y. Otomo, R. Morita, T. Miyazaki, A. Yoshimura, and T. Takeuchi. 2015. Polarization diversity of human CD4+ stem cell memory T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 159:107-117.
- Tamoutounour, S., S. Henri, H. Lelouard, B. de Bovis, C. de Haar, C.J. van der Woude, A.M. Woltman, Y. Reyat, D. Bonnet, D. Sichien, C.C. Bain, A.M. Mowat, C. Reis e Sousa, L.F. Poulin, B. Malissen, and M. Guilliams. 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European journal of immunology* 42:3150-3166.
- Tanaka, J., K. Saga, M. Kido, H. Nishiura, T. Akamatsu, T. Chiba, and N. Watanabe. 2010. Proinflammatory Th2 cytokines induce production of thymic stromal lymphopoietin in human colonic epithelial cells. *Digestive diseases and sciences* 55:1896-1904.
- Tanaka, T., T. Yamamoto, K. Sawada, and R. Sacco. 2017. Treatment options for children and adolescents with inflammatory bowel disease: is granulomonocytapheresis an effective alternative to drug therapy? *Expert review of gastroenterology & hepatology* 11:749-758.
- Therrien, A., L. Chapuy, M. Bsat, M. Rubio, G. Bernard, E. Arslanian, K. Orlicka, A. Weber, B.P. Panzini, J. Dorais, E.J. Bernard, G. Soucy, M. Bouin, and M. Sarfati. 2018. Recruitment of Activated Neutrophils Correlates with Disease Severity in Adult Crohn's Disease.
- Thia, K.T., W.J. Sandborn, W.S. Harmsen, A.R. Zinsmeister, and E.V. Loftus, Jr. 2010. Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* 139:1147-1155.
- Thiesen, S., S. Janciauskiene, H. Uronen-Hansson, W. Agace, C.M. Hogerkorp, P. Spee, K. Hakansson, and O. Grip. 2014. CD14(hi)HLA-DR(dim) macrophages, with a resemblance to classical blood monocytes, dominate inflamed mucosa in Crohn's disease. *Journal of leukocyte biology* 95:531-541.
- Thomas, K., K. Dietze, R. Wehner, I. Metz, H. Tumani, T. Schultheiss, C. Gunther, K. Schakel, H. Reichmann, W. Bruck, M. Schmitz, and T. Ziemssen. 2014. Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 1:e33.
- Thome, J.J., N. Yudanin, Y. Ohmura, M. Kubota, B. Grinshpun, T. Sathaliyawala, T. Kato, H. Lerner, Y. Shen, and D.L. Farber. 2014. Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. *Cell* 159:814-828.
- Ueno, A., L. Jeffery, T. Kobayashi, T. Hibi, S. Ghosh, and H. Jijon. 2018. Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *Journal of autoimmunity* 87:38-49.
- Uhlig, H.H., and F. Powrie. 2018. Translating Immunology into Therapeutic Concepts for Inflammatory Bowel Disease. *Annual review of immunology* 36:755-781.
- Uhlig, H.H., T. Schwerd, S. Koletzko, N. Shah, J. Kammermeier, A. Elkadri, J. Ouahed, D.C. Wilson, S.P. Travis, D. Turner, C. Klein, S.B. Snapper, and A.M. Muise. 2014. The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 147:990-1007.e1003.

- Ungaro, R., C.N. Bernstein, R. Gearry, A. Hviid, K.L. Kolho, M.P. Kronman, S. Shaw, H. Van Kruiningen, J.F. Colombel, and A. Atreja. 2014. Antibiotics associated with increased risk of new-onset Crohn's disease but not ulcerative colitis: a meta-analysis. *The American journal of gastroenterology* 109:1728-1738.
- Ungaro, R., S. Mehandru, P.B. Allen, L. Peyrin-Biroulet, and J.F. Colombel. 2017. Ulcerative colitis. *Lancet* 389:1756-1770.
- Uo, M., T. Hisamatsu, J. Miyoshi, D. Kaito, K. Yoneno, M.T. Kitazume, M. Mori, A. Sugita, K. Koganei, K. Matsuoka, T. Kanai, and T. Hibi. 2013. Mucosal CXCR4+ IgG plasma cells contribute to the pathogenesis of human ulcerative colitis through FcγR-mediated CD14 macrophage activation. *Gut* 62:1734-1744.
- Valatas, V., G. Bamias, and G. Kolios. 2015. Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *European journal of pharmacology* 759:253-264.
- Van der Sluis, M., B.A. De Koning, A.C. De Bruijn, A. Velcich, J.P. Meijerink, J.B. Van Goudeever, H.A. Buller, J. Dekker, I. Van Seuningen, I.B. Renes, and A.W. Einerhand. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* 131:117-129.
- Van Gassen, S., B. Callebaut, M.J. Van Helden, B.N. Lambrecht, P. Demeester, T. Dhaene, and Y. Saey. 2015. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 87:636-645.
- Varga, C., K. Horvath, A. Berko, R.L. Thurmond, P.J. Dunford, and B.J. Whittle. 2005. Inhibitory effects of histamine H4 receptor antagonists on experimental colitis in the rat. *European journal of pharmacology* 522:130-138.
- Veenbergen, S., L.A. van Berkel, M.F. du Pre, J. He, J.J. Karrich, L.M. Costes, F. Luk, Y. Simons-Oosterhuis, H.C. Raatgeep, V. Cerovic, T. Cupedo, A.M. Mowat, B.L. Kelsall, and J.N. Samsom. 2016. Colonic tolerance develops in the iliac lymph nodes and can be established independent of CD103(+) dendritic cells. *Mucosal immunology* 9:894-906.
- Verstege, M.I., F.J. ten Kate, S.M. Reinartz, C.M. van Drunen, F.J. Slors, W.A. Bemelman, F.A. Vyth-Dreese, and A.A. te Velde. 2008. Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 56:233-241.
- Villani, A.C., and R. Satija. 2017. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. 356:
- Voedisch, S., C. Koenecke, S. David, H. Herbrand, R. Forster, M. Rhen, and O. Pabst. 2009. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of Salmonella enterica serovar Typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infection and immunity* 77:3170-3180.
- Voehringer, D. 2013. Protective and pathological roles of mast cells and basophils. *Nature reviews. Immunology* 13:362-375.
- Vos, A.C., M.E. Wildenberg, I. Arijs, M. Duijvestein, A.P. Verhaar, G. de Hertogh, S. Vermeire, P. Rutgeerts, G.R. van den Brink, and D.W. Hommes. 2012. Regulatory macrophages induced by infliximab are involved in healing in vivo and in vitro. *Inflammatory bowel diseases* 18:401-408.
- Wakahara, K., N. Baba, V.Q. Van, P. Begin, M. Rubio, P. Ferraro, B. Panzini, R. Wassef, R. Lahaie, Y. Caussignac, R. Tamaz, C. Richard, G. Soucy, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2012. Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood* 120:4761-4771.
- Wakahara, K., V.Q. Van, N. Baba, P. Begin, M. Rubio, G. Delespesse, and M. Sarfati. 2013. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans. *Allergy* 68:180-189.
- Walana, W., Y. Ye, M. Li, J. Wang, B. Wang, J.W. Cheng, J.R. Gordon, and F. Li. 2018. IL-8 antagonist, CXCL8(3-72)K11R/G31P coupled with probiotic exhibit variably enhanced therapeutic potential in ameliorating ulcerative colitis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 103:253-261.
- Wallace, K.L., L.B. Zheng, Y. Kanazawa, and D.Q. Shih. 2014. Immunopathology of inflammatory bowel disease. *World journal of gastroenterology* 20:6-21.
- Wang, C., N. Yosef, J. Gaublotte, C. Wu, Y. Lee, C.B. Clish, J. Kaminski, S. Xiao, G. Meyer Zu Horste, M. Pawlak, Y. Kishi, N. Joller, K. Karwacz, C. Zhu, M. Ordovas-Montanes, A. Madi, I. Wortman, T. Miyazaki, R.A. Sobel, H. Park, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2015. CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* 163:1413-1427.

- Wang, Y., J. Godec, K. Ben-Aissa, K. Cui, K. Zhao, A.B. Pucsek, Y.K. Lee, C.T. Weaver, R. Yagi, and V. Lazarevic. 2014. The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon-gamma-producing T helper 17 cells. *Immunity* 40:355-366.
- Watchmaker, P.B., K. Lahl, M. Lee, D. Baumjohann, J. Morton, S.J. Kim, R. Zeng, A. Dent, K.M. Ansel, B. Diamond, H. Hadeiba, and E.C. Butcher. 2014. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nature immunology* 15:98-108.
- Weber, B., L. Saurer, M. Schenk, N. Dickgreber, and C. Mueller. 2011. CX3CR1 defines functionally distinct intestinal mononuclear phagocyte subsets which maintain their respective functions during homeostatic and inflammatory conditions. *European journal of immunology* 41:773-779.
- Wehkamp, J., N.H. Salzman, E. Porter, S. Nuding, M. Weichenthal, R.E. Petras, B. Shen, E. Schaeffeler, M. Schwab, R. Linzmeier, R.W. Feathers, H. Chu, H. Lima, Jr., K. Fellermann, T. Ganz, E.F. Stange, and C.L. Bevins. 2005. Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:18129-18134.
- Weigmann, B., N. Schughart, C. Wiebe, S. Sudowe, H.A. Lehr, H. Jonuleit, L. Vogel, C. Becker, M.F. Neurath, S. Grabbe, J. Saloga, and I. Bellinghausen. 2012. Allergen-induced IgE-dependent gut inflammation in a human PBMC-engrafted murine model of allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology* 129:1126-1135.
- Weiser, M., and J.M. Simon. 2018. Molecular classification of Crohn's disease reveals two clinically relevant subtypes. 67:36-42.
- Weller, P.F., and L.A. Spencer. 2017. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nature reviews. Immunology* 17:746-760.
- Wera, O., P. Lancellotti, and C. Oury. 2016. The Dual Role of Neutrophils in Inflammatory Bowel Diseases. *Journal of clinical medicine* 5:
- West, N.R., A.N. Hegazy, B.M.J. Owens, S.J. Bullers, B. Linggi, S. Buonocore, M. Coccia, D. Gortz, S. This, K. Stockenhuber, J. Pott, M. Friedrich, G. Ryzhakov, F. Baribaud, C. Brodmerkel, C. Cieluch, N. Rahman, G. Muller-Newen, R.J. Owens, A.A. Kuhl, K.J. Maloy, S.E. Plevy, S. Keshav, and S.P.L. Travis. 2017. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. 23:579-589.
- Willing, B.P., J. Dicksved, J. Halfvarson, A.F. Andersson, M. Lucio, Z. Zheng, G. Jarnerot, C. Tysk, J.K. Jansson, and L. Engstrand. 2010. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. *Gastroenterology* 139:1844-1854.e1841.
- Wong, M.T., D.E. Ong, F.S. Lim, K.W. Teng, N. McGovern, S. Narayanan, W.Q. Ho, D. Cerny, H.K. Tan, R. Anicete, B.K. Tan, T.K. Lim, C.Y. Chan, P.C. Cheow, S.Y. Lee, A. Takano, E.H. Tan, J.K. Tam, E.Y. Tan, J.K. Chan, K. Fink, A. Bertolotti, F. Ginhoux, M.A. Curotto de Lafaille, and E.W. Newell. 2016. A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. *Immunity* 45:442-456.
- Woodruff, S.A., J.C. Masterson, S. Fillon, Z.D. Robinson, and G.T. Furuta. 2011. Role of eosinophils in inflammatory bowel and gastrointestinal diseases. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* 52:650-661.
- Worbs, T., S.I. Hammerschmidt, and R. Forster. 2017. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature reviews. Immunology* 17:30-48.
- Wu, W., C. He, C. Liu, A.T. Cao, X. Xue, H.L. Evans-Marin, M. Sun, L. Fang, S. Yao, I.V. Pinchuk, D.W. Powell, Z. Liu, and Y. Cong. 2015. miR-10a inhibits dendritic cell activation and Th1/Th17 cell immune responses in IBD. *Gut* 64:1755-1764.
- Xavier, R.J., and D.K. Podolsky. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.
- Xie, H., and S.H. He. 2005. Roles of histamine and its receptors in allergic and inflammatory bowel diseases. *World journal of gastroenterology* 11:2851-2857.
- Yang, B.H., S. Hagemann, P. Mamareli, U. Lauer, U. Hoffmann, M. Beckstette, L. Fohse, I. Prinz, J. Pezoldt, S. Suerbaum, T. Sparwasser, A. Hamann, S. Floess, J. Huehn, and M. Lochner. 2016. Foxp3(+) T cells expressing RORgammat represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal immunology* 9:444-457.
- Yang, L., D.E. Anderson, C. Baecher-Allan, W.D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V.K. Kuchroo, and D.A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454:350-352.

- Yang, X., Q. He, Z. Guo, F. Xiong, Y. Li, Y. Pan, C. Gao, L. Li, and C. He. 2018. MicroRNA-425 facilitates pathogenic Th17 cell differentiation by targeting forkhead box O1 (Foxo1) and is associated with inflammatory bowel disease. *Biochemical and biophysical research communications* 496:352-358.
- Yang, Y., M.B. Torchinsky, M. Gobert, H. Xiong, M. Xu, J.L. Linehan, F. Alonzo, C. Ng, A. Chen, X. Lin, A. Sczesnak, J.J. Liao, V.J. Torres, M.K. Jenkins, J.J. Lafaille, and D.R. Littman. 2014. Focused specificity of intestinal TH17 cells towards commensal bacterial antigens. *Nature* 510:152-156.
- Yi, J.M., and T.O. Kim. 2015. Epigenetic alterations in inflammatory bowel disease and cancer. *Intestinal research* 13:112-121.
- Yilmaz, B., and P. Juillerat. 2019. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. 25:323-336.
- Yilmaz, B., P. Juillerat, O. Oyas, C. Ramon, F.D. Bravo, Y. Franc, N. Fournier, P. Michetti, C. Mueller, M. Geuking, V.E.H. Pittet, M.H. Maillard, G. Rogler, I.B.D.C.I. Swiss, R. Wiest, J. Stelling, and A.J. Macpherson. 2019. Microbial network disturbances in relapsing refractory Crohn's disease. *Nat Med* 25:323-336.
- Yu, F., S. Sharma, J. Edwards, L. Feigenbaum, and J. Zhu. 2015. Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. *Nature immunology* 16:197-206.
- Yu, X., D. Rollins, K.A. Ruhn, J.J. Stubblefield, C.B. Green, M. Kashiwada, P.B. Rothman, J.S. Takahashi, and L.V. Hooper. 2013. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science (New York, N.Y.)* 342:727-730.
- Zaba, L.C., J. Fuentes-Duculan, N.J. Eungdamrong, M.V. Abello, I. Novitskaya, K.C. Pierson, J. Gonzalez, J.G. Krueger, and M.A. Lowes. 2009. Psoriasis is characterized by accumulation of immunostimulatory and Th1/Th17 cell-polarizing myeloid dendritic cells. *The Journal of investigative dermatology* 129:79-88.
- Zenewicz, L.A., G.D. Yancopoulos, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, S. Stevens, and R.A. Flavell. 2008. Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* 29:947-957.
- Zhang, Y.Z., and Y.Y. Li. 2014. Inflammatory bowel disease: pathogenesis. *World journal of gastroenterology* 20:91-99.
- Zhao, P., X. Xiao, R.M. Ghobrial, and X.C. Li. 2013. IL-9 and Th9 cells: progress and challenges. *International immunology* 25:547-551.
- Zhou, G., L. Yu, L. Fang, W. Yang, T. Yu, Y. Miao, M. Chen, K. Wu, F. Chen, Y. Cong, and Z. Liu. 2018. CD177(+) neutrophils as functionally activated neutrophils negatively regulate IBD. *Gut* 67:1052-1063.
- Zielinski, C.E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2012. Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-gamma or IL-10 and are regulated by IL-1beta. *Nature* 484:514-518.
- Zigmond, E., B. Bernshtein, G. Friedlander, C.R. Walker, S. Yona, K.W. Kim, O. Brenner, R. Krauthgamer, C. Varol, W. Muller, and S. Jung. 2014. Macrophage-restricted interleukin-10 receptor deficiency, but not IL-10 deficiency, causes severe spontaneous colitis. *Immunity* 40:720-733.
- Zigmond, E., C. Varol, J. Farache, E. Elmaliah, A.T. Satpathy, G. Friedlander, M. Mack, N. Shpigel, I.G. Boneca, K.M. Murphy, G. Shakhar, Z. Halpern, and S. Jung. 2012. Ly6C hi monocytes in the inflamed colon give rise to proinflammatory effector cells and migratory antigen-presenting cells. *Immunity* 37:1076-1090.
- Zilionis, R., C. Engblom, C. Pfirschke, V. Savova, D. Zemmour, H.D. Saatcioglu, I. Krishnan, G. Maroni, C.V. Meyerovitz, C.M. Kerwin, S. Choi, W.G. Richards, A. De Rienzo, D.G. Tenen, R. Bueno, E. Levantini, M.J. Pittet, and A.M. Klein. 2019. Single-Cell Transcriptomics of Human and Mouse Lung Cancers Reveals Conserved Myeloid Populations across Individuals and Species. *Immunity*
- Zimmermann, J., P. Durek, A.A. Kuhl, F. Schattenberg, P. Maschmeyer, and F. Siracusa. 2018. The intestinal microbiota determines the colitis-inducing potential of T-bet-deficient Th cells in mice. 48:161-167.
- Zimmermann, J., A.A. Kuhl, M. Weber, J.R. Grun, J. Loffler, C. Haftmann, R. Riedel, P. Maschmeyer, K. Lehmann, K. Westendorf, M.F. Mashreghi, M. Lohning, M. Mack, A. Radbruch, and H.D. Chang. 2016. T-bet expression by Th cells promotes type 1 inflammation but is dispensable for colitis. *Mucosal immunology* 9:1487-1499.
- Zorzi, F., I. Monteleone, M. Sarra, E. Calabrese, I. Marafini, M. Cretella, S. Sedda, L. Biancone, F. Pallone, and G. Monteleone. 2013. Distinct profiles of effector cytokines mark the different phases of Crohn's disease. *PLoS one* 8:e54562.
- Zundler, S., D. Schillinger, A. Fischer, R. Atreya, R. Lopez-Posadas, A. Watson, C. Neufert, I. Atreya, and M.F. Neurath. 2017. Blockade of alphaEbeta7 integrin suppresses accumulation of CD8(+) and Th9 lymphocytes from patients with IBD in the inflamed gut in vivo. *Gut* 66:1936-1948.

Zuo, T., and S.C. Ng. 2018. The Gut Microbiota in the Pathogenesis and Therapeutics of Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in microbiology* 9:2247.

ANNEXE 1 : DIFFERENTIAL ACCUMULATION AND FUNCTION OF PROINFLAMMATORY 6-SULFO LACNAc DENDRITIC CELLS IN LYMPH NODES AND COLON OF CD AND UC PATIENTS

Differential accumulation and function of proinflammatory 6-sulfo LacNAc dendritic cells in lymph node and colon of Crohn's versus ulcerative colitis patients

Marwa Bsat,* Laurence Chapuy,* Nobuyasu Baba,[†] Manuel Rubio,* Benoit Panzini,[‡] Ramses Wassef,[§] Carole Richard,[§] Genevieve Soucy,[¶] Heena Mehta,* and Marika Sarfati*¹

*Immunoregulation Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada;

[†]Center for Innovative and Translational Medicine, Kochi University Medical School, Kochi, Japan; and Departments of [‡]Gastroenterology,

[§]Digestive Tract Surgery, and [¶]Pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada

RECEIVED OCTOBER 24, 2014; REVISED JUNE 5, 2015; ACCEPTED JUNE 7, 2015. DOI: 10.1189/jlb.5A1014-509RR

ABSTRACT

Human Slan DCs have been studied in patients with psoriasis, rheumatoid arthritis, cancer, and autoimmune diseases. In this study, we investigated the frequency, phenotype, and function of Slan DCs in blood, colon, as well as mLNs of patients with IBD. We first show that the frequency of circulating CD14^{dim}Slan DCs was reduced in CD patients refractory to immunosuppressive drugs or TNF- α blockers relative to untreated CD, UC, and healthy subjects. In blood of CD patients, Slan DCs expressed CD172a, as detected by CD47 fusion protein binding, when compared with its lack of expression in control subjects. Next, we demonstrate that CD172a⁺Slan DCs that produced IL-1 β and TNF- α accumulated in mLNs and colons of CD patients. The CD172a⁺Slan DCs up-regulated their expression of CD14 in CD tissues and the proinflammatory cytokines were produced in CD14^{bright}CD172a⁺Slan DCs. By contrast, no difference was noted in the frequency of Slan DCs between inflamed, noninflamed colonic mucosa of UC patients and control, non-IBD donors. Finally, the percentage of cytokine-producing Slan DCs also augmented in response to TLR2 and NOD2 in *in vitro* stimulation in PBMCs of CD, but not UC, patients. In conclusion, we propose that proinflammatory CD14^{bright}CD172a⁺Slan DCs are a distinguishing feature between CD and UC, as these cells accumulate uniquely in mLNs and colonic mucosa of CD patients. Thus, Slan DCs may contribute to CD immunopathogenesis. *J. Leukoc. Biol.* 98: 671–681; 2015.

Abbreviations: 5-ASA = 5-aminosalicylic acid, CD = Crohn's disease, DC = dendritic cell, GI = gastrointestinal, IBD = inflammatory bowel disease, IHC = immunohistochemistry, LN = lymph node, LPVC = lamina propria mononuclear cell, MDP = muramyl dipeptide, MFI = mean fluorescent intensity, Class II = MHC class II, mLN = mesenteric lymph node, MS = multiple sclerosis, NOD2 = nucleotide oligomerization domain 2, Pam3CSK4 = palmitoyl-3-cysteine-serine-lysine 4, Slan = 6-sulfo N-acetyl-lactosamine, SLE = systemic lupus erythematosus, TLR = Toll-like receptor, UC = ulcerative colitis, Var-1 = variant-1

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

IBDs, which include CD and UC, are common, chronic, relapsing disorders of the GI tract. CD and UC are distinct entities that share clinical characteristics. CD is characterized by patchy inflammatory lesions that can be transmural and affect the entire GI tract, whereas inflammation in UC is continuous, superficial, and restricted to the colon [1].

The pathogenesis of IBD is a complex interplay between the immune system and genetic and environmental factors [2, 3]. The altered immune response to intestinal microbiota leads to chronic inflammation of gut mucosa. This abnormal immune response implicates innate-immune cells, which include DCs and macrophages, T cells, as well as proinflammatory cytokines. Studies have provided evidence that Slan expression on Class II⁺ cells delineates the major circulating DC subset in the blood of healthy individuals, whereas other reports indicated that these cells clustered with CD14^{dim} monocytes [4, 5]. However, Class II⁺CD14^{-/dim}CD16⁺ Slan DCs are distinct from conventional CD1c⁺ DCs, plasmacytoid DCs, and classic CD14^{bright} monocytes in blood [6]. Slan DCs are unique to humans, as their counterpart in mice has not been identified. However, Gros et al. [4] considered Slan DCs as part of the CD16⁺CD14^{dim} monocyte population that displays several genetic similarities to the murine Ly6C^{hi}CX3CR1^{hi} monocyte population. The latter patrols lymphatic vessels and exerts a protective role by attracting neutrophils and clearing debris in response to environmental insults [4]. Furthermore, Slan DCs have been implicated in antiviral responses [4]. However, in the context of pathology, these cells produce proinflammatory cytokines that include IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, and TNF- α and promote Th1/Th17 cell responses [7, 8]. Histologic analysis revealed the presence of Slan DCs in patients with psoriasis, rheumatoid arthritis, CD, SLE, MS, and cancer [5, 7, 9–12].

1. Correspondence: Immunoregulation Laboratory, CRCHUM, Tour Viger (R-12/424/204), 900 St-Denis St. East, Montréal, Québec H2X 0A9, Canada. E-mail: m.sarfati@umontreal.ca

In the present report, we investigated the differential accumulation of Slan DCs in blood, lymphoid tissues, and colonic mucosa of CD and UC patients and evaluated their phenotype and function.

MATERIALS AND METHODS

Human clinical samples

All human subjects signed informed consent forms that have been approved by the Institutional Ethics Research Committee of the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Patients were recruited based on clinical, endoscopic, and histologic criteria (Table 1). CD patients presented with abdominal pain, diarrhea, or weight loss and endoscopically with patchy inflammation, eroded mucosa, deep ulcers, and/or strictures. Histologically, the architecture of the crypts was disturbed; the mucosa was infiltrated by mono- or polynuclear cells, with or without pathognomonic granuloma. Transmural inflammation was confirmed on surgical samples. UC patients presented with abdominal pain, diarrhea, and bleeding, with a continuous and circumferential inflammation of the mucosa. The mucosa was eroded, granular, and friable. Histologically, the architecture of the crypts was disturbed, with mucus depletion and diffuse infiltrate of mono- or polynuclear cells to the mucosa and crypts. No histologic or bacteriological infections suggested a differential diagnosis.

Blood was collected from healthy subjects (control; *n* = 44) and IBD patients (CD = 48, and UC = 14) in tubes coated with heparin. mLNs were

obtained from CD patients and control non-IBD donors (*n* = 20) during surgical resection. Colonic samples were obtained during an endoscopy (*n* = 13) or a surgical resection (*n* = 10) of IBD patients. Macroscopically noninflamed and inflamed mucosa were taken from the same IBD patient. In patients with ileo-colonic CD, only biopsies from the colon were taken for our study.

Cell purification

PBMCs were obtained by density gradient centrifugation of heparinized peripheral blood. The intestinal mucosa, from biopsies or surgical samples, was first processed by enzymatic digestion with DNase I (Roche, Basel, Switzerland) and Collagenase D (Roche), followed by mechanical digestion with gentle MACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) to isolate LPMCs. mLNs, gathered from surgical samples, were digested mechanically to get mLN cell suspensions [13].

Flow cytometry analysis and cell sorting

PBMCs, mLNs, and LPMCs were stained by use of mAb to CD14, CD172b (clone B4B6), CD172ab (clone SE5A5), HLA-DR, IL-1β, and TNF-α (BioLegend, San Diego, CA, USA); CD16 and CD45 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); IL-12/23p40 and IL-23p19 (eBioscience, San Diego, CA, USA); Slan (Miltenyi Biotec); Class II (ID Labs, London, ON, Canada); and Alexa Fluor 647-conjugated CD47Var-1 (Novartis, Basel, Switzerland). Isotype-matched control mAb were used. Data were analyzed with FACSDiva (BD Biosciences).

TABLE 1. Study participant information

Variable	CD	UC	Non-IBD
<i>n</i>	48	14	20
Females, <i>n</i> (%)	29 (60.4)	7 (50)	9 (45)
Age, median (range)	45 (21–76)	39 (17–62)	54 (22–88)
Age at diagnosis			
<16	5	0	
17–40	32	5	
>40	11	9	
Treatment			
None	17	7	
5-ASA alone	6	5	
Thiopurine or methotrexate	14	2	
TNF-α inhibitor	7	1	
Corticosteroid	11	0	
Disease location—CD			
Terminal ileum	0		
Colon	14		
Ileocolonic	34		
Upper GI tract	0		
Disease location—UC			
Proctitis		2	
Left-sided colitis		9	
Pancolitis		3	
Proximal colitis		0	
Disease behavior—CD			
Nonstricturing–Nonpenetrating	30		
Stricturing	13		
Penetrating	5		
Perianal disease	4		
Diagnosis—control			
Colonic neoplasia			7
Cold diverticulitis			4
Screening colonoscopy			9

IHC

Intestinal and mLN tissue sections from CD patients and control donors were treated according to well-established formalin-fixed, paraffin-embedded methods. Tissue sections (4 μ m) were stained with the BenchMark XT autostainer (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA). Antigen retrieval was obtained by use of Cell Conditioning 1 (Ventana Medical Systems) for 60 min. Prediluted DD2 (clone DD2, kindly provided by Dr. Knut Schäkel, University Hospital Heidelberg, Germany) antibody (1:50) was manually added to the slides and incubated at 37°C for 20 min. Reactions were performed by use of the ultraView Alkaline Phosphatase Red detection kit (Ventana Medical Systems). Counterstaining was achieved with hematoxylin and bluing reagent (Ventana Medical Systems). A Leica DM4000B microscope, equipped with a Leica DFC300FX camera, was used to visualize the tissue sections.

Proinflammatory cytokine expression

PBMCs (1×10^6 /ml) were cultured for 24 h in the presence of MDP (1 μ g/ml; InvivoGen, San Diego, CA, USA) and Pam3Csk4 (1 μ g/ml; InvivoGen). For the last 3 h of culture, Brefeldin A (Calbiochem, Billerica, MA, USA) was added. RPMI-1640 medium (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) with 10% FBS (Wisent) and 1% penicillin-streptomycin (Wisent) was used for all cultures. The cells were then fixed for intracytoplasmic staining with anti-IL-1 β , IL-23p19, IL-12/23p40, and TNF- α or isotype-matched control mAb. Ex vivo isolated mLN cell suspensions and LPMCs were immediately stained for CD45, Class II, CD14, Slan, and CD47Var-1 in the absence of Brefeldin A and then fixed/permeabilized and stained for intracytoplasmic cytokine expression.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Paired and unpaired Student's *t* test, Mann-Whitney test, or Wilcoxon signed rank tests were used. Data are shown as means \pm SEM.

Online supplemental material

Frequency of Slan DCs was examined in blood of UC patients. The expression of CD14 and CD172a was examined on Slan DCs in non-IBD mLN, as well as in noninflamed CD colon. The expression of CD14 was examined on cytokine-producing, circulating SlanDCs.

RESULTS

Frequency and phenotype of Slan DCs in the blood of IBD patients

We first quantified Slan DCs in the blood of IBD patients and compared their frequency with that of healthy subjects (control). As expected, Class II⁺ Slan DCs were characterized as bona fide CD16⁺ cells, whereas CD14 monocytes included CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ subsets (Fig. 1A). No difference was seen in the percentage of Slan DCs between control donors and untreated CD patients (Fig. 1B, left). Remarkably, in CD patients with therapeutic failure to immunosuppressive agents and TNF- α blockers, the percentage of circulating Slan DCs was decreased significantly. Notably, CD patients refractory to treatment had a moderate-to-severe disease. In untreated and refractory UC patients, the percentage of circulating Slan DCs was unchanged compared with control donors (Supplemental Fig. 1). Treatment with 5-ASA had no impact on the frequency of Slan DCs in CD patients (Fig. 1B, left). Conversely, 5-ASA, but not immunosuppressive drugs or anti-TNF- α mAb, significantly reduced the percentage of CD14^{bright} monocytes in the same cohort of CD patients (Fig. 1B, right).

Signal regulatory protein α and β (CD172ab) is expressed on circulating monocytes and DCs with the exception of the minor CD141⁺ DC population [13, 14]. Therefore, we examined CD172ab expression by use of an anti-CD172ab mAb (SE5A5) that recognizes the 2 isoforms of CD172 on Slan DCs in the blood of CD patients. As depicted in Fig. 2A and B, Slan DCs that were clearly defined as CD172ab^{dull} clustered with the CD14^{dull} cell population, whereas CD172ab^{bright}Slan⁻ cells corresponded to the CD14^{bright} monocyte population, confirming our previous report [13]. We found that the expression of CD172ab was significantly lower on Slan DCs compared with monocytes in untreated and refractory cohorts of CD patients, as well as control subjects (Fig. 2C, and data not shown). Next, we asked whether the difference in intensity of CD172ab

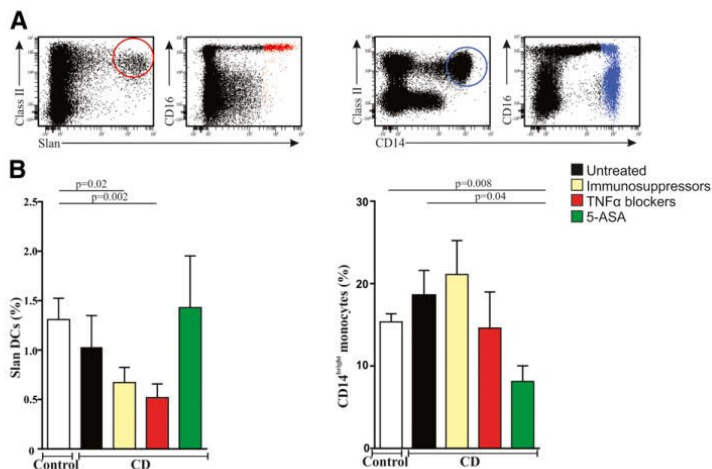


Figure 1. Slan DCs decrease in frequency in the blood of CD patients refractory to treatment. PBMCs, isolated from CD and healthy subjects (control), were stained for CD14, CD16, Class II, and Slan. (A) Representative flow cytometry plot of CD16 expression in Class II⁺Slan⁺ cells (left) and Class II⁺CD14^{bright} cells (right). (B) Percentage of Slan DCs (left) and CD14^{bright} monocytes (right) in healthy (control) subjects ($n = 44$), untreated CD patients ($n = 14$), as well as refractory CD patients to immunosuppressors ($n = 9$), TNF- α -blocker ($n = 8$) and 5-ASA ($n = 5$) treatment. Data are represented as means \pm SEM. Mann-Whitney test was used to assess significance.

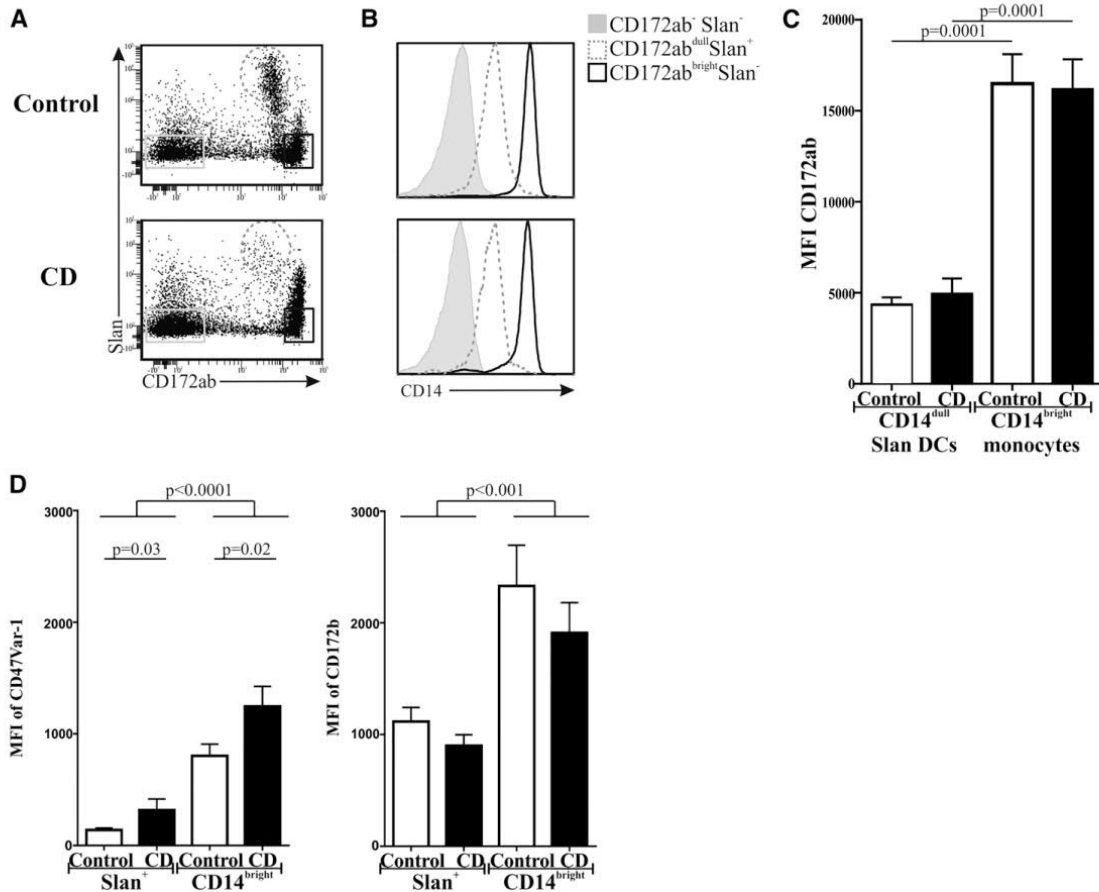


Figure 2. Class II⁺Slan⁺ express CD172a in peripheral blood of CD patients. PBMCs, isolated from CD patients and healthy subjects (control), were stained for CD172ab, CD172a, CD172b, CD14, Class II, and Slan. (A) Representative flow cytometry plot of CD172ab expression in relation to Slan on Class II⁺ gated cells. (B) Representative flow cytometry histograms of CD14 expression on the CD172ab^{dull}Class II⁺Slan⁺ (gray, dashed lines), CD172ab^{bright}Class II⁺Slan⁺ (black lines), and CD172ab^{bright}Class II⁻Slan⁻ (gray-filled histograms). (C) Mean MFI of CD172ab (control *n* = 33; CD *n* = 36). (D) Mean MFI of CD47Var-1 (control *n* = 25; CD *n* = 21) and CD172b (control *n* = 16; CD *n* = 13) on Slan⁺ and CD14^{bright} cells. Data are represented as means ± SEM. Paired as well as unpaired Student's *t* test and Mann-Whitney test were used to assess significance.

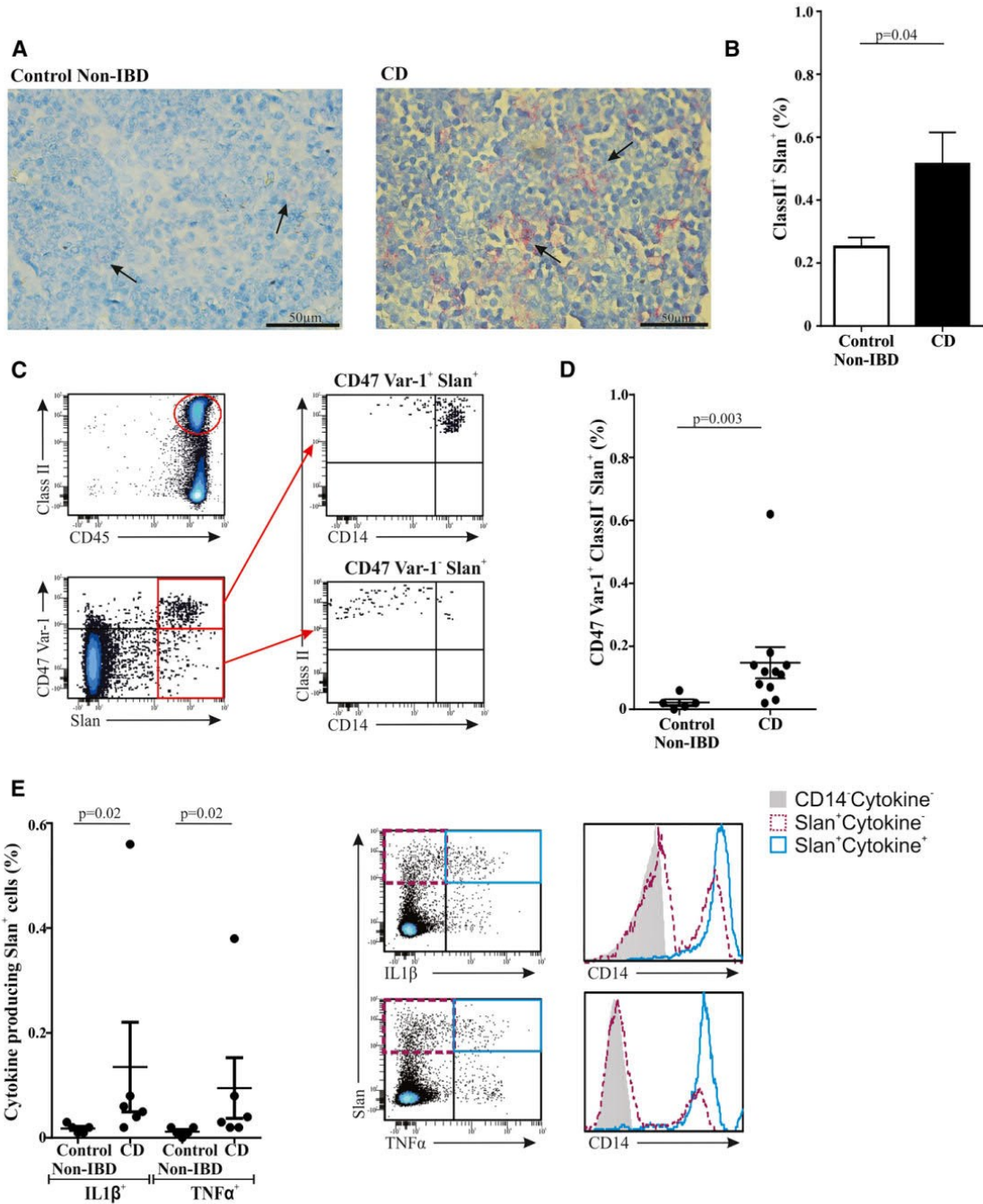
expression, observed between Slan DCs and monocytes, results from their differential expression of CD172a and CD172b. To this end, we used CD47Var-1, an avidity-improved CD47 fusion protein that binds CD172a but not CD172b, and anti-CD172b mAb, which selectively identifies CD172b [13]. The CD172b expression was significantly lower on Slan DCs compared with the CD14^{bright} monocyte population, as depicted by the MFI, with no difference in the level of expression between CD and control donors (Fig. 2D). As reported previously, CD47Var-1 binding was up-regulated on CD14^{bright} monocytes (*P* = 0.02) in CD patients relative to control donors, but CD47Var-1 failed to bind circulating Slan DCs in healthy donors [13]. By contrast, the binding to CD47Var-1, thus CD172a expression, was

significantly detected on Slan DCs in CD patients (*P* = 0.03; Fig. 2D).

We conclude that Slan DCs express CD172a in the blood of CD patients and decrease in frequency in CD, but not UC, patients refractory to immunosuppressive agents and TNF- α blockers.

CD14^{bright}CD47Var-1⁺ Slan DCs accumulate in the mLNs of CD patients and produce IL-1 β and TNF- α

Vermi et al. [10] recently reported an accumulation of Slan DCs in the metastatic, tumor-draining LNs of carcinoma patients. However, these cells were undetectable in LNs showing non-specific lymphadenitis. Although technically challenging to access, we searched for and detected, for the first time, Slan DCs



(continued on next page)

by IHC in inflamed mLNs of CD patients (Fig. 3A). By contrast, they were rarely observed in mLNs of control non-IBD donors that included cold diverticulitis patients. In CD patients, Slan DCs had a stellate shape and were scattered in the T and B cell areas of the disorganized mLNs (data not shown). Next, we quantified Class II⁺Slan DCs by flow cytometry in mLNs freshly collected from CD and non-IBD patients undergoing surgery (Table 1). Surgical samples were obtained from CD patients refractory to drug therapy (8 out of 10). We found a significant increase in the percentage of Slan DCs in CD compared with the control patients group, which included carcinoma, as well as cold diverticulitis non-IBD donors (Fig. 3B). Next, we gated on CD45⁺Class II⁺ cells and determined CD47Var-1 binding on Slan DCs in CD mLNs. Slan DCs were identified as CD47Var-1⁺ cells that are CD14^{bright} and CD47Var-1⁻ cells that have a low expression of CD14 (Fig. 3C). The frequency of CD47Var-1⁺Slan DCs was augmented significantly in the mLNs of CD compared with control non-IBD donors (Fig. 3D). Notably, the CD14^{dull/-}CD47Var-1⁺Slan⁺ population predominated in mLNs from control patients (Supplemental Fig. 2A). These data indicate that CD14^{bright}CD47Var-1⁺Slan DCs accumulate in the mLN of CD patients. Finally, cytokine production was examined *ex vivo* in 6 CD versus 5 non-IBD mLNs. The frequency of IL-1 β - and TNF- α -producing Slan DCs was significantly higher in CD than in control patients (Fig. 3E). Notably, the large majority of cytokine-producing Slan DCs was CD14^{bright}, thus CD47Var-1⁺, compared with the IL-1 β ⁻ or TNF- α ⁻ Slan DCs that were mainly CD47Var-1⁻ CD14^{dull} cells (Fig. 3C and E).

Taken collectively, IL-1 β - and TNF- α -producing CD14^{bright}CD172a⁺ Slan DCs accumulate in mLNs of CD patients.

CD14^{bright}CD47Var-1⁺ Slan DCs accumulate in the inflamed colonic tissue of CD, but not UC, patients and produce IL-1 β and TNF- α

Next, we quantified Slan DCs in CD and UC patients by flow cytometry; inflamed and noninflamed colonic mucosa from the same patient were compared. A significant increase in the percentage of Slan DCs was detected in inflamed compared with noninflamed tissue of CD ($n = 4$ biopsies; $n = 7$ surgeries), but not UC ($n = 5$ biopsies; $n = 1$ surgery), patients (Fig. 4A). As no difference in the frequency of Slan DCs was noted in colonic mucosa of UC, we focused on colonic data obtained from CD patients only. First, we confirmed the presence of Slan DCs by use of IHC in the inflamed colonic mucosa of CD (Fig. 4B, lower), corroborating earlier reports [9, 11]. We showed an

accumulation of Slan DCs in the apical part of villi in inflamed CD tissue. These cells were seen infiltrating the deeper layers of inflamed mucosa. In control tissue, Slan DCs were sometimes detected in isolated lymphoid follicles (data not shown) but were virtually absent from the mucosa itself (Fig. 4B, upper).

Next, we examined the expression of CD14 and CD172a on Slan DCs in CD45⁺Class II⁺ cell population. Similar to our mLN data, we found 2 populations of Slan DCs in inflamed CD mucosa: CD14^{bright}CD47Var-1⁺ and CD14^{-/dull}CD47Var-1⁻ cells (Fig. 4C). Note that the CD14^{bright}CD47Var-1⁺Slan⁺ population was also detected in noninflamed CD colons (Supplemental Fig. 2B). As a consequence, the frequency of CD47Var-1⁺Slan DCs (Fig. 4D), as well as CD14^{bright}Slan DCs (Fig. 4E), was increased significantly in inflamed CD colon compared with colonic mucosa of control non-IBD donors but not noninflamed colon of CD patients. These data indicate that as in mLNs, Slan DCs expressed CD172a, and the frequency of CD14^{bright}Slan DCs increased in the colon of CD patients.

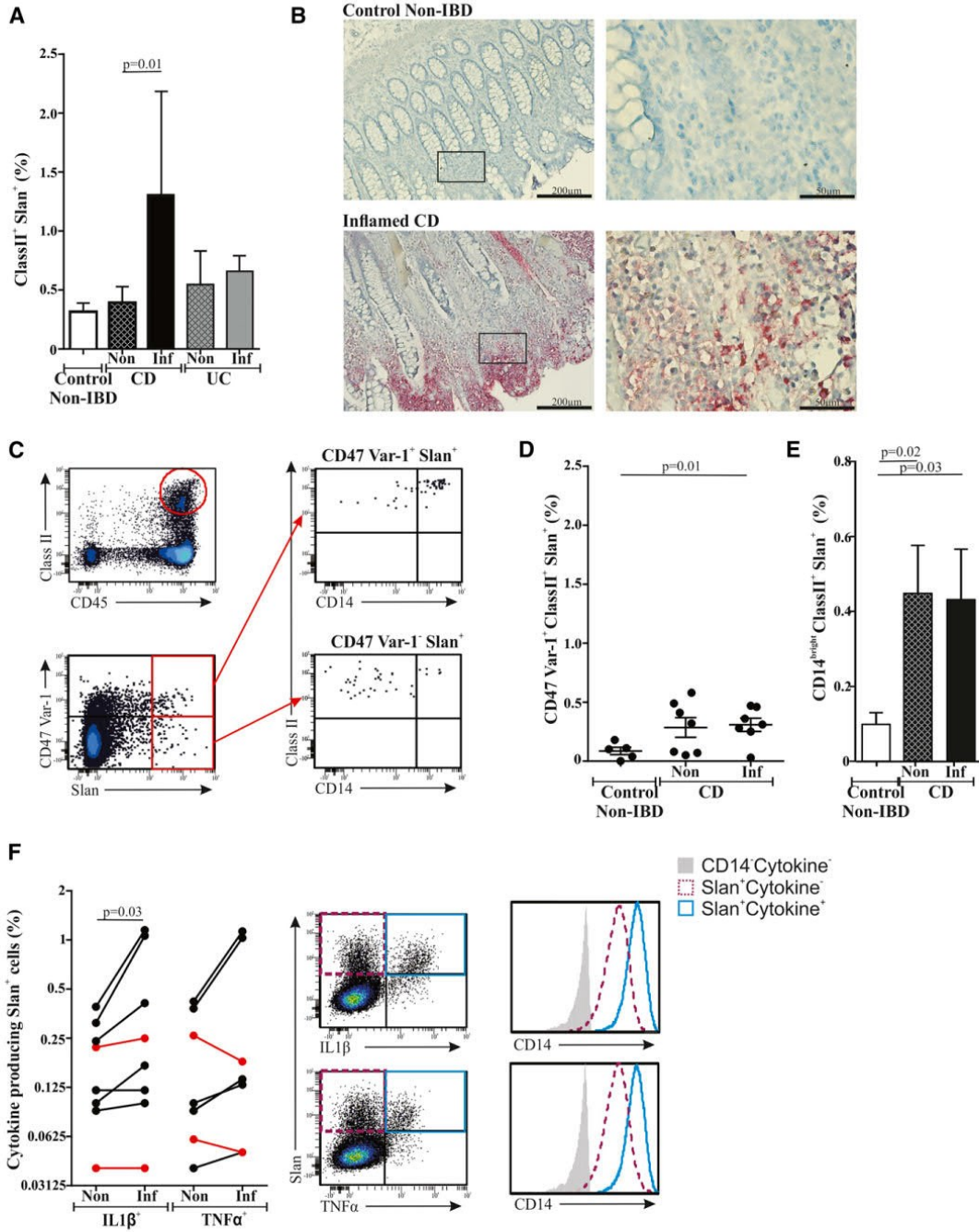
The accumulation of Slan DCs seen in the inflamed CD mucosa was associated, as in mLNs, with a spontaneous increase in their proinflammatory cytokine production (Fig. 4F). In fact, *ex vivo* examination of LPMC from CD showed a significant increase in the percentage of IL-1 β ⁺Slan DCs in inflamed, relative to noninflamed, tissue. Furthermore, the frequency of TNF- α -producing Slan DCs also showed a trend toward an increase. In fact, whenever patients treated with anti-TNF- α mAb (red symbols) are excluded from the cohort analysis, the increase in percentage of TNF- α ⁺Slan DCs was significant in inflamed CD mucosa. Similar to mLNs, the cytokine-producing Slan DCs were CD14^{bright}.

In CD patients, Slan DCs that accumulate in the colonic tissue resemble those found in mLNs of CD patients in terms of their phenotype and cytokine profile.

Increased frequency of cytokine-producing Slan DCs, but not CD14^{bright} monocytes, in *in vitro*-stimulated PBMC of CD patients

Slan DCs produce proinflammatory cytokines *ex vivo* in colon and LNs from CD patients. We also investigated the function of circulating Slan DCs in IBD patients versus healthy subjects in response to NOD2 and TLR2 *in vitro* stimulation. To this end, PBMCs from CD, UC, and control donors were stimulated with MDP and Pam3Csk4, and the production of various cytokines was assessed among Slan DCs by intracytoplasmic staining. MDP and Pam3Csk4 are NOD2 and TLR2 stimuli, respectively, that are known to mimic colonic microbiota [15]. The overall cytokine

Figure 3. CD14^{bright}CD172a⁺Slan DCs accumulate in the mLNs of CD patients and produce IL-1 β and TNF- α . (A) DD2⁺ Slan cells are detected in the mLN of CD (right) but not non-IBD (left) patients. One representative staining out of 5 is shown. (B–E) Freshly isolated mLNs from CD patients and non-IBD control donors were stained for CD47Var-1, CD14, CD45, Class II, and Slan. (B) Percentage of Class II⁺Slan⁺ among CD45⁺ cells ($n = 6$ non-IBD control patients; $n = 10$ CD patients). (C) Representative gating strategy showing the CD47Var-1^{+/+}Slan⁺ population among Class II⁺CD45⁺ cells in mLN of CD patients. The expression of CD14 is represented on Slan⁺ populations. (D) Percentage of CD47Var-1⁺Class II⁺Slan DCs ($n = 5$ non-IBD control patients; $n = 11$ CD patients). (E) Freshly isolated mLNs were stained intracytoplasmically for IL-1 β and TNF- α . Percentage of IL-1 β ⁺Slan⁺ and TNF- α ⁺Slan⁺ cells in control ($n = 5$) versus CD ($n = 6$) patients. Flow cytometry histograms of CD14 staining on the Slan⁺cytokine⁻ (purple, dashed lines), Slan⁺cytokine⁺ (blue lines), and CD14⁻cytokine⁻ (gray-filled histograms) populations. Data are represented as means \pm SEM. Mann-Whitney test was used to assess significance.



(continued on next page)

production in Slan DCs was higher in response to the combined stimuli than when MDP and Pam3Csk4 were added separately (data not shown). In vitro stimulation increased the percentage of IL-1 β ⁺ and TNF- α ⁺ Slan DCs in CD as well as UC patients (Fig. 5A). As depicted in Fig. 5B, the frequency of TNF- α , IL-23p19-, and IL-12/23p40-producing Slan DCs was significantly higher in CD compared with UC patients and control donors, reflecting the increase in the percentage of Slan DCs that produce cytokines seen in stimulated PBMCs. The percentage of IL-1 β ⁺ Slan⁺ cells tended to augment in CD compared with control and UC patients. Similar to data in mLN and colonic mucosa, the cytokine-producing Slan DCs have a higher expression of CD14 (Supplemental Fig. 3). Finally, this differential cytokine production between IBD and control donors was not noted for the CD14^{bright} monocyte population (Fig. 5C).

Taken together, the frequency of circulating proinflammatory, cytokine-producing Slan DCs, in response to in vitro stimulation with TLR2 and NOD2 agonists, is higher in CD relative to UC patients.

DISCUSSION

Our present study revealed an increased frequency of IL-1 β - and TNF- α -producing Slan DCs in the mLNs of CD patients relative to mLNs of non-IBD donors. Furthermore, proinflammatory Slan DCs accumulated in inflamed colons of CD, but not UC, patients. The accumulation of Slan DCs in peripheral tissues was associated with a significant reduction in the frequency of circulating Slan DCs in CD patients refractory to immunosuppressive agents or TNF- α -blocker treatment, relative to untreated CD, UC, or healthy subjects. These data suggest that Slan DCs have been recruited to inflamed CD, but not UC, tissues and thus, may contribute to the local inflammatory process in CD.

The accumulation of Slan DCs in inflammatory or autoimmune diseases provokes the hypothesis that these cells are implicated in disease immunopathogenesis. Quantification by IHC revealed an increased frequency of Slan DCs in the dermis of SLE patients [16], as well as in inflammatory demyelinating brain lesions and cerebrospinal fluid of patients with MS [12]. As observed in CD patients, Slan DCs accumulated in highly active lesions compared with less-inflamed tissues in SLE and MS patients. However, a similar percentage of circulating Slan DCs was observed between untreated SLE and MS patients and healthy subjects, in agreement with our data in untreated IBD

patients. These observations suggest that disease severity is better correlated with the frequency of Slan DCs in tissue rather than in blood, with the exception of psoriatic disease, in which the number of Slan DCs is increased in both active plaques and blood [7].

Furthermore, the impact of therapeutic drugs on the frequency of circulating Slan DCs does not necessarily reflect the clinical outcomes of the patients. Administration of anti-TNF- α mAb (Adalimumab) in psoriasis patients improves disease and decreases the numbers of Slan DCs in dermis, as well as in blood, with no induction of Slan DC apoptosis [17]. By contrast, successful treatment of psoriatic patients with soluble TNF- α R (Etanercept) reduces the number of Slan DCs in resolved lesions, while augmenting their frequency in blood, suggesting an impaired migratory activity of Slan DCs to tissue in responder patients [8]. Finally, long-term therapy with IFN- β , but not with Natalizumab (anti- α 4 β 1), significantly reduced the frequency of circulating Slan DCs in MS patients with remitting-relapsing stable disease [12]. Our present study established that the percentage of Slan DCs significantly decreased in the blood but accumulated in inflamed colonic mucosa and mLNs of CD patients refractory to treatment. The latter further highlights the importance of examining, whenever feasible, tissues rather than PBMCs to evaluate the potential contribution of cells to disease process and the impact of drug therapy.

With the use of flow cytometry, we detected and quantified for the first time Slan DCs in mLN of CD patients. Slan DCs were rarely observed in noninflamed mLNs of non-IBD donors, corroborating their paucity in LN and spleen by use of IHC [11]. Their increased percentage in LNs relates to their previously reported functions: priming of naïve T cells and induction of Th17/Th1 response [7], a hallmark of CD pathogenesis [1]. Slan DCs are endowed with reverse-migratory properties, suggesting that they travel from the tissue, where they are in contact with the antigen, to LNs, to encounter naïve T cell population [18]. However, Slan DCs could also make their journey to the mLNs, arriving directly from the blood. This is strongly suggested in carcinoma patients, where Slan DCs were not present within the primary carcinomas, but an increase in their frequency was noted in the metastatic tumor draining LN [10]. C5a, CXCL12, and CX3CL1 are involved in the migration of Slan DCs to psoriatic plaques and possibly to metastatic LNs [7]. Furthermore, CD16 expression provides Slan DCs with the capacity to handle immune complexes [19], and the latter are shown to promote

Figure 4. CD14^{bright}CD172a⁺Slan DCs accumulate in the inflamed colonic tissue of CD, but not UC, patients and produce IL-1 β and TNF- α . LPMCs were isolated from the inflamed (Inf) and noninflamed (Non) colonic mucosa of CD ($n = 11$, which included 4 biopsies) and UC ($n = 6$, which included 5 biopsies) patients and compared with non-IBD (control) patients ($n = 6$). (A) Frequency of Class II⁺Slan DCs among CD45⁺ cells. (B) DD2⁺ Slan cells are concentrated at the apical part of villi in CD colonic sections. One representative staining out of 5 is shown. (C) Freshly isolated LPMCs from noninflamed and inflamed CD patients and healthy control donors were stained for CD47Var-1, CD14, CD45, Class II, and Slan. Representative flow cytometry plot depicting the CD47Var-1⁺Slan⁺ population among Class II⁺CD45⁺ cells in inflamed LPMCs of CD patients. The expression of CD14 is depicted on Slan⁺ populations. (D) Percentage of CD47Var-1⁺Class II⁺Slan DCs ($n = 5$ non-IBD control patients; $n = 7$ CD patients). (E) Percentage of CD14^{bright}Class II⁺Slan DCs ($n = 5$ non-IBD control patients; $n = 7$ CD patients). (F) Freshly isolated LPMCs were stained ex vivo for IL-1 β and TNF- α by intracytoplasmic staining. The percentage of cytokine-producing Slan⁺ cells in inflamed versus noninflamed tissue of CD patients ($n = 8$) is depicted. Patients undergoing anti-TNF- α treatment at the time of sample collection are represented by red symbols. Flow cytometry histograms of CD14 staining on the Slan⁺cytokine⁻ (purple, dashed lines), Slan⁺cytokine⁺ (blue lines), and CD14⁺cytokine⁻ (gray-filled histograms) populations. Data are represented as means \pm SEM. Paired and unpaired Student's t tests, Mann-Whitney test, and Wilcoxon signed rank tests were used to assess significance.

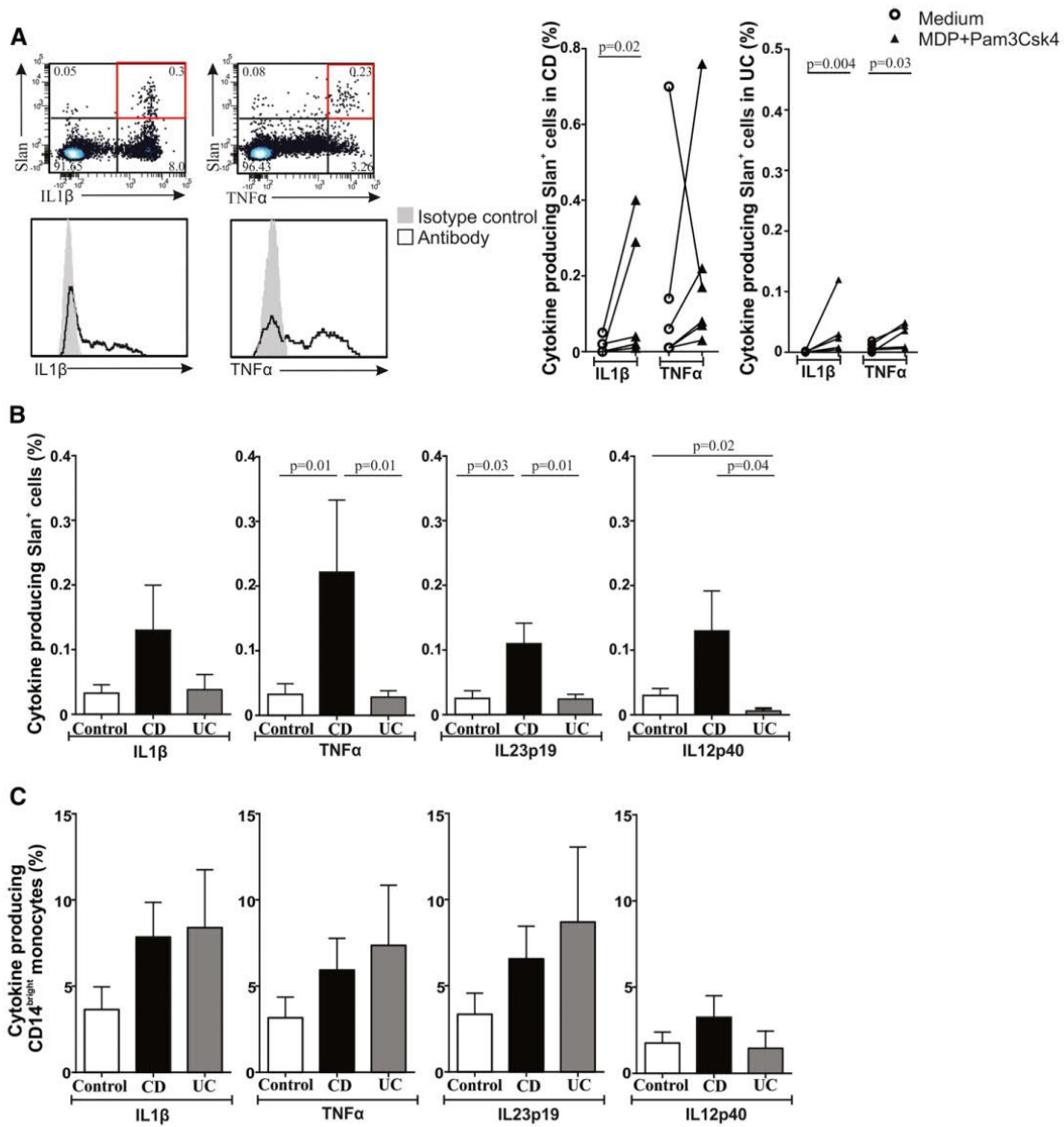


Figure 5. Increased frequency of cytokine-producing Slan DCs, but not CD14^{bright} monocytes, in in vitro-stimulated PBMC of CD patients. PBMCs were stimulated for 24 h with MDP and Pam3Csk4. Brefeldin A was added for the last 3 h. (A) Representative flow cytometry dot plot showing the Slan⁺IL-1β⁺ and Slan⁺TNF-α⁺ among PBMCs. Flow cytometry histograms of IL-1β and TNF-α (black lines) and their respective isotype controls (gray-filled histograms) on the Slan⁺ population. Percentage of IL-1β- and TNF-α-producing Slan DCs in PBMC of CD (*n* = 6) and UC (*n* = 5) patients in MDP + Pam3Csk4 (closed triangles) versus medium (open circles) conditions. (B) Percentage of IL-1β⁺, TNF-α⁺, IL-23p19⁺, and IL-12/23p40⁺ Slan DCs in stimulated PBMCs of CD (*n* = 6) and UC (*n* = 5) patients and healthy subjects (*n* = 4 control). (C) Percentage of IL-1β⁺, TNF-α⁺, IL-23p19⁺, and IL-12/23p40⁺ CD14^{bright} monocytes in stimulated PBMCs of CD (*n* = 6) and UC (*n* = 5) patients and healthy subjects (*n* = 4 control). Data are represented as means ± SEM. Mann-Whitney and Wilcoxon signed rank tests were used to assess significance.

CCR7-dependent DC migration to LNs in mice [20]. However, the mechanisms that govern the selective accumulation of Slan DCs to inflamed CD mLNs, as well as in colon of CD, but not UC, patients, warrant further investigation.

Two opposite functions are attributed to Slan DCs. These cells display protective or proinflammatory properties. Proinflammatory cytokine production of circulating Slan DCs was established in psoriatic and SLE patients, following stimulation with ligands that bind to TLR2, -4, -7, and -8 [7, 16, 21]. In the present study, we evaluated the proinflammatory properties of Slan DCs in IBD patients. On one hand, Slan DCs that spontaneously secrete IL-1 β and TNF- α after ex vivo isolation significantly accumulated in mLNs, as well as in inflamed colons of CD patients. On the other hand, the percentage of IL-1 β , TNF- α , as well as IL-23p19 and IL-12/23p40 cytokine-producing Slan DCs in response to in vitro stimulation was highest in blood of CD patients compared with that of UC and healthy subjects. In fact, the augmentation of cytokine production observed in Slan DCs largely results from an increase in the percentage of cytokine-producing cells and not in the cytokine-producing capacity of each cell (data not shown). Notably, the clinical response to Etanercept in psoriasis appears to be more related to a reduction in the percentage of cytokine-producing Slan DCs in the dermis than to the decreased ability of these cells to secrete TNF- α or IL-23p19 [8].

Proinflammatory cytokines were mainly produced in Slan DCs that expressed CD172a and had up-regulated CD14 expression in blood, mLN, and colon, i.e., the CD14^{bright}CD172a⁺ Slan DCs. Our previous study revealed that proinflammatory cytokine production is restricted to the CD47Var-1⁺ cells in mLNs, as well as colonic mucosa of CD patients [13]. These CD47Var-1⁺ cells in CD colons constitute a heterogeneous population that comprises the minor Slan DCs and other DCs, as well as macrophage subsets that remain to be characterized further. Although Slan expression was described on CD14⁺CD163⁺ and CD14⁺CD163^{dim} APC subsets in normal colonic mucosa of colorectal cancer patients [22], Slan DCs were CD11c⁺CD163⁻ in inflamed CD colons (data not shown), in agreement with their phenotype reported in skin [21]. Notably, exposure of inflamed colonic tissue explants to CD47Var-1 suppresses the release of proinflammatory cytokines that include IL-1 β , TNF- α , IL-12, and IL-23 [13]. Furthermore, administration of CD47-Fc fusion protein in mice prevents the relapse of experimental colitis, which correlated with impaired DC recruitment to mLNs, as well as decreased proinflammatory cytokine expression in tissues [23, 24]. As such, the targeting of CD172a by use of CD47-Fc might alter the cytokine-producing capacity as well as recruitment of Slan DCs into tissues in CD patients.

In conclusion, we demonstrate that proinflammatory CD14^{bright}CD172a⁺Slan DCs accumulate in mLNs and colons of CD. As our data did not reveal a role for Slan DCs in UC, we propose that Slan DCs may uniquely contribute to CD immunopathogenesis.

AUTHORSHIP

M.B., L.C., M.R., N.B., and H.M. carried out the studies and data analyses. B.P., R.W., C.R., and G.S. provided the biopsies and

surgeries. M.B. drafted the manuscript. M.S. conceived of the study and participated in its design, coordination, and writing of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants from Canadian Institutes for Health and Research (CIHR) and Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal. The authors thank Carole Bergeron, R.N., for her help in obtaining the surgical samples and the Histology Department in the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal for its technical assistance with the IHC studies.

DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES


- Kaser, A., Zeissig, S., Blumberg, R. S. (2010) Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 573–621.
- Maloy, K. J., Powrie, F. (2011) Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 298–306.
- MacDonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C., Monteleone, G. (2011) Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* **140**, 1768–1775.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010) Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* **33**, 375–386.
- Schäkel, K., von Kietzell, M., Hänsel, A., Ebling, A., Schulze, L., Haase, M., Semmler, C., Sarfati, M., Barclay, A. N., Randolph, G. J., Meurer, M., Rieber, E. P. (2006) Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* **24**, 767–777.
- Schäkel, K., Kannagi, R., Kniep, B., Goto, Y., Mitsuoka, C., Zwirner, J., Soruri, A., von Kietzell, M., Rieber, E. (2002) 6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells. *Immunity* **17**, 289–301.
- Hänsel, A., Günther, C., Ingwersen, J., Starke, J., Schmitz, M., Bachmann, M., Meurer, M., Rieber, E. P., Schäkel, K. (2011) Human slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells are inflammatory dermal dendritic cells in psoriasis and drive strong TH17/TH1 T-cell responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 787–794.e1–9.
- Günther, C., Blau, K., Förster, U., Viehweg, A., Wozel, G., Schäkel, K. (2013) Reduction of inflammatory slan (6-sulfo LacNAc) dendritic cells in psoriatic skin of patients treated with etanercept. *Exp. Dermatol.* **22**, 535–540.
- Costantini, C., Calzetti, F., Perbellini, O., Micheletti, A., Scarponi, C., Lonardi, S., Pelletier, M., Schakel, K., Pizzolo, G., Facchetti, F., Vermi, W., Albanesi, C., Cassatella, M. A. (2011) Human neutrophils interact with both 6-sulfo LacNAc⁺ DC and NK cells to amplify NK-derived IFN γ : role of CD18, ICAM-1, and ICAM-3. *Blood* **117**, 1677–1686.
- Vermi, W., Micheletti, A., Lonardi, S., Costantini, C., Calzetti, F., Nascimbeni, R., Bugatti, M., Codazzi, M., Pinter, P. C., Schäkel, K., Tamassia, N., Cassatella, M. A. (2014) slanDCs selectively accumulate in carcinoma-draining lymph nodes and marginate metastatic cells. *Nat. Commun.* **5**, 3029.
- De Baey, A., Mende, I., Baretton, G., Greiner, A., Hartl, W. H., Baeuerle, P. A., Diepolder, H. M. (2003) A subset of human dendritic cells in the T cell area of mucosa-associated lymphoid tissue with a high potential to produce TNF- α . *J. Immunol.* **170**, 5089–5094.
- Thomas, K., Dietze, K., Wehner, R., Metz, I., Tumani, H., Schultheiss, T., Günther, C., Schakel, K., Reichmann, H., Bruck, W., Schmitz, M., Ziemssen, T. (2014) Accumulation and therapeutic modulation of 6-sulfo LacNAc(+) dendritic cells in multiple sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **1**, e33.
- Baba, N., Van, V. Q., Wakahara, K., Rubio, M., Fortin, G., Panzini, B., Soucy, G., Wassef, R., Richard, C., Tamaz, R., Lahaie, R., Bernard, E. J., Caussignac, Y., Leduc, R., Loughnath, R., Bergeron, C., Racicot, M. A., Bergeron, F., Panzini, M. A., Demetter, P., Franchimont, D., Schäkel, K., Weckbecker, G., Kolbinger, F., Heusser, C., Huber, T., Welzenbach, K.,

- Sarfati, M. (2013) CD47 fusion protein targets CD172a⁺ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1 β and TNF. *J. Exp. Med.* **210**, 1251–1263.
14. Watchmaker, P. B., Lahl, K., Lee, M., Baumjohann, D., Morton, J., Kim, S. J., Zeng, R., Dent, A., Ansel, K. M., Diamond, B., Hadeiba, H., Butcher, E. C. (2014) Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* **15**, 98–108.
 15. Brain, O., Owens, B. M., Pichulik, T., Allan, P., Khatanzas, E., Leslie, A., Steevens, T., Sharma, S., Mayer, A., Catuneanu, A. M., Morton, V., Sun, M. Y., Jewell, D., Coccia, M., Harrison, O., Maloy, K., Schönefeldt, S., Bornschein, S., Liston, A., Simmons, A. (2013) The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release. *Immunity* **39**, 521–536.
 16. Hänsel, A., Günther, C., Baran, W., Bidier, M., Lorenz, H. M., Schmitz, M., Bachmann, M., Döbel, T., Enk, A. H., Schäkel, K. (2013) Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells have molecular and functional features of an important pro-inflammatory cell type in lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* **40**, 1–8.
 17. Brunner, P. M., Koszik, F., Reiningger, B., Kalb, M. L., Bauer, W., Stingl, G. (2013) Infliximab induces downregulation of the IL-12/IL-23 axis in 6-sulfo-LacNAc (slan)⁺ dendritic cells and macrophages. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1184–1193.e8.
 18. Randolph, G. J., Sanchez-Schmitz, G., Liebman, R. M., Schäkel, K. (2002) The CD16(+) (Fc γ RIII⁺) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* **196**, 517–527.
 19. Döbel, T., Kunze, A., Babatz, J., Tränkner, K., Ludwig, A., Schmitz, M., Enk, A., Schäkel, K. (2013) Fc γ RIII (CD16) equips immature 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells (slanDCs) with a unique capacity to handle IgG-complexed antigens. *Blood* **121**, 3609–3618.
 20. Clatworthy, M. R., Aronin, C. E., Mathews, R. J., Morgan, N. Y., Smith, K. G., Germain, R. N. (2014) Immune complexes stimulate CCR7-dependent dendritic cell migration to lymph nodes. *Nat. Med.* **20**, 1458–1463.
 21. Günther, C., Starke, J., Zimmermann, N., Schäkel, K. (2012) Human 6-sulfo LacNAc (slan) dendritic cells are a major population of dermal dendritic cells in steady state and inflammation. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**, 169–176.
 22. Ogino, T., Nishimura, J., Barman, S., Kayama, H., Uematsu, S., Okuzaki, D., Osawa, H., Haraguchi, N., Uemura, M., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Takeda, K., Doki, Y., Mori, M. (2013) Increased Th17-inducing activity of CD14⁺ CD163⁺ low myeloid cells in intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **145**, 1380-1391.e1.
 23. Van, V. Q., Lesage, S., Bouguermouh, S., Gautier, P., Rubio, M., Levesque, M., Nguyen, S., Galibert, L., Sarfati, M. (2006) Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J.* **25**, 5560–5568.
 24. Fortin, G., Raymond, M., Van, V. Q., Rubio, M., Gautier, P., Sarfati, M., Franchimont, D. (2009) A role for CD47 in the development of experimental colitis mediated by SIRP α +CD103⁻ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1995–2011.

KEY WORDS:
inflammatory bowel diseases · human · CD172 · CD47 · cytokines

Annexe 2 : Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease

Recruitment of activated neutrophils correlates with disease severity in adult Crohn's disease

A. Therrien,^{*,†} L. Chapuy,^{*} M. Bsai,^{*}
M. Rubio,^{*} G. Bernard,^{*}
E. Arslanian,[‡] K. Orlicka,[†]
A. Weber,[†] B.-P. Panzini,[†] J. Dorais,[†]
E.-J. Bernard,[†] G. Soucy,[‡] M. Bouin[†]
and M. Sarfati  ^{*,†}

^{*}Immunoregulation Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, [†]Department of Medicine, Division of Gastroenterology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, and [‡]Department of Pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, Quebec Canada.

Accepted for publication 12 October 2018

Correspondence: M. Sarfati, Centre de Recherche du CHUM (R-12 424), Tour Viger, 900 Saint-Denis Street, Montréal, Quebec H2X 0A9, Canada.
E-mail: m.sarfati@umontreal.ca

Summary

Neutrophils are detected in inflamed colon in Crohn's disease (CD). However, whether the frequency and/or activation of circulating or gut tissue neutrophils correlate with endoscopic severity remains to be investigated. A cohort of 73 CD patients was prospectively enrolled according to endoscopic severity and treatment history. Individuals with active disease were stratified using the Montreal classification. Harvey-Bradshaw Index (HBI) and Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) were performed at the time of ileocolonoscopy. Frequency of neutrophils and their expression of CD66b and CD64 were assessed in paired blood and colonic biopsies using flow cytometry. The percentage of neutrophils increased in inflamed colon and correlated with SES-CD in the entire cohort of patients examined, as well as in the subgroup with inflammatory (B1) active disease. SES-CD further correlated with neutrophil CD66b expression in mucosa but not blood and, conversely, with neutrophil CD64 expression in blood but not mucosa. However, the evaluation of neutrophil activation in mucosa when compared to blood reflected disease activity more clearly. Finally, a neutrophil activation power index (CD66b in mucosa X CD64 in blood) that correlated with SES-CD discriminated between patients with mild and severe disease. In conclusion, the frequency and activation of colonic neutrophils correlated with SES-CD, highlighting that mucosal neutrophils are associated with disease severity in CD.

Keywords: Crohn's disease, CD64, CD66b, neutrophil, SES-CD

Introduction

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory bowel disease with increasing prevalence worldwide [1]. The disease is characterized by discontinuous macroscopic and microscopic inflammation that involves innate and adaptive immune cell responses [2]. Neutrophil infiltration in the colonic mucosa correlates with endoscopic severity in ulcerative colitis (UC), while their implication remains to be investigated in CD [3,4]. The correlation between disease severity and accumulation and/or activation of neutrophils remains unclear in adult CD patients.

The search for biomarkers to assess disease activity and severity in CD is an area of intense investigation. CD66b is a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchored glycoprotein weakly expressed on resting neutrophils, which is up-regulated under inflammatory conditions on neutrophils as well as eosinophils by N-formyl-Met-Leu-Phe

(fMLP) [5,6]. CD64 (FcγRI) is a member of the immunoglobulin (Ig)G receptor family, and cross-linking with IgG triggers phagocytosis and respiratory burst [7,8]. CD64 expression on peripheral blood neutrophils correlated with endoscopic severity in a pediatric cohort of CD patients [9]. Although CD64 and CD66b could be markers of activated neutrophils in CD, the correlation between their expression and endoscopic disease severity in adult CD remains unknown [10].

To the best of our knowledge, no single-cell analysis study has been performed to examine the correlation between endoscopic scoring and distribution and activation of neutrophils simultaneously in blood and mucosa in a cohort of adult CD patients. In this prospective study, we found that activated neutrophils are recruited to the inflamed colon. Furthermore, their frequencies and activation correlate with endoscopic disease severity (SES-CD).

Materials and methods

Patient population

This study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the local Research Ethics Committee at Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Written informed consent was obtained from each participant and all samples and analyses were anonymized. We prospectively enrolled patients affected by CD ($n = 73$) at the time of their ileocolonoscopy at Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) from November 2015 to December 2017. We included patients aged 18 years and older with either active or quiescent ileocolonic or colonic Crohn's disease. Patients were recruited at the time of diagnosis, during a flare or a follow-up ileocolonoscopy. CD was either previously diagnosed or confirmed according to standard endoscopic and histopathological criteria [2,11]. We established our recruitment strategy according to endoscopic disease activity and treatment history. Five groups of CD patients were stratified accordingly: (1) newly diagnosed CD, (2) active CD and no treatment in the last month, (3) active CD in spite of non anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy [5-aminosalicylic acid (5ASA), immunomodulators, prednisone], (4) active CD in spite of anti-TNF therapy (anti-TNF alone or combined with an immunomodulator) and (5) CD patients in clinical and endoscopic remission (inactive disease). Each group included approximately 15 participants. A cohort of healthy donors was created as controls (asymptomatic individuals undergoing colorectal cancer screening colonoscopy).

We excluded any patient with suspicion of bacterial or viral intestinal infection and other autoimmune conditions (primary sclerosing cholangitis, primary biliary cholangitis, celiac disease). We also excluded CD patients with exclusive ileal involvement, incomplete colonoscopy and/or treated with vedolizumab and ustekinumab.

Disease characterization

Harvey-Bradshaw Index (HBI) and Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) were performed at the time of blood and tissue sampling [12,13]. As currently defined in the literature, active disease corresponded to SES-CD ≥ 3 , with endoscopic remission being SES-CD = 0–2 [14]. Notably, our cohort of CD patients with endoscopic inactive disease included four patients with SES-CD = 1 or 2 (residual mucosal macroscopic inflammation) and 12 patients with SES-CD = 0, considered to be in complete mucosal healing [15]. Finally, age of onset, localization, behavior and presence of perianal disease were recorded according to the Montreal classification [16].

Sample processing and cell isolation

Blood. Three ml of heparinized peripheral venous blood were obtained from each participant at the time of the colonoscopy. Peripheral blood leukocytes were isolated through ammonium-chloride-potassium (ACK) lysis (BioWhittaker Lysing Buffer, Lonza, Walkersville, MD, USA) and centrifugation.

Tissue digestion. Eight to 10 colonic biopsies were obtained from the macroscopically most affected area in patients with SES-CD ≥ 1 . For individuals with complete mucosal healing and control group, biopsies were taken in the cecum. Briefly, we first proceeded to a chemical digestion with dithiothreitol (DTT) 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 1 mM (Sigma Aldrich) at 37°C for 45 min, followed by enzymatic digestion with DNase I 0.01 mg/ml (Roche, Mannheim, Germany) and collagenase D 0.25 mg/ml (Roche) at 37°C for 45 min. Mechanical dissociation before and after the enzymatic digestion was performed with gentle MACS Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) [17].

Flow cytometry. Blood and mucosal cells were counted with Turk's solution. Live-dead staining was performed [LIVE/DEAD[®] Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit; AmCyan (Molecular Probes[®], Life Technologies Inc., ON, Canada)] to identify viable cells. Next, cells were stained for surface antigens along with human IgG to block Fc receptors for 30 min at 4°C.

Two staining panels were designed to identify the granulocytes. The first panel detected neutrophils as CD45⁺SSC^{high}CD66b⁺CD15⁺CD9⁻FcεRI⁻ cells [10,18] and eosinophils as CD45⁺SSC^{high}CD66b⁺CD15^{dull}CD9⁺FcεRI⁺ cells [5,10]. The second panel detected basophils and mast cells. Basophils were CD45⁺SSC^{low}Lin⁻human leukocyte antigen D-related (HLA-DR)⁻CRTH2⁺CCR3⁺c-kit⁻CD172a^{low}FcεRI^{high} cells in peripheral blood, and as CD45⁺SSC^{low}Lin⁻HLA-DR⁻CD172a^{low}c-kit⁺FcεRI⁺ cells in the mucosa, while mast cells were CD45⁺Lin^{dull}HLA-DR^{dull}c-kit⁺FcεRI⁺ cells [19]. See Supporting information methods for list of antibodies; 100 000 events per sample were acquired on a BD fluorescence activated cell sorter (FACS) Aria II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed and mean fluorescence intensity (MFI) (arithmetic mean) for CD66b and CD64 on gated neutrophils and eosinophils was calculated using FCS Express 4 (De Novo Software, Glendale, CA, USA). Data analyses were performed by two independent investigators, with one investigator blinded to the patient's clinical status.

Cell morphology. Neutrophils and eosinophils were sorted with BD FACS Aria II, underwent cytopsin and were stained with Giemsa Wright. A Leica DM4000B microscope

equipped with a Leica DFC300FX camera was used for morphological identification.

Histopathology

We performed an independent retrospective histopathological analysis of biopsies taken from the same area, as the biopsies processed for flow cytometry ($n = 23$). This assessment was made by a gastrointestinal pathologist blinded to the clinical, endoscopic and flow cytometry results. An adaptation of the previously published Colonic Global Histological Activity Score (CGHAS) was performed using one biopsy per patient [20,21].

Statistical analysis

We first tested our variables for normality using the D'Agostino–Pearson test. SES-CD in the active endoscopic disease population followed a normal distribution. Pearson's correlation test was performed when evaluating the entire cohort and Spearman's rank correlation test with smaller subgroups. Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test was used when more than two groups were compared. Non-paired data groups were compared using the Mann–Whitney U -test, while paired data groups were compared with Wilcoxon's matched pairs signed-rank test. Data are shown as median with interquartile range. Receiver operating characteristic (ROC) curves with binomial exact confidence intervals were generated. The statistical significance of pairwise comparison of AUCs was evaluated with DeLong's test using MedCalc software version 18 (Ostend, Belgium). Other statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 7.03 (La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined as a P -value < 0.05 ; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; **** $P < 0.0001$.

Results

The frequency of colonic and circulating neutrophils but not eosinophils augments in active CD

In this prospective study, we quantified granulocytes in paired colonic mucosa and blood from patients with CD ($n = 73$) stratified according to endoscopic criteria and treatment history (Table 1). The cohort includes 57 patients with active endoscopic disease (SES-CD ≥ 3) and 16 with endoscopic inactive disease (SES-CD = 0–2) at the time of inclusion. Clinical remission according to HBI was observed in 46 CD participants and, in agreement with several studies [22–24], HBI and SES-CD were not correlated in the subgroup of 23 patients with clinical activity (HBI > 4) (Supporting information, Fig. S1a,b).

Granulocytes were purified from inflamed mucosa and blood using selective surface markers (i.e. CD66b, CD9,

CD15 and FcεRI), granularity (SSC) and cell size (FSC) to first examine their morphology. Colonic and circulating SSC^{high}CD66b⁺ cells included granular CD15⁺CD9⁺FcεRI⁺ neutrophils as well as CD15^{dim}CD9⁺FcεRI⁺ eosinophils (Fig. 1a, upper panels). Purified granulocytes displayed bona fide cell morphology of neutrophils and eosinophils (Fig. 1a, lower panels). The frequency of hematopoietic CD45⁺ cells was significantly higher in the colonic mucosa of CD patients with active disease when compared to patients with complete mucosal healing or healthy controls (Supporting information, Fig. S2a) and correlated with endoscopic severity ($r = 0.38$ $P < 0.002$). We therefore quantified each granulocyte subpopulation after gating on CD45⁺ cells and showed that the percentage of neutrophils but not eosinophils augmented in the inflamed colon and peripheral blood of patients with active disease (SES-CD ≥ 3) when compared to patients with inactive disease (SES-CD = 0–2) (Fig. 1b).

The cohort of patients with active endoscopic disease was further stratified according to Montreal classification [16] into non-stricturing, non-penetrating B1 ($n = 40$) and non-B1 disease [stricturing disease (B2) or penetrating disease (B3); $n = 17$]. Notably, the cohort of 16 participants with inactive disease included four individuals considered in endoscopic remission with a SES-CD of 1 or 2, but still presenting some degree of mucosal inflammation without ulceration in at least one colonic segment. As the present study aimed at evaluating the immune profile of inflamed *versus* strictly non-inflamed colon, subgroups of patients with active disease were compared to the subgroup of CD patients with inactive disease in complete mucosal healing (SES-CD = 0) or to healthy subjects (colonic samples $n = 10$, blood samples $n = 16$). Neutrophil infiltration was significantly increased in the colonic mucosa of CD patients with active B1, B2 or B3 disease when compared to CD patients with complete mucosal healing or healthy subjects (Fig. 1c). The percentage of colonic neutrophils was not influenced by treatment (Supporting information, Fig. S2b). Notably, we estimated median cell counts of neutrophils analyzed using flow cytometry at 1890 [interquartile range (IQR) = 630–5300] cells in inflamed mucosa, 130 (IQR = 30–303) cells in complete healed mucosa and 75 (IQR = 38–103) cells in healthy mucosa. Finally, no differences were observed in the frequencies of circulating neutrophils between endoscopic active disease subgroups and controls, irrespective of treatment (Supporting information, Fig. S2c).

Furthermore, histological disease activity assessment was performed in a random subgroup of 23 patients, including individuals in endoscopic remission ($n = 5$) or with active endoscopic disease (mild disease $n = 6$, moderate disease $n = 6$, severe disease $n = 6$) [21]. High histological scores tended to associate with high frequencies of

Table 1. Characteristics of participants at the time of inclusion

	Endoscopic active disease		Endoscopic inactive disease	
	SES-CD ≥ 3 <i>n</i> = 57		SES-CD = 0 <i>n</i> = 12	
Female <i>n</i> (%)	29 (50.9)	7 (58.3)	2 (50.0)	
Age (years) median (IQR)	38 (25.3–49.8)	50 (46.8–52.8)	50 (37.0–66.0)	
Disease duration (years) median (IQR)	5 (0–12.8)	18 (14.3–24.4)	23 (15.5–24.5)	
Surgical resection history <i>n</i> (%)	6 (10.5)	2 (16.7)	1 (25.0)	
A1 (age at diagnosis below 16 year) <i>n</i> (%)	8 (14.0)	–	–	
A2 (age at diagnosis between 17 and 40 years) <i>n</i> (%)	42 (73.7)	11 (91.7)	3 (75.0)	
A3 (age at diagnosis above 40 years) <i>n</i> (%)	7 (12.3)	1 (8.3)	1 (25.0)	
L2 (colonic location) <i>n</i> (%)	29 (50.9)	9 (75.0)	4 (100.0)	
L3 (ileocolonic location) <i>n</i> (%)	28 (49.1)	3 (25.0)	–	
B1 (non-stricturing, non-penetrating behavior) <i>n</i> (%)	40 (70.2)	9 (75.0)	3 (75.0)	
B2 (stricturing behavior) <i>n</i> (%)	9 (15.8)	1 (8.3)	–	
B3 (penetrating behavior) <i>n</i> (%)	8 (14.0)	2 (16.7)	1 (25.0)	
Perianal disease <i>n</i> (%)	10 (17.5)	2 (16.7)	1 (25.0)	
New diagnosis <i>n</i> (%)	15 (26.2)	–	–	
No recent treatment <i>n</i> (%)	14 (24.6)	2 (16.6)	–	
Non-anti-TNF treatment ^a <i>n</i> (%)	14 (24.6)	5 (41.7)	3 (75.0)	
Anti-TNF treatment ^b <i>n</i> (%)	14 (24.6)	5 (41.7)	1 (25.0)	

^aIncludes 5-aminosalicylic acid (5ASA), immunomodulators, corticosteroids [*n* = 4: hydrocortisone rectal foam (*n* = 1), prednisone (*n* = 1), combination of 5-ASA and prednisone (*n* = 1), combination of thiopurine and prednisone (*n* = 1)].

^bIncludes anti-tumor necrosis factor (TNF) with or without an immunomodulator. IQR = interquartile range; SES-CD = Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease.

mucosal neutrophils and correlated positively with mucosal neutrophil frequencies in individuals with endoscopic active disease (Fig. 1d, left and middle panels). Specifically, increased neutrophilic infiltration was detected in both the epithelium and lamina propria in endoscopic active disease patients when compared to inactive disease patients (Fig. 1d, right panel).

Collectively, disease activity was associated with colonic neutrophilic infiltration, independently of disease phenotype.

The frequency of colonic neutrophils correlates with SES-CD

We therefore asked whether frequencies of colonic neutrophils correlated with endoscopic severity. First, the percentage of colonic neutrophils correlated significantly with SES-CD in the entire cohort of patients ($r = 0.26$, $P < 0.03$), in the subgroup with exclusive colonic disease ($r = 0.38$, $P < 0.02$), and more particularly in individuals with B1 phenotype ($r = 0.45$, $P < 0.001$) (Fig. 2a). Notably, the correlation was maintained when individuals in endoscopic remission (SES-CD 0–2) were excluded from the B1 subgroup (Supporting information, Fig. S2d), highlighting the association between frequencies of neutrophils and severity of mucosal inflammation.

Interestingly, although eosinophils did not accumulate in inflamed CD colon (Fig. 1b), basophils but not mast cells significantly infiltrated the colon of patients with

endoscopic active disease when compared to inactive disease (Supporting information, Fig. S3a,d), confirming and extending our previous study [25]. More precisely, frequency of basophils augmented in the colonic mucosa in patients with active B1 when compared to B2 or B3 disease (Supporting information, Fig. S3b), while a weak correlation was observed between frequencies of mucosal basophils and SES-CD in the entire cohort of CD patients ($r = 0.25$, $P < 0.04$) (Supporting information, Fig. S3c). In contrast, patients with active B2 or B3 disease displayed lower percentages of mast cells when compared to healthy controls (Supporting information, Fig. S3e) or the subgroup with B1 disease ($P < 0.005$ when the B1 and B2/B3 subgroups are compared using the Mann–Whitney *U*-test).

Taken together, neutrophils and basophils but neither eosinophils nor mast cells infiltrate the inflamed colon while the percentage of neutrophils correlated with SES-CD in patients with B1 disease.

The expression of CD66b on colonic neutrophils correlates with SES-CD

We next investigated the activation status of neutrophils by quantifying the expression of CD66b using mean fluorescence intensity (MFI). Increased CD66b expression was detected on mucosal neutrophils in CD patients with active relative to inactive disease (Fig. 2b). High levels of CD66b expression were associated with elevated

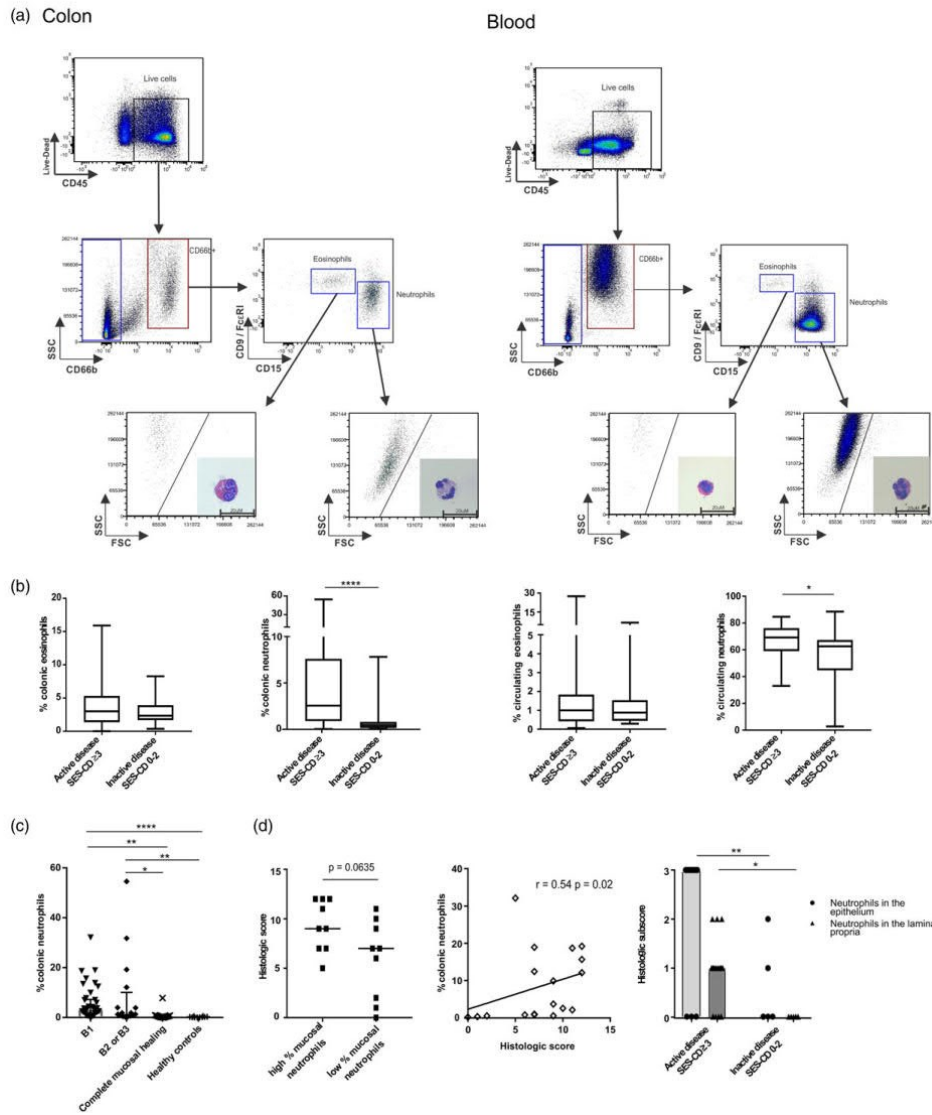


Fig. 1. Gating strategy for identification of neutrophils and eosinophils in the mucosa and the blood of Crohn's disease (CD) patients and cellular frequencies. (a) Representative gating strategy, cell size and morphology by Giemsa–Wright staining for identification of eosinophils and neutrophils in freshly isolated hematopoietic cells from inflamed colon mucosa and peripheral blood of CD patients. Scale bar: 20 μ m. (b) Frequencies of colonic and peripheral blood eosinophils and neutrophils among patients with active ($n = 57$) versus inactive disease ($n = 16$) (Mann–Whitney U -test). (c) Frequencies of colonic neutrophils among subgroups according to disease behaviour (Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test). (d) Histological score of active CD patients ($n = 18$) with high and low mucosal neutrophil frequencies according to the median of the distribution of neutrophils (median = 3.15%) assessed by flow cytometry left panel (Mann–Whitney U -test), correlation between the frequencies of colonic neutrophils and histological score (middle panel) (Spearman's rank correlation coefficient) and comparison between histological subscores relative to polymorphonuclear infiltration in active ($n = 18$) or inactive disease ($n = 5$) (right panel) (Mann–Whitney U -test); B1 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

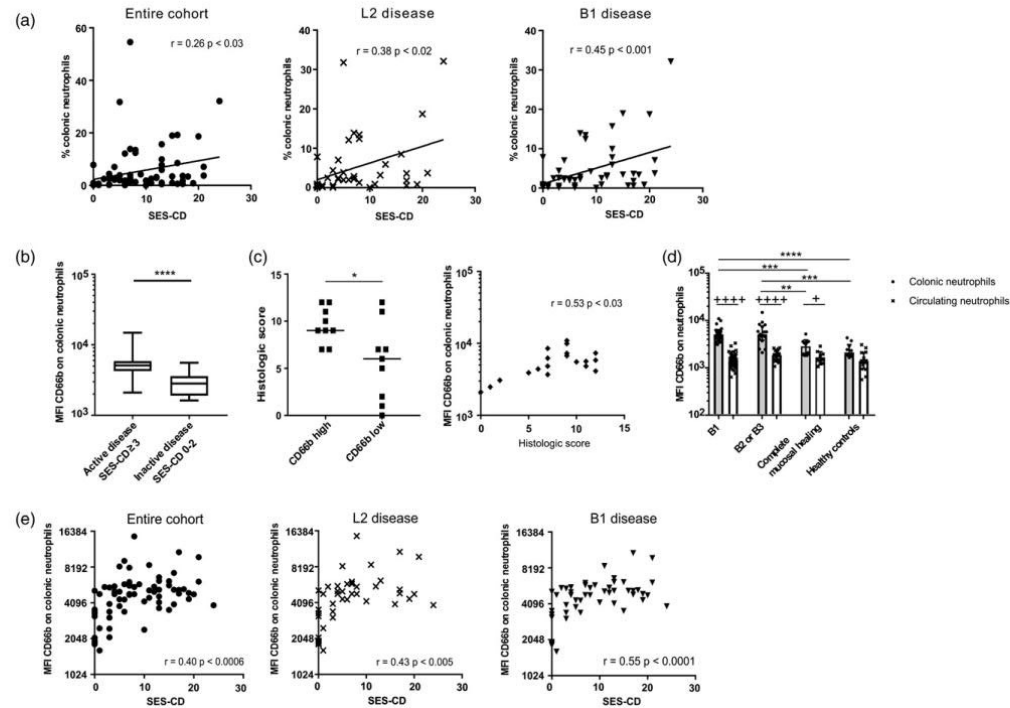


Fig. 2. Frequency of colonic neutrophils and the expression of CD66b correlate with Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD). (a) Correlations between mucosal neutrophil frequencies and SES-CD in the entire cohort ($n = 73$), exclusive colonic disease 'L2' ($n = 42$), B1 disease ($n = 52$) (Pearson's correlation coefficient). (b) CD66b mean fluorescence intensity (MFI) on neutrophils in colon of patients with active or inactive disease (Mann-Whitney U -test). (c) Histological score of active CD patients ($n = 18$) with high and low CD66b MFI according to median MFI ($= 5179.5$) of CD66b expression on colonic neutrophils (Mann-Whitney U -test) (left panel) and correlation between the MFI of CD66b on colonic neutrophils and histological score ($n = 18$, Spearman's rank correlation coefficient). (d) CD66b MFI on neutrophils in colon and blood of individuals with B1 or non-B1 disease, complete mucosal healing ($n = 12$) and healthy controls (healthy controls: colon samples $n = 10$, blood samples $n = 16$) (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test (*), Wilcoxon's matched-pairs signed-rank test for colonic *versus* circulating neutrophils (+) (healthy controls $n = 10$ paired samples). (e) Correlations between CD66b MFI on colonic neutrophils and SES-CD among the entire cohort ($n = 73$), exclusive colonic disease (L2, $n = 42$), B1 disease ($n = 52$) (Pearson's correlation coefficient). * $+P < 0.05$; ** $+P < 0.01$; *** $+P < 0.001$; **** $+P < 0.0001$.

histological score (Fig. 2c, left panel) and correlated with histological score (Fig. 2c, right panel). When CD patients with endoscopic active disease were further stratified, CD66b expression was increased on mucosal neutrophils in all subgroups examined compared to control groups, irrespective of treatment (Fig. 2d and Supporting information, Fig. S4a, left panel).

We therefore asked whether CD66b up-regulation on neutrophils occurred in the circulation or after these cells were recruited to CD colon. As further depicted in Fig. 2d, CD66b expression did not increase on circulating neutrophils in CD patients relative to healthy

subjects. However, it augmented on neutrophils in inflamed or healed mucosa when compared to paired blood samples in CD, and the increase was significantly higher in patients with active relative to quiescent disease (Fig. 2d).

Finally, SES-CD correlated significantly with CD66b expression on colonic neutrophils in the entire cohort ($r = 0.40$, $P < 0.0006$), colonic (L2) ($r = 0.43$, $P < 0.005$), ileocolonic (L3) ($r = 0.38$, $P < 0.04$) and B1 ($r = 0.55$, $P < 0.0001$) subgroups, and maintained in patients with B1 endoscopic active disease ($r = 0.34$, $P < 0.04$) (Fig. 2e and Supporting information, Fig. S4b).

Collectively, the activation of mucosal neutrophils as defined by CD66b expression correlated with SES-CD in all but not B2/B3 subgroups of patients examined.

CD64 expression on circulating neutrophils correlates with SES-CD

That CD66b did not increase on circulating neutrophils prompted us to examine CD64 expression, another neutrophil activation marker in blood that was previously reported to correlate with disease severity in pediatric CD patients [9]. Accordingly, we observed a higher CD64 expression on circulating neutrophils in adult CD patients with active relative to inactive disease (Fig. 3a). Circulating CD64 expression augmented in all subgroups of patients including B1 and non-B1 when compared to healthy controls (Fig. 3b). As shown for CD66b, CD64 expression was significantly up-regulated in CD mucosa when compared to healthy individuals (Fig. 3b). In contrast to CD66b, CD64 expression was also elevated in colon relative to blood in healthy controls and, unexpectedly, colonic neutrophils expressed significantly less CD64 in active CD patients when compared to healthy individuals (Fig. 3b). Furthermore, CD64 and CD66b were co-expressed and up-regulated on neutrophils when traveling from blood to inflamed colon (Fig. 3c). In active CD, circulating neutrophils were detected as CD64^{high}CD66b^{low} and colonic as CD64^{high}CD66b^{high} cells, while in healthy subjects and patients with complete mucosal healing, neutrophils were CD64^{low}CD66b^{low} in blood and CD64^{high}CD66b^{low} in colon.

Finally, CD64 expression on circulating neutrophils correlated with SES-CD in the entire cohort ($r = 0.42$, $P < 0.0004$), individuals with exclusive colonic involvement (L2 disease) ($r = 0.53$, $P < 0.0005$) and in patients with B1 disease ($r = 0.41$, $P < 0.04$) (Fig. 3d), a correlation which was maintained in individuals with endoscopic active B1 disease (Supporting information, Fig. S4c). However, no correlation was observed between CD64 expression and SES-CD on circulating neutrophils in patients with ileocolonic (L3) disease (Supporting information, Fig. S4c).

Notably, as the activation of neutrophils correlated with SES-CD, we asked whether a similar correlation could be observed for eosinophils. Both in the blood and mucosa, the expression of either CD66b or CD64 on eosinophils did not correlate with endoscopic severity (Supporting information, Table S1).

Collectively, neutrophil activation increased in inflamed colon (increased CD66b expression) and blood (increased CD64 expression) of CD patients with endoscopic active disease, and correlated with endoscopic disease severity.

Combined expression of activation markers on mucosal and circulating neutrophils discriminates disease activity and severity

Complete mucosal healing being a predictor of sustained steroid-free remission [15], we therefore evaluated the performance of neutrophil activation status in distinguishing patients with strictly non-inflamed mucosa (complete mucosal healing, SES-CD = 0) from individuals with inflamed mucosa (SES-CD ≥ 1). The latter subgroup included the four patients with SES-CD = 1–2 who were considered in endoscopic remission but showed signs of inflammation. Examination of the subgroup with B1 disease as well as the entire cohort (Fig. 4a and Supporting information, Fig. S5a) showed that mucosal CD66b expression was superior to circulating CD64 expression on neutrophils in distinguishing complete mucosal healing from macroscopic mucosal inflammation. The performance of the activation status of mucosal neutrophils was evaluated next to discriminate between CD patients with severe disease (SES-CD ≥ 16) or mild–moderate disease (SES-CD = 3–15), as severe endoscopic disease could be a predictor of poor prognosis [26]. As mucosal CD66b expression inconsistently discriminated disease severity in CD patients (Fig. 4b and Supporting information, Fig. S5b), we designed a 'neutrophil activation power index' (MFI of mucosal CD66b X circulating CD64) that reflects neutrophil activation in blood and colon. This power index correlated positively with SES-CD in all subgroups examined (Table 2), but its performance was not superior to mucosal CD66b expression. Nonetheless, the index was significantly different between patients with severe and mild endoscopic disease, more particularly in the B1 disease subgroup (Fig. 4b right panels, Supporting information, Fig. S5b).

Collectively, these observations provide evidence that, despite the pathognomonic discontinuous mucosal lesions in CD, the activation of neutrophils correlated with endoscopic severity in inflamed mucosa.

Discussion

Neutrophils are detected in the inflamed mucosa of CD patients [20]. However, how the frequency or activation of these cells correlated with disease severity remains unclear. We showed here that frequencies of neutrophils increased in inflamed colon and correlated significantly with SES-CD. We further established that neutrophils up-regulated CD66b expression in inflamed CD mucosa, while CD64 expression was augmented on circulating neutrophils in CD patients with endoscopic active disease relative to control groups. We next demonstrated that SES-CD correlated with neutrophil CD66b expression in mucosa and,

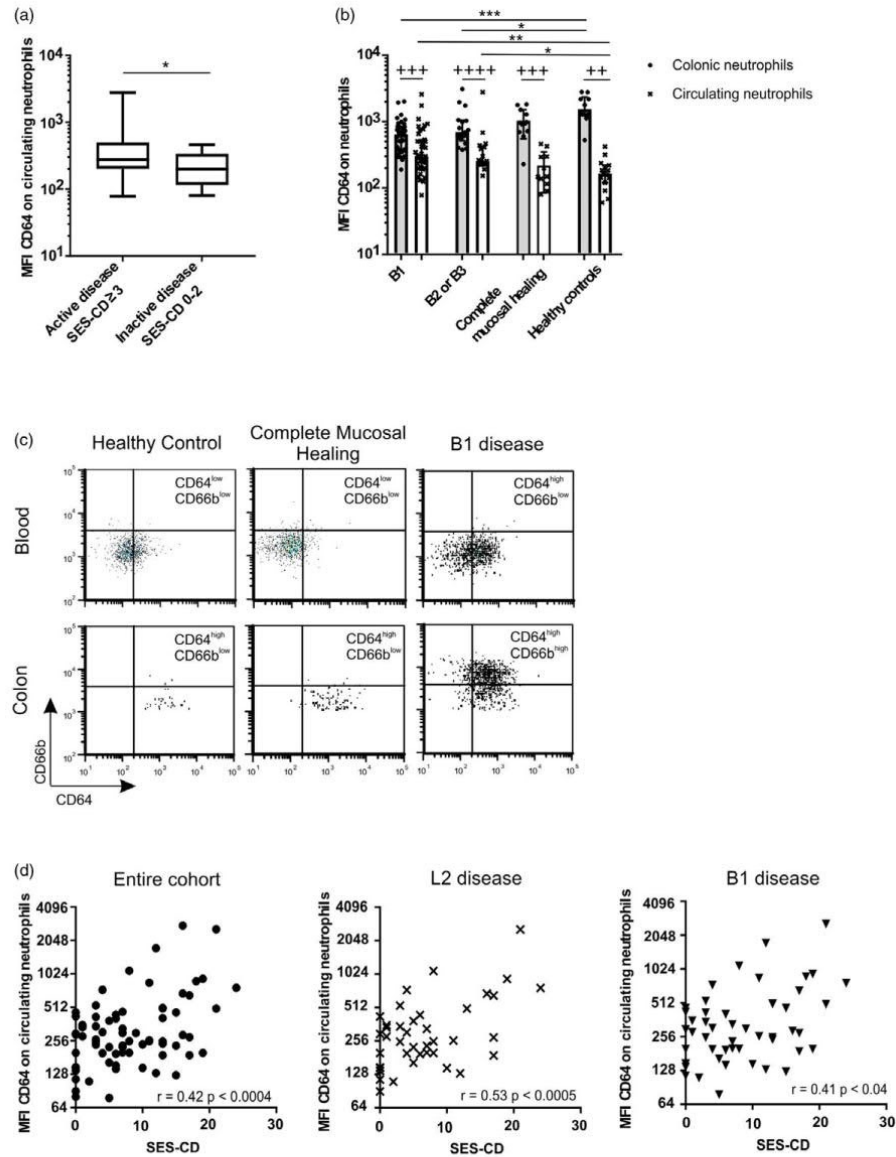


Fig. 3. CD64 expression on circulating neutrophils correlates with Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD). CD64 mean fluorescence intensity (MFI) on neutrophils (a) in blood of patients with active and inactive disease (Mann-Whitney *U*-test), (b) in colon and blood of individuals with B1 versus non-B1 disease, complete mucosal healing ($n = 12$) and healthy controls (healthy controls: colon samples: $n = 10$, blood samples $n = 16$) (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test between B1, B2 or B3, and healthy control groups (*), Wilcoxon matched-pairs signed-rank test for colonic versus circulating neutrophils (+) (healthy controls $n = 10$ paired samples). (c) Dot-plot representing CD64 and CD66b co-expression after gating on purified circulating and colonic neutrophils. (d) Correlations between CD64 MFI on circulating neutrophils and SES-CD among the entire cohort ($n = 73$), exclusive colonic disease 'L2' ($n = 42$), B1 disease ($n = 52$) (Pearson's correlation coefficient) * $P < 0.05$; ** $+P < 0.01$; *** $+P < 0.001$; **** $+P < 0.0001$.

B1 disease

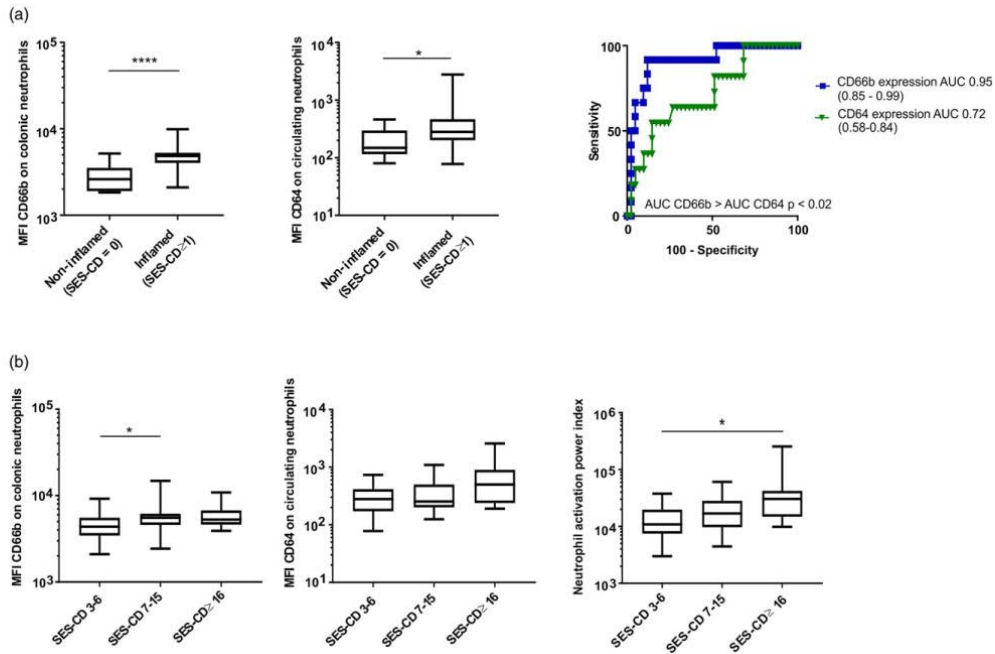


Fig. 4. Expression of activation markers on mucosal and circulating neutrophils discriminates disease activity and severity in Crohn's disease (CD) patients with B1 disease. (a) CD66b mean fluorescence intensity (MFI) on colonic neutrophils (left panel) and CD64 MFI on peripheral blood neutrophils (middle panel) according to the presence of complete mucosal healing [Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) ≥ 1 : $n = 43$, SES-CD = 0: $n = 12$] (Mann-Whitney U -test). Performance of each parameter to discriminate complete mucosal healing from individuals with SES-CD ≥ 1 area under the curve (AUC) and their exact binomial confidence interval are presented as well as pairwise comparison of ROC curves (DeLong's test) (right panel). (b) CD66b MFI on colonic neutrophils (left panel), CD64 MFI on circulating neutrophils (middle panel) and neutrophil activation power index (right panel) according to endoscopic disease severity in the subgroup with B1 disease ($n = 40$) (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

Table 2. Correlations between neutrophils activation and SES-CD

	% colonic neutrophils	MFI CD64 on circulating neutrophils	MFI CD66b on colonic neutrophils	Neutrophil activation power index
Cohort ^a $n = 73$	$r = 0.26$ $P < 0.03$	$r = 0.42$ $P < 0.0004$	$r = 0.40$ $P < 0.0006$	$r = 0.42$ $P < 0.0004$
B1 ^a $n = 52$	$r = 0.45$ $P < 0.001$	$r = 0.41$ $P < 0.04$	$r = 0.55$ $P < 0.0001$	$r = 0.42$ $P < 0.003$
B2B3 ^b $n = 21$	$r = 0.47$ $P < 0.04$	$r = 0.36$	$r = 0.39$ $P = 0.08$	$r = 0.54$ $P < 0.02$
Colonic (L2) ^a $n = 42$	$r = 0.38$ $P < 0.02$	$r = 0.53$ $P < 0.0005$	$r = 0.43$ $P < 0.005$	$r = 0.50$ $P < 0.002$
Ileocolonic (L3) ^a $n = 31$	$r = 0.14$	$r = 0.29$	$r = 0.38$ $P < 0.04$	$r = 0.32$ $P = 0.08$

^aPearson's correlation coefficient.

^bSpearman's rank correlation coefficient. SES-CD = Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease; MFI = mean fluorescence intensity.

conversely, with neutrophil CD64 expression in blood in CD patients. We thus propose that recruitment of activated neutrophils in inflamed mucosa is associated with disease severity in Crohn's disease.

SES-CD was preferred to the Crohn's disease index of severity (CDEIS) as it is validated, correlates well with CDEIS and seems to be even more reliable in evaluating changes in endoscopic severity [14,27]. HBI was selected

to assess the clinical score because it is more practical to use, while correlating well with the Crohn's disease activity index (CDAI) [12]. However, in agreement with other studies [22–24], we did not observe a significant correlation between clinical and endoscopic severity. This study included a cohort of CD patients who underwent a thorough clinical evaluation to confirm diagnosis, disease activity or remission, and excluded any patient with suspicion of infection. It should be emphasized that SES-CD was performed prospectively most of the time by the same gastroenterologist (AT), but that our cohort only included ileocolonic and colonic disease, as endoscopic scoring of exclusive ileal disease might vary in relation to the length of segment examined.

The frequencies of neutrophils were augmented in the inflamed mucosa, corroborating the neutrophil infiltration described previously in histology [20]. Our study further showed an association between histological score and neutrophil activation at the single-cell level. A correlation between frequencies of neutrophils and endoscopic severity was reported in ulcerative colitis [4] and was proposed in Crohn's disease using quantification of fecal calprotectin or Indium-111 scanning [28,29]. However, apparently contradictory studies suggest that CD may result from a defect in neutrophil recruitment, and that recruited neutrophils are either dysfunctional or display proinflammatory functions [18,30–32].

Notably, among other granulocytes, basophils but not mast cells or eosinophils infiltrated the inflamed mucosa, more particularly in patients with B1 phenotype. The depletion of mast cells observed in the mucosa of patients with B2 and B3 disease could reflect the decrease in basophilic infiltrate in this subgroup of patients, acknowledging that mast cells may recruit basophils in the tissue through the release of histamine and prostaglandin D2 [33].

We examined CD66b and CD64 expression, as these activation markers could be key elements in the bactericidal and cytolytic function of neutrophils. Although CD11b and CD62L are preferentially implicated in neutrophil recruitment [34], shedding of CD62L upon neutrophil activation [35] renders this marker less suitable to evaluate neutrophils' degree of activation when compared to other surface antigens. Furthermore, CD66b is considered as a marker of activation for neutrophils in inflammatory conditions, but might also reflect neutrophil dysfunction [10,36,37]. To our knowledge, we are the first to report a correlation between CD66b expression on mucosal neutrophils and endoscopic severity. This suggests increased interactions between neutrophils and bacterial products or, perhaps, increased local stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) produced by macrophages [38], pathogenic T helper type 17 (Th17) [32], innate lymphoid cells type 3

(ILC3) [39], fibroblasts [40] and epithelial cells in inflamed CD mucosa [41]. CD66b has been reported to play a role in neutrophil adhesion and superoxide production, as well as release of preformed IL-8 in neutrophils [6,42,43]. However, its contribution in the pathogenesis of Crohn's disease has not been studied, except for a potential cross-talk between CD66b expressing neutrophils and Th17 immunity [32]. Thus, further investigations are warranted to assess the potential function of increased CD66b expression on mucosal neutrophils in patients with severe endoscopic disease.

CD64 is the high-affinity Fc receptor for IgG expressed not only on neutrophils, but also on macrophages and monocytes [44]. Its expression is triggered mainly by interferon (IFN)- γ [produced by Th1[45], pathogenic Th17/Th1[46] and natural killer (NK) cells[47] in inflamed CD colon], and stimulates phagocytosis and oxidative burst [7,8]. CD64 serves as a biomarker to distinguish infections from inflammatory conditions [48]. Indeed, CD64 expression on circulating neutrophils is not specific to CD, as it might increase during any infectious process, including perianal or intra-abdominal abscesses [49]. Furthermore, this expression is modulated according to ethnicity and anti-TNF response [8,50,51]. Nonetheless, its expression level in blood, assessed by flow cytometry, correlated with clinical activity and C-reactive protein in an adult IBD cohort [48], and more recently with SES-CD in a pediatric cohort of CD patients [9,52].

The present study further showed a correlation between CD64 expression on circulating neutrophils and SES-CD in adult CD patients with endoscopic active disease only, illustrating a specific relation between levels of CD64 expression on circulating neutrophils and the extent of mucosal lesions in the small and large intestine. As CD64 may be expressed on immune cell types other than neutrophils [53], morphological studies of highly purified cells from inflamed colon were valuable to ascertain that our gating strategy was restricted to the detection of neutrophils and not eosinophils. Notably, CD64 expression was elevated in mucosa relative to blood neutrophils in both CD and healthy individuals and, unexpectedly, higher expression was detected in mucosa of healthy subjects when compared to CD patients. To our knowledge, no previous studies have quantified baseline CD64 expression on colonic neutrophils at homeostasis. We propose two non-mutually exclusive explanations for this intriguing observation: (1) CD64 expression may reflect baseline neutrophil activation in healthy mucosa, while in CD colon neutrophils display a relative resistance towards mediators inducing CD64 expression, such as IFN- γ and G-CSF to the benefit of CD66b expression, corroborating previous observations of dysfunctional neutrophils [30,54,55];

and (2) high levels of CD64 expression are not associated with increased numbers of receptor per cell but with increased avidity of the receptor for the antibody used for its detection in healthy mucosa (inside-out signaling) [56]. Notably, the frequency of CD45⁺ cells and accordingly the number of colonic neutrophils analyzed in the healthy control group, was low, which could lead to some technical issues for the detection of CD64 expression on neutrophils. However, that only CD64 and not CD66b expression significantly increased on neutrophils in the mucosa of healthy controls when compared to active CD patients weakens this hypothesis.

Most importantly, our data established a correlation between disease severity and CD64 expression on circulating but not mucosal neutrophils in patients with endoscopic active disease, and vice versa for CD66b expression. These observations provide further evidence that analysis of mucosal neutrophils did not include some blood neutrophils that might have contaminated the biopsy at the time of collection. Moreover, as reported in previous pediatric studies [9,52], here the inflammatory burden was exclusively assessed through ileocolonoscopy. Consequently, the presence of upper GI tract or extensive small bowel involvement was not taken into account in quantifying overall disease severity, and might underscore the weak correlation observed between CD64 expression on circulating neutrophils and SES-CD.

When compared to the performance of CD64 on circulating neutrophils, mucosal CD66b expression on colonic neutrophils was superior in discriminating strict absence from signs of mucosal inflammation, indicating that mucosal when compared to blood evaluation appeared to reflect disease activity more clearly. The combination of circulating and colonic neutrophil activation status using a power index discriminated between severe and mild disease. Thus, this index might offer a sensitive and specific approach to evaluate CD disease severity, which needs to be examined in large cohorts of CD patients for further validation. In this context, correlating this power index with tools assessing the entire gastrointestinal tract, such as the Lemann Index [57] or multiple aspects of disease severity, such as the recent 'Crohn's disease overall disease severity index', would be of great interest [58].

Collectively, we showed that the frequency and activation of colonic neutrophils correlated with SES-CD. Increased expression of activation markers on neutrophils, CD66b in colon and CD64 in blood correlated with endoscopic severity and more particularly in patients with B1 disease. A neutrophilic activation power index was designed to reflect mucosal inflammation and endoscopic severity, thus allowing distinction between complete mucosal healing and macroscopic inflammation, and severe from mild

to moderate endoscopic disease. However, the present report exclusively examined colonic granulocyte profile in patients with L2 and L3 disease. Future studies are warranted to evaluate frequency and activation of granulocytes in relation to disease severity in adult CD patients with exclusive ileal (L1) disease. Taken together, we propose that recruitment of activated neutrophils in the inflamed colon is associated with disease severity in Crohn's disease. However, their precise role in disease pathogenesis requires further investigation.

Acknowledgments

The authors would like to thank all CD and healthy patients who kindly gave samples, as well as the nurses and gastroenterology medical staff from the Division of Gastroenterology at Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Special thanks to Heena Mehta for proofreading the manuscript and insightful discussions. This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) MOP – 130533 awarded to M. S. A. T. received a CIHR Canada Graduate Scholarship Banting and Best Master's degree award and Phase 1 award from Fonds de Recherche Santé Québec (FRQS) Programme FRQS/MSSS de formation pour médecins résidents en médecine spécialisée visant une carrière en recherche. L. C. and M. Bs. received Doctoral training awards from FRQS.

Disclosures

The authors disclose no conflicts of interest.

References

- 1 Ng SC, Shi HY, Hamidi N *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet* 2018;**390**:2769–78.
- 2 Magro F, Langner C, Driessen A *et al.* European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:827–51.
- 3 Wera O, Lancellotti P, Oury C. The dual role of neutrophils in inflammatory bowel diseases. *J Clin Med* 2016;**5**:118.
- 4 Lemmens B, Arijis I, Van Assche G *et al.* Correlation between the endoscopic and histologic score in assessing the activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2013;**19**:1194–201.
- 5 Yoon J, Terada A, Kita H. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. *J Immunol* 2007;**179**:8454–62.
- 6 Skubitz KM, Campbell KD, Skubitz AP. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. *J Leukoc Biol* 1996;**60**:106–17.
- 7 Hoffmann JJ. Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clin Chem Lab Med* 2009;**47**:903–16.

- 8 Hoffmeyer F, Witte K, Schmidt RE. The high-affinity Fc gamma RI on PMN: regulation of expression and signal transduction. *Immunology* 1997;**92**:544–52.
- 9 Minar P, Haberman Y, Jurickova I *et al.* Utility of neutrophil Fc gamma receptor I (CD64) index as a biomarker for mucosal inflammation in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2014;**20**:1037–48.
- 10 Lampinen M, Backman M, Winqvist O *et al.* Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J Leukoc Biol* 2008;**84**:1392–9.
- 11 Annese V, Daperno M, Rutter MD *et al.* European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013;**7**:982–1018.
- 12 Vermeire S, Schreiber S, Sandborn WJ, Dubois C, Rutgeerts P. Correlation between the Crohn's disease activity and Harvey-Bradshaw indices in assessing Crohn's disease severity. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2010;**8**:357–63.
- 13 Daperno M, D'Haens G, Van Assche G *et al.* Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;**60**:505–12.
- 14 Vuitton L, Marteau P, Sandborn WJ *et al.* IOIBD technical review on endoscopic indices for Crohn's disease clinical trials. *Gut* 2016;**65**:1447–55.
- 15 Baert F, Moortgat L, Van Assche G *et al.* Mucosal healing predicts sustained clinical remission in patients with early-stage Crohn's disease. *Gastroenterology* 2010;**138**:463–8; quiz e10–1.
- 16 Satsangi J, Silverberg MS, Vermeire S, Colombel JF. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 2006;**55**:749–53.
- 17 Baba N, Van VQ, Wakahara K *et al.* CD47 fusion protein targets CD172a+ cells in Crohn's disease and dampens the production of IL-1beta and TNF. *J Exp Med* 2013;**210**:1251–63.
- 18 Kvedaraitė E, Lourda M, Idestrom M *et al.* Tissue-infiltrating neutrophils represent the main source of IL-23 in the colon of patients with IBD. *Gut* 2016;**65**:1632–41.
- 19 Wakahara K, Baba N, Van VQ *et al.* Human basophils interact with memory T cells to augment Th17 responses. *Blood* 2012;**120**:4761–71.
- 20 D'Haens GR, Geboes K, Peeters M *et al.* Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum. *Gastroenterology* 1998;**114**:262–7.
- 21 Laharie D, Reffet A, Belleanne G *et al.* Mucosal healing with methotrexate in Crohn's disease: a prospective comparative study with azathioprine and infliximab. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;**33**:714–21.
- 22 Jones J, Loftus EV Jr, Panaccione R *et al.* Relationships between disease activity and serum and fecal biomarkers in patients with Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;**6**:1218–24.
- 23 Khanna R, Nelson SA, Feagan BG *et al.* Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2016;**8**:CD010642.
- 24 Peyrin-Biroulet L, Reinisch W, Colombel JF *et al.* Clinical disease activity, C-reactive protein normalisation and mucosal healing in Crohn's disease in the SONIC trial. *Gut* 2014;**63**:88–95.
- 25 Chapuy L, Bsat M, Mehta H *et al.* Basophils increase in Crohn disease and ulcerative colitis and favor mesenteric lymph node memory TH17/TH1 response. *J Allergy Clin Immunol* 2014;**134**:978–81 e1.
- 26 Ordas I, Feagan BG, Sandborn WJ. Early use of immunosuppressives or TNF antagonists for the treatment of Crohn's disease: time for a change. *Gut* 2011;**60**:1754–63.
- 27 Khanna R, Zou G, Stitt L *et al.* Responsiveness of endoscopic indices of disease activity for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2017;**112**:1584–92.
- 28 Sipponen T, Karkkainen P, Savilahti E *et al.* Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;**28**:1221–9.
- 29 Saverymuttu SH, Camilleri M, Rees H, Lavender JP, Hodgson HJ, Chadwick VS. Indium 111-granulocyte scanning in the assessment of disease extent and disease activity in inflammatory bowel disease. A comparison with colonoscopy, histology, and fecal indium 111-granulocyte excretion. *Gastroenterology* 1986;**90**(5 Pt 1):1121–8.
- 30 Marks DJ, Harbord MW, MacAllister R *et al.* Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation. *Lancet* 2006;**367**:668–78.
- 31 Smith AM, Rahman FZ, Hayee B *et al.* Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med* 2009;**206**:1883–97.
- 32 Pelletier M, Maggi L, Micheletti A *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010;**115**:335–43.
- 33 Sarfati M, Wakahara K, Chapuy L, Delespesse G. Mutual interaction of basophils and T cells in chronic inflammatory diseases. *Front Immunol* 2015;**6**:399.
- 34 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2013;**13**:159–75.
- 35 Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res* 2018;**371**:437–53.
- 36 Torsteinsdottir I, Arvidson NG, Hallgren R, Hakansson L. Enhanced expression of integrins and CD66b on peripheral blood neutrophils and eosinophils in patients with rheumatoid arthritis, and the effect of glucocorticoids. *Scand J Immunol* 1999;**50**:433–9.
- 37 Schmidt T, Brodesser A, Schnitzler N *et al.* CD66b overexpression and loss of C5a receptors as surface markers for *Staphylococcus aureus*-induced neutrophil dysfunction. *PLOS ONE* 2015;**10**:e0132703.
- 38 Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;**8**:533–44.
- 39 Geremia A, Arancibia-Carcamo CV. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation. *Front Immunol* 2017;**8**:1296.

- 40 Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;**4**:723–31.
- 41 Noguchi M, Hiwatashi N, Liu ZX, Toyota T. Increased secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in mucosal lesions of inflammatory bowel disease. *Digestion* 2001;**63** (Suppl 1):32–6.
- 42 Stocks SC, Ruchaud-Sparagano MH, Kerr MA, Grunert F, Haslett C, Dransfield I. CD66: role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur J Immunol* 1996;**26**:2924–32.
- 43 Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. *Hum Immunol* 2006;**67**:676–82.
- 44 Buckle AM, Jayaram Y, Hogg N. Colony-stimulating factors and interferon-gamma differentially affect cell surface molecules shared by monocytes and neutrophils. *Clin Exp Immunol* 1990;**81**:339–45.
- 45 Neurath MF. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2014;**14**:329–42.
- 46 Brand S. Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 2009;**58**: 1152–67.
- 47 Takayama T, Kamada N, Chinen H *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**:882–92, 92 e1–3.
- 48 Tillinger W, Jilch R, Jilma B *et al*. Expression of the high-affinity IgG receptor FcRI (CD64) in patients with inflammatory bowel disease: a new biomarker for gastroenterologic diagnostics. *Am J Gastroenterol* 2009;**104**:102–9.
- 49 Davis BH, Olsen SH, Ahmad E, Bigelow NC. Neutrophil CD64 is an improved indicator of infection or sepsis in emergency department patients. *Arch Pathol Lab Med* 2006;**130**:654–61.
- 50 Minar P, Jackson K, Tsai YT *et al*. A low neutrophil CD64 Index is associated with sustained remission during infliximab maintenance therapy. *Inflamm Bowel Dis* 2016;**22**:2641–7.
- 51 Wojtal KA, Rogler G, Scharl M *et al*. Fc gamma receptor CD64 modulates the inhibitory activity of infliximab. *PLOS ONE* 2012;**7**:e43361.
- 52 Minar P, Jackson K, Tsai YT, Sucharew H, Rosen MJ, Denson LA. Validation of neutrophil cd64 blood biomarkers to detect mucosal inflammation in pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2017;**24**:198–208.
- 53 Bournazos S, Wang TT, Ravetch JV. The role and function of fgamma receptors on myeloid cells. *Microbiol Spectr* 2016;**4**. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0045-2016>.
- 54 Hayee B, Rahman FZ, Tempero J *et al*. The neutrophil respiratory burst and bacterial digestion in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2011;**56**:1482–8.
- 55 Jurickova I, Collins MH, Chalk C *et al*. 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;**172**:455–65.
- 56 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;**268**:74–87.
- 57 Pariente B, Mary JY, Danese S *et al*. Development of the Lemann index to assess digestive tract damage in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2015;**148**:52–63 e3.
- 58 Siegel CA, Whitman CB, Spiegel BMR *et al*. Development of an index to define overall disease severity in IBD. *Gut* 2018;**67**:244–54.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Fig. S1. Assessment of disease severity. (a) Patient distribution according to clinical and endoscopic activity scores ($n = 73$). HBI remission: < 5, mild disease: 5–7, moderate disease: 8–16, severe disease: > 16. SES-CD: remission 0–2, mild disease: 3–6 moderate disease: 7–15 severe disease: ≥ 16 . (b) Correlation between HBI and SES-CD among patients with active disease according to HBI ($n = 23$) (Spearman's rank correlation coefficient).

Fig. S2. Frequencies of colonic and circulating neutrophils. (a) Frequencies of colonic CD45⁺ cells according to disease activity (active disease $n = 57$, complete mucosal healing $n = 12$ and healthy controls $n = 10$). Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. (b) Frequencies of colonic neutrophils according to treatment among patients with endoscopic active disease. (c) Frequencies of circulating neutrophils according to disease behaviour **left panel** and according to treatment (among patients with endoscopic active disease) **right panel**. Kruskal-Wallis test was used to determine any statistical difference between groups. (d) Correlations between mucosal neutrophil frequencies and SES-CD, in endoscopic active non stricturing non penetrating disease (BI) ($n = 39$), (Pearson correlation coefficient). ** $P < 0.01$.

Fig. S3. Mucosal basophils infiltration correlated with SES-CD. Frequencies of mucosal basophils among (a) patients with active or inactive disease (Mann Whitney U test) and (b) subgroups according to disease behaviour (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test). (c) Correlation between the frequency of mucosal basophils and SES-CD ($n = 73$, Pearson correlation coefficient). Frequencies of colonic mast cells among (d) patients with active or inactive disease

(Mann Whitney U test), and (e) subgroups according to disease behaviour (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test) * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

Fig. S4. CD66b and CD64 expression on colonic and circulating neutrophils. (a) CD66b MFI on colonic neutrophils and CD64 MFI on circulating neutrophils according to treatment groups among patients with endoscopic active disease (Kruskal-Wallis test). (b) Correlation between CD66b on colonic neutrophils and SES-CD among individuals with ileocolonic disease "L3" ($n = 31$) and patients with endoscopic active B1 disease ($n = 39$), (Pearson correlation coefficient) (c) Correlations between CD64 MFI on circulating neutrophils and SES-CD among patients with ileocolonic disease "L3" ($n = 31$) and endoscopic active B1 disease ($n = 39$), (Pearson correlation coefficient).

Fig. S5. Expression of activation markers on mucosal and circulating neutrophils discriminates disease activity and severity in the entire cohort of CD patients. (a) CD66b MFI on colonic mucosa neutrophils (**left panel**) and CD64 MFI on peripheral blood neutrophils (**middle panel**) according to the presence of complete mucosal healing (SES-CD ≥ 1 : $n = 61$, SES-CD = 0: $n = 12$) (Mann-Whitney U test). Performance of each parameter to discriminate complete mucosal healing from individuals with SES-CD ≥ 1 AUC and their exact binomial confidence interval are presented as well as pairwise comparison of ROC curves (DeLong's test) (**right panel**). (b) CD66b MFI on colonic neutrophils (**left panel**), CD64 MFI on circulating neutrophils (**middle panel**) and neutrophil activation power index (**right panel**) according to endoscopic disease severity (Kruskal-Wallis followed by Dunn's test) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

ANNEXE 3 : INFORMATIONS ADDITIONNELLES: TWO DISTINCT COLONIC CD14⁺ SUBSETS CHARACTERIZED BY SINGLE CELL RNA PROFILING IN CROHN'S DISEASE (RESULTS A)

Supplementary Material and Methods

Human clinical samples

Active CD patients ($n=155$) presented with diarrhea, weight loss or abdominal pain. Endoscopically, the mucosa was eroded and exhibited patchy inflammation, deep ulcers and/or strictures. Histologically, there was architectural distortion; the mucosa was infiltrated by mononuclear or polynuclear cells with or without pathognomonic granuloma. Transmural inflammation was confirmed on surgical samples. No histological data or bacteriological infections suggested a differential diagnosis. CD remission ($n=15$) was defined as patients with endoscopic remission, established as SES-CD ≤ 2 . Noteworthy, SES-CD score was performed by a single gastroenterologist. Healthy control ($n=12$) were asymptomatic individuals undergoing screening colonoscopy. Participants with non-CD colitis were individuals with histologic active colitis with no signs of chronicity (infectious ($n=3$) or drug-induced ($n=1$) colitis). Clinical information is shown in table S4.

Flow cytometry sorting

A. Gating strategies for isolation of CD14⁺CD64^{hi}CD163⁻ (P3) or CD14⁺CD64^{hi}CD163^{hi} (P4) HLADR⁺SIRP α ⁺CD45⁺ subpopulations in inflamed CD colon using FACS Aria II cell sorter are depicted in Figure S5B. **B.** Gating strategies for purification of P3 and P4 cells as well as P3/b and P4/b cells, together with CD4⁺ T cells in inflamed CD colon are shown in Figure 4A and Figure 9D, respectively. **C.** Gating strategies for single cell RNAseq, capturing the entire HLADR⁺SIRP α ⁺CD45⁺ subpopulation of P1, P2, P3, P4 and Px cells in inflamed colon are depicted in Figure 6A. **D.** Gating strategies for purification of CD8⁻CD45RA⁻CD25⁻CD45RO⁺CD62L^{low}CCR6⁺CXCR3⁻ CD4⁺T cells from colon or MLNs, as depicted in Figure S6A.

Single cell RNA-sequencing

Reverse transcription

Single-cells lysates were thawed on ice for 2 minutes, then centrifuged at 2,500rpm at 4°C for 1 minute. Lysates were mixed with 22 μ L (2.2X) of Agencourt RNAClean XP SPRI beads (Beckman-Coulter) and incubated at room temperature for 10 minutes. The 96-well plate was then moved onto a magnet (DynaMag-96 Side Skirted Magnet, Life Technologies) for 5 minutes. Supernatant was subsequently removed, and SPRI beads were washed three times using 100 μ L of freshly prepared 80% ethanol, with care being taken to avoid loss of beads during the washes. Upon completely removing remaining traces of ethanol, SPRI beads were left to dry at room temperature for 10 minutes. Beads were resuspended in every well with 4 μ L of the following Elution Mix: 1 μ L 10 μ M RT primer

[5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3', IDT], 1µL 10 mM dNTP [New England BioLabs], 0.1µL Recombinant RNase-Inhibitor [40 U/µL, Clontech], and 1.9µL nuclease-free water.

The samples were denatured at 72° C for 3 minutes and placed immediately on ice afterwards. 7µL of the Reverse Transcription Mix was subsequently added in every well, consisting of: 2µL 5x RT buffer [Thermo Fisher Scientific], 2µL 5 M Betaine [Sigma-Aldrich], 0.9µL 100mM MgCP2 [Sigma-Aldrich], 1µL 10µM TSO

[5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATrGrG+G-3', Exiqon], 0.25 µL Recombinant RNase-Inhibitor [40 U/µL, Clontech], 0.1µL Maxima H Minus Reverse Transcriptase [200U/µL, Thermo Fisher Scientific], and 0.75µL nuclease-free water. Every well was well mixed with the resuspended beads. Reverse transcription was carried out by incubating the plate at 50°C for 90 minutes, followed by heat inactivation at 85°C for 5 minutes.

PCR pre-amplification and cDNA purification

14µL of PCR Mix was added in each well (0.5µL 10µM PCR primer [5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3', IDT], 12.5µL 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix [KAPA Biosystems], 1µL nuclease-free water), for a final PCR reaction volume of 25µL. The reaction was carried out with an initial incubation at 98°C for 3 minutes, followed by 21 cycles at (98°C for 15 seconds, 67°C for 20 seconds, and 72°C for 6 minutes) and a final extension at 72°C for 5 minutes.

PCR products were purified by mixing them with 20µL (0.8X) of Agencourt AMPureXP SPRI beads (Beckman-Coulter), followed by a 6 minutes incubation period at room temperature. The plate was then placed onto a magnet for 6 minutes prior to removing the supernatant. SPRI beads were washed twice with 100µL of freshly prepared 70% ethanol, with care being taken to avoid loss of beads during the washes. Upon removing all residual ethanol traces, SPRI beads were left to dry at room temperature for 10 minutes. The beads were then resuspended in 20µL of TE buffer (Teknova) and incubated at room temperature for 5 minutes. The plate was placed on the magnet for 5 minutes prior to transferring the supernatant containing the amplified cDNA to a new 96-well plate. This cDNA SPRI clean-up procedure was repeated a second time to remove all residual primer dimers. The concentration of amplified cDNA was measured on the Synergy H1 Hybrid Microplate Reader (BioTek) using the Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific). The cDNA size distribution of few selected wells was assessed on a High-Sensitivity Bioanalyzer Chip (Agilent). Expected single cell cDNA quantification was around 0.5-2 ng/µL with size distribution sharply peaking around 2kb.

Library preparation

Library preparation was carried out using the Nextera XT DNA Sample Kit (Illumina) with custom indexing adapters, allowing 384 single cell libraries to be simultaneously generated in a 384-well PCR plate (Eppendorf). For each library, the amplified cDNA was normalized to a 0.15-0.20ng/µL concentration range. The tagmentation reaction consisted of mixing 0.625µL of

normalized cDNA with 1.25 μ L of Tagmentation DNA (TD) Buffer and 0.625 μ L of Amplicon Tagment enzyme Mix (ATM). The 2.5 μ L reaction was incubated at 55°C for 10 minutes and then immediately placed on ice upon completing this incubation step. The reaction was quenched with 0.625 μ L of Neutralize Tagment (NT) Buffer and incubated at room temperature for 10 minutes. The libraries were amplified by adding 1.875 μ L of Nexstera PCR Master (NPM) Mix, 0.625 μ L of 10 μ M i5 adapter

(5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i5]TCGTCGGCAGCGTC-3', IDT, where [i5] signifies the 8 bp i5 barcode sequence (see below for sequences)), and 0.625 μ L of 10 μ M i7 adapter (5'CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7] GTCTCGTGGGCTCGG -3', IDT, where [i7] represents the reverse-complement of the 8 bp i7 barcode sequence (see below for sequences)). The PCR was carried out at an initial incubation at 72°C for 3 minutes, 95°C for 30 seconds, followed by 12 cycles of (95°C for 10 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute), and a final extension at 72°C for 5 minutes. Following PCR amplification, 2.5 μ L of each library were pooled together in a 2.0 mL Eppendorf tube. The pool was mixed with 864 μ L (0.9X ratio for 2.5 μ L of 384 cells pooled together) of Agencourt AMPureXP SPRI beads (Beckman-Coulter) and incubated at room temperature for 5 minutes. The pool was then placed on a magnet (DynaMag-2, Life Technologies) and incubated for 5 minutes. The supernatant was removed and the SPRI beads were washed twice with 1mL of freshly prepared 70% ethanol. Upon removing all residual ethanol traces, the SPRI beads were left to dry at room temperature for 10 minutes. The beads were resuspended in 100 μ L of nuclease-free water and incubated at room temperature for 5 minutes. The tube was then placed back on the magnet for 3 minutes prior to transferring the supernatant to a new 1.5mL Eppendorf tube. This SPRI clean-up procedure of the library was repeated a second time to remove all residual primer dimers, using the same approach. The concentration of the pooled libraries was measured using the Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), and the library size distribution measured on a High-Sensitivity Bioanalyzer Chip (Agilent). Expected size distribution of 300-700bp. Pooled samples were sequenced as paired-end on a NextSeq 500 sequencing system (Illumina) using the 75 cycles NextSeq 500/550 High Output kit v2 (catalog number FC-404-2005).

i5 barcodes: AAGTAGAG, ACACGATC, CTCTACTT, TCCTTGGT, TGTTCCGA

i7 barcodes: AGTTGCTT, AATGTTCT, CACATCCT, AAGACACT, TGTCGGAT, TCGCCTTG, AGCAATTC, TCTCGGTC, AACTTGAC, ACTAAGAC, AGGTGCGA

Single-cell RNA-sequencing quality filtering, batch correction and data analysis.

Low-quality cells were filtered out from the dataset based on a threshold of having at least 3000 unique genes detected, where a gene was considered detected if it had at least one transcript in at least 3 cells. This filter discarded 86 out of the 414 samples, leaving 328 samples in the dataset. Next, genes which were detected in less than 3 cells were also discarded such that 17866 genes across 328 cells were retained. Four samples having more than 7800 genes were discarded as likely doublets. Additional quality filters included percent mitochondrial and percent ribosomal genes detected in each cells with maximum of 6.5% and 18% accepted respectively, further removing 10 cells from the dataset (Figure S8A). Thus, after basic quality control filtering, 314 cells were retained.

Next, principal component analysis (PCA) was carried out (*prcomp* function in R), revealing two outlier populations delineated by PC1 (“outliers_PC1”, $n=12$ cells) and PC5 (“outliers_PC5”, $n=8$ cells) (Figure S8B). We noted that both “outliers_PC1” and “outliers_PC5” populations had relatively low ribosomal and mitochondrial gene content compared to the rest of the profiled single cells, suggesting that they are not of low quality (Figure S8C). The “outliers_PC5” group also had higher number of genes, but similar number of genes were detected in other cells suggesting that they are not simply doublets (Figures S8B and S8C).

While the exact identity of these populations is difficult to pinpoint, examination of the genes that are characteristic for each population revealed that one of them consists of CD66b/CEACAM8⁺ cells (possible contaminants from the CD66b gate) and the other contained epithelial (EPCAM⁺) and cytolytic (CD27⁺) cells (Figure S8D). Since these populations clearly separated away from the populations of interest, and due to their uncertain identity, they were excluded from further analysis.

Ultimately, the 294 sequenced cells that passed all QC filters consisted of 73 P1, 55 P2, 66 P3, 52 P4, and 48 Px samples from three patients, with 46 cells from patient x, 114 cells from patient y, and 134 cells from the patient z (Figure 6C).

Potential batch effects arising from the processing of each individual sample were corrected by fitting a linear model with the patient indicator variable and retaining the residual gene expression as described in Villani *et al*, 2017 (Villani and Satija, 2017). PCA analysis was then repeated on the remaining dataset of $314-12-8=294$ cells and all genes, and the cell loadings for the first 10 principle components were used for unbiased cluster detection (Louvain clustering algorithm performed via the FindClusters method in Seurat package with parameters: $k.param=20$, resolution-0.8) and visualization in two dimensions (*t*-distributed stochastic neighbor embedding (*t*-SNE)) (Figure 6B). This unsupervised procedure identified six distinct clusters. The 294 sequenced cells were distributed across the 6 clusters, with 14 cells in cluster A, 60 in cluster B, 18 in cluster C, 32 in cluster D, 98 in cluster E, and 72 in cluster F (Figure 6).

To find discriminating genes for each of the clusters, we used the area under the receiver-operator curve (AUC) as main criteria – for each cluster, each gene is evaluated for its ability to predict whether cells can correctly be assigned that cluster versus all other clusters (FindAllMarkers function, $test.use="roc"$). Genes were selected as discriminating if they passed all of the following conditions: (1) minimum AUC of 0.75, (2) minimum absolute log fold-change of 1.2, (3) the difference between the percent of cells expressing the gene in the cluster and the percent of expressing cells in all other clusters is greater than 0.5 OR this difference is greater than 0.15 but at least 80% of cells in the cluster express the gene (note that this last condition is intended to capture genes which are more discriminating or very consistently expressed in the cluster of interest). There were 349 genes that satisfied the filtering criteria (Table S3).

Upon removing PC1 and PC5 outlier clusters and re-analyzing remaining single cells in principal component space, PC1 and PC2 seemed to best capture the cell identity of cells comprised by cluster D in *t*-SNE plot reported in Figure 6B. Unlike cells comprised within other clusters defined in Figure 6B by set of discriminating genes that are over-expressed, cells from cluster D

were most uniquely defined by a set of genes related to the ubiquitin-proteasome system (UPS) commonly down-regulated. Supplementary Figure S7C reports genes of the UPS that are down-regulated in cells from cluster D with an average log fold change less than -0.5.

Supplementary Tables

Table S1. SES-CD score

	0	1	2	3
Size of ulcers (cm)	None	0.1-0.5 cm	0.5-2 cm	>2 cm
Ulcerated surface (%)	None	< 10 %	10-30 %	>30 %
Affected surface (%)	None	< 50 %	50-75 %	>75 %
Presence of narrowings	None	Single, can be passed	Multiple, can be passed	Cannot be passed

Table S2. FACS and cluster identities of 294 cells included in scRNAseq analysis

Cell identity	Patient	Sorting gate ID	nGene	Fraction.mito	Fraction.ribo	Cluster
P1_Z_LPMC_P2_S02_S213	Z	P1	3367	0,02	0,06	E
P1_Z_LPMC_P2_S16_S289	Z	P1	4532	0,01	0,03	E
P1_Z_LPMC_P2_S19_S295	Z	P1	4885	0,01	0,05	E
P1_X_S26_S86	X	P1	3721	0,04	0,09	E
P1_X_S35_S104	X	P1	5471	0,04	0,09	E
P1_Y_S05_S65	Y	P1	4104	0,03	0,09	E
P1_Y_S11_S77	Y	P1	5055	0,03	0,07	E
P1_Y_S14_S182	Y	P1	5655	0,03	0,14	E
P1_Y_S20_S120	Y	P1	4014	0,04	0,05	E
P1_Y_S21_S122	Y	P1	6266	0,02	0,16	E
P1_Y_S24_S128	Y	P1	5642	0,01	0,05	E
P4_Z_LPMC_P1_S31_S24	Z	P4	3037	0,01	0,08	E
P4_Z_LPMC_P2_S12_S23	Z	P4	4328	0,01	0,06	E
P4_Z_LPMC_P2_S14_S51	Z	P4	3063	0,01	0,01	E
P4_Y_S10_S19	Y	P4	6400	0,05	0,08	E
P4_Y_S13_S25	Y	P4	5317	0,01	0,12	E
P4_Y_S25_S147	Y	P4	6762	0,01	0,08	E
P3_Z_LPMC_P1_S20_S298	Z	P3	4728	0,03	0,05	E
P3_Z_LPMC_P1_S21_S300	Z	P3	4088	0,01	0,02	E
P3_Z_LPMC_P1_S23_S304	Z	P3	4946	0,01	0,03	E
P3_Z_LPMC_P1_S24_S306	Z	P3	4466	0,02	0,05	E
P3_Z_LPMC_P1_S25_S308	Z	P3	4225	0,02	0,02	E
P3_Z_LPMC_P1_S27_S312	Z	P3	4831	0,01	0,03	E
P3_Z_LPMC_P1_S28_S340	Z	P3	3336	0,01	0,05	E
P3_Z_LPMC_P1_S32_S348	Z	P3	4158	0,01	0,02	E
P3_Z_LPMC_P1_S34_S352	Z	P3	4320	0,02	0,05	E
P3_Z_LPMC_P1_S35_S354	Z	P3	4330	0,01	0,02	E
P3_Z_LPMC_P1_S36_S356	Z	P3	4625	0,02	0,04	E
P3_Z_LPMC_P2_S02_S299	Z	P3	4627	0,02	0,03	E
P3_Z_LPMC_P2_S04_S303	Z	P3	4411	0,01	0,02	E
P3_Z_LPMC_P2_S05_S305	Z	P3	4124	0,01	0,01	E
P3_Z_LPMC_P2_S06_S307	Z	P3	4806	0,02	0,04	E
P3_Z_LPMC_P2_S07_S309	Z	P3	4406	0,01	0,02	E
P3_Z_LPMC_P2_S08_S311	Z	P3	4212	0,01	0,03	E
P3_Z_LPMC_P2_S10_S341	Z	P3	3157	0,00	0,02	E
P3_Z_LPMC_P2_S12_S345	Z	P3	4229	0,02	0,05	E
P3_Z_LPMC_P2_S16_S353	Z	P3	3822	0,01	0,04	E
P3_X_S32_S66	X	P3	4898	0,04	0,03	E
P3_X_S33_S68	X	P3	5025	0,03	0,03	E
P3_X_S34_S70	X	P3	3770	0,02	0,02	E
P3_X_S35_S72	X	P3	4456	0,04	0,06	E
P3_X_S36_S74	X	P3	5643	0,02	0,09	E
P3_X_S38_S78	X	P3	4502	0,03	0,04	E
P3_X_S40_S82	X	P3	5528	0,02	0,03	E

P3_Y_S03_S101	Y	P3	5298	0,02	0,08	E
P3_Y_S04_S103	Y	P3	5425	0,00	0,03	E
P3_Y_S05_S105	Y	P3	5367	0,00	0,13	E
P3_Y_S07_S109	Y	P3	3431	0,03	0,11	E
P3_Y_S09_S113	Y	P3	4895	0,03	0,04	E
P3_Y_S11_S117	Y	P3	5099	0,03	0,08	E
P3_Y_S12_S119	Y	P3	4635	0,02	0,08	E
P3_Y_S13_S121	Y	P3	6997	0,02	0,03	E
P3_Y_S14_S123	Y	P3	6692	0,01	0,10	E
P3_Y_S15_S125	Y	P3	5683	0,02	0,07	E
P3_Y_S16_S146	Y	P3	5556	0,03	0,08	E
P3_Y_S17_S148	Y	P3	6014	0,02	0,16	E
P3_Y_S18_S150	Y	P3	4559	0,02	0,07	E
P3_Y_S19_S152	Y	P3	6092	0,02	0,07	E
P3_Y_S21_S156	Y	P3	4490	0,03	0,05	E
P3_Y_S22_S158	Y	P3	3551	0,03	0,09	E
P3_Y_S24_S162	Y	P3	5579	0,02	0,11	E
P3_Y_S25_S164	Y	P3	5747	0,02	0,04	E
P3_Y_S26_S166	Y	P3	5359	0,02	0,07	E
P3_Y_S27_S168	Y	P3	5884	0,02	0,04	E
P3_Y_S28_S170	Y	P3	5025	0,02	0,04	E
P3_Y_S30_S174	Y	P3	5173	0,03	0,07	E
Px_Z_LPMC_P1_S21_S66	Z	Px	4836	0,01	0,04	E
Px_Z_LPMC_P1_S23_S70	Z	Px	3762	0,01	0,04	E
Px_Z_LPMC_P1_S24_S72	Z	Px	3463	0,02	0,07	E
Px_Z_LPMC_P1_S25_S98	Z	Px	4146	0,01	0,02	E
Px_Z_LPMC_P1_S26_S100	Z	Px	4435	0,01	0,04	E
Px_Z_LPMC_P1_S32_S112	Z	Px	4749	0,02	0,04	E
Px_Z_LPMC_P1_S33_S114	Z	Px	3488	0,05	0,03	E
Px_Z_LPMC_P1_S38_S148	Z	Px	3603	0,01	0,02	E
Px_Z_LPMC_P2_S04_S69	Z	Px	4002	0,01	0,03	E
Px_Z_LPMC_P2_S06_S97	Z	Px	4020	0,03	0,02	E
Px_Z_LPMC_P2_S07_S99	Z	Px	4063	0,02	0,03	E
Px_Z_LPMC_P2_S08_S101	Z	Px	4332	0,01	0,02	E
Px_Z_LPMC_P2_S11_S107	Z	Px	3800	0,01	0,03	E
Px_Z_LPMC_P2_S17_S119	Z	Px	5393	0,01	0,05	E
Px_Z_LPMC_P2_S19_S147	Z	Px	3549	0,01	0,01	E
Px_X_S18_S50	X	Px	4939	0,04	0,04	E
Px_X_S20_S54	X	Px	3737	0,02	0,03	E
Px_X_S21_S56	X	Px	3829	0,01	0,01	E
Px_X_S22_S58	X	Px	4573	0,02	0,03	E
Px_X_S24_S62	X	Px	3887	0,02	0,03	E
Px_Y_S01_S79	Y	Px	4712	0,00	0,09	E
Px_Y_S02_S81	Y	Px	5330	0,01	0,10	E
Px_Y_S03_S83	Y	Px	4927	0,03	0,06	E
Px_Y_S04_S85	Y	Px	3471	0,01	0,07	E
Px_Y_S05_S87	Y	Px	4833	0,03	0,06	E

Px_Y_S07_S91	Y	Px	5476	0,03	0,07	E
Px_Y_S08_S93	Y	Px	4456	0,03	0,04	E
Px_Y_S09_S95	Y	Px	5034	0,02	0,03	E
Px_Y_S13_S136	Y	Px	4984	0,03	0,13	E
Px_Y_S14_S138	Y	Px	5048	0,02	0,12	E
Px_Y_S15_S140	Y	Px	5254	0,02	0,08	E
Px_Y_S16_S142	Y	Px	5565	0,01	0,06	E
P1_Y_S02_S59	Y	P1	4549	0,03	0,08	F
P1_Y_S03_S61	Y	P1	4623	0,03	0,02	F
P1_Y_S07_S69	Y	P1	4367	0,02	0,04	F
P1_Y_S09_S73	Y	P1	4372	0,00	0,06	F
P1_Y_S10_S75	Y	P1	6155	0,00	0,06	F
P1_Y_S13_S181	Y	P1	5744	0,02	0,04	F
P1_Y_S18_S116	Y	P1	6084	0,01	0,07	F
P1_Y_S19_S118	Y	P1	5704	0,02	0,05	F
P1_Y_S23_S126	Y	P1	5703	0,02	0,05	F
P2_Z_LPMC_P2_S19_S209	Z	P2	5921	0,03	0,08	F
P4_Z_LPMC_P1_S22_S6	Z	P4	5348	0,01	0,03	F
P4_Z_LPMC_P1_S25_S12	Z	P4	4459	0,03	0,05	F
P4_Z_LPMC_P1_S27_S16	Z	P4	4485	0,01	0,01	F
P4_Z_LPMC_P1_S37_S60	Z	P4	5868	0,02	0,03	F
P4_Z_LPMC_P2_S01_S1	Z	P4	5490	0,02	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S05_S9	Z	P4	5566	0,01	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S06_S11	Z	P4	5072	0,01	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S07_S13	Z	P4	4947	0,01	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S08_S15	Z	P4	5560	0,01	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S09_S17	Z	P4	5233	0,02	0,02	F
P4_Z_LPMC_P2_S16_S55	Z	P4	4443	0,01	0,01	F
P4_Z_LPMC_P2_S17_S57	Z	P4	5329	0,02	0,01	F
P4_X_S28_S26	X	P4	6654	0,03	0,03	F
P4_X_S29_S28	X	P4	5543	0,03	0,03	F
P4_X_S30_S30	X	P4	4751	0,03	0,04	F
P4_X_S33_S36	X	P4	5151	0,03	0,03	F
P4_X_S34_S38	X	P4	3899	0,02	0,05	F
P4_Y_S03_S5	Y	P4	4464	0,03	0,06	F
P4_Y_S04_S7	Y	P4	5967	0,01	0,02	F
P4_Y_S06_S11	Y	P4	3600	0,03	0,08	F
P4_Y_S07_S13	Y	P4	5010	0,03	0,03	F
P4_Y_S08_S15	Y	P4	6805	0,01	0,01	F
P4_Y_S09_S17	Y	P4	5728	0,03	0,04	F
P4_Y_S11_S21	Y	P4	7111	0,02	0,03	F
P4_Y_S12_S23	Y	P4	5344	0,02	0,04	F
P4_Y_S14_S27	Y	P4	6480	0,01	0,03	F
P4_Y_S16_S129	Y	P4	7100	0,02	0,03	F
P4_Y_S17_S131	Y	P4	6512	0,03	0,04	F
P4_Y_S18_S133	Y	P4	4653	0,03	0,04	F
P4_Y_S19_S135	Y	P4	5407	0,02	0,03	F

P4_Y_S20_S137	Y	P4	5206	0,03	0,06	F
P4_Y_S21_S139	Y	P4	6048	0,04	0,03	F
P4_Y_S22_S141	Y	P4	5596	0,01	0,08	F
P4_Y_S23_S143	Y	P4	6420	0,01	0,03	F
P4_Y_S24_S145	Y	P4	7015	0,02	0,06	F
P4_Y_S26_S149	Y	P4	6295	0,03	0,07	F
P3_Z_LPMC_P1_S29_S342	Z	P3	5193	0,01	0,03	F
P3_Z_LPMC_P1_S33_S350	Z	P3	4620	0,01	0,03	F
P3_Z_LPMC_P2_S09_S339	Z	P3	3537	0,02	0,06	F
P3_Z_LPMC_P2_S15_S351	Z	P3	4035	0,01	0,03	F
P3_Z_LPMC_P2_S19_S359	Z	P3	3997	0,01	0,04	F
P3_X_S37_S76	X	P3	6331	0,02	0,04	F
P3_Y_S01_S97	Y	P3	6501	0,00	0,09	F
P3_Y_S06_S107	Y	P3	6609	0,01	0,06	F
P3_Y_S08_S111	Y	P3	6063	0,03	0,09	F
P3_Y_S10_S115	Y	P3	5987	0,03	0,05	F
P3_Y_S20_S154	Y	P3	6078	0,03	0,03	F
P3_Y_S23_S160	Y	P3	7296	0,02	0,09	F
P3_Y_S29_S172	Y	P3	6335	0,02	0,08	F
P3_Y_S31_S176	Y	P3	7024	0,02	0,06	F
Px_Z_LPMC_P1_S37_S146	Z	Px	4725	0,01	0,02	F
Px_Z_LPMC_P2_S05_S71	Z	Px	5465	0,01	0,01	F
Px_Z_LPMC_P2_S09_S103	Z	Px	4389	0,02	0,06	F
Px_Z_LPMC_P2_S10_S105	Z	Px	5334	0,01	0,03	F
Px_Z_LPMC_P2_S13_S111	Z	Px	4842	0,01	0,02	F
Px_Z_LPMC_P2_S15_S115	Z	Px	4984	0,01	0,02	F
Px_Z_LPMC_P2_S16_S117	Z	Px	5358	0,01	0,02	F
Px_X_S19_S52	X	Px	6596	0,02	0,04	F
Px_X_S23_S60	X	Px	4973	0,03	0,05	F
Px_X_S25_S64	X	Px	4713	0,02	0,03	F
Px_Y_S10_S130	Y	Px	5294	0,02	0,04	F
Px_Y_S17_S144	Y	Px	6075	0,03	0,04	F
P1_Z_LPMC_P1_S32_S260	Z	P1	5311	0,03	0,07	B
P1_Z_LPMC_P2_S01_S211	Z	P1	4846	0,00	0,01	B
P1_Z_LPMC_P2_S05_S243	Z	P1	4057	0,00	0,01	B
P1_Z_LPMC_P2_S06_S245	Z	P1	4289	0,02	0,07	B
P1_Z_LPMC_P2_S07_S247	Z	P1	4618	0,01	0,01	B
P1_Z_LPMC_P2_S13_S259	Z	P1	4751	0,02	0,04	B
P1_Z_MLN_P1_S09_S363	Z	P1	3906	0,03	0,08	B
P1_X_S25_S84	X	P1	5287	0,03	0,07	B
P1_X_S27_S88	X	P1	4563	0,02	0,07	B
P1_X_S28_S90	X	P1	4683	0,04	0,05	B
P1_X_S29_S92	X	P1	5822	0,03	0,07	B
P1_X_S30_S94	X	P1	5638	0,03	0,05	B
P1_X_S31_S96	X	P1	5439	0,03	0,06	B
P1_X_S33_S100	X	P1	6260	0,02	0,05	B
P1_X_S34_S102	X	P1	5314	0,03	0,08	B

P1_X_S36_S106	X	P1	5435	0,02	0,07	B
P1_X_S37_S108	X	P1	4944	0,04	0,07	B
P1_X_S38_S110	X	P1	3929	0,04	0,05	B
P1_Y_S04_S63	Y	P1	5836	0,03	0,05	B
P1_Y_S06_S67	Y	P1	5521	0,03	0,07	B
P1_Y_S08_S71	Y	P1	4980	0,01	0,05	B
P1_Y_S12_S180	Y	P1	5266	0,03	0,09	B
P1_Y_S16_S184	Y	P1	5817	0,02	0,14	B
P1_Y_S17_S114	Y	P1	5727	0,03	0,12	B
P1_Y_S22_S124	Y	P1	6179	0,02	0,09	B
P2_Z_LPMC_P1_S20_S150	Z	P2	5463	0,03	0,06	B
P2_Z_LPMC_P1_S25_S160	Z	P2	5703	0,03	0,12	B
P2_Z_LPMC_P1_S31_S196	Z	P2	4340	0,02	0,07	B
P2_Z_LPMC_P1_S35_S204	Z	P2	6017	0,02	0,10	B
P2_Z_LPMC_P1_S37_S208	Z	P2	5140	0,02	0,05	B
P2_Z_LPMC_P2_S01_S149	Z	P2	5413	0,01	0,09	B
P2_Z_LPMC_P2_S06_S159	Z	P2	4414	0,02	0,06	B
P2_Z_LPMC_P2_S07_S161	Z	P2	4402	0,01	0,08	B
P2_Z_LPMC_P2_S13_S197	Z	P2	4764	0,01	0,03	B
P2_X_S31_S2	X	P2	5722	0,04	0,17	B
P2_X_S32_S4	X	P2	5477	0,00	0,13	B
P2_X_S34_S8	X	P2	6349	0,00	0,15	B
P2_X_S35_S10	X	P2	5641	0,03	0,10	B
P2_X_S36_S12	X	P2	5650	0,04	0,09	B
P2_X_S38_S16	X	P2	4881	0,04	0,11	B
P2_X_S40_S20	X	P2	7233	0,03	0,10	B
P2_Y_S01_S29	Y	P2	4344	0,05	0,04	B
P2_Y_S05_S37	Y	P2	3525	0,04	0,09	B
P2_Y_S06_S39	Y	P2	5511	0,05	0,08	B
P2_Y_S07_S41	Y	P2	5008	0,03	0,07	B
P2_Y_S08_S43	Y	P2	5366	0,06	0,07	B
P2_Y_S11_S49	Y	P2	6298	0,02	0,10	B
P2_Y_S12_S51	Y	P2	7070	0,02	0,18	B
P2_Y_S13_S53	Y	P2	4734	0,03	0,16	B
P2_Y_S14_S55	Y	P2	5192	0,05	0,06	B
P2_Y_S16_S153	Y	P2	5595	0,02	0,15	B
P2_Y_S17_S155	Y	P2	5662	0,04	0,05	B
P2_Y_S18_S157	Y	P2	5591	0,05	0,12	B
P2_Y_S19_S159	Y	P2	4031	0,03	0,13	B
P2_Y_S20_S161	Y	P2	4969	0,05	0,09	B
P2_Y_S23_S167	Y	P2	4789	0,04	0,10	B
P2_Y_S25_S171	Y	P2	6478	0,02	0,11	B
P2_Y_S26_S173	Y	P2	6607	0,02	0,10	B
P2_Y_S27_S175	Y	P2	4579	0,00	0,14	B
P2_Y_S29_S178	Y	P2	6570	0,02	0,11	B
P1_Z_LPMC_P1_S29_S254	Z	P1	3922	0,06	0,02	D
P1_Z_LPMC_P1_S33_S262	Z	P1	3185	0,01	0,03	D

P1_Z_LPMC_P1_S34_S264	Z	P1	3556	0,05	0,04	D
P1_Z_LPMC_P2_S09_S251	Z	P1	3079	0,06	0,00	D
P1_Z_LPMC_P2_S17_S291	Z	P1	3099	0,00	0,06	D
P1_Z_MLN_P1_S02_S323	Z	P1	4000	0,05	0,06	D
P1_Z_MLN_P1_S06_S331	Z	P1	4203	0,04	0,08	D
P1_Z_MLN_P2_S21_S324	Z	P1	3178	0,02	0,13	D
P1_Z_MLN_P2_S25_S332	Z	P1	3287	0,02	0,02	D
P1_Z_MLN_P2_S34_S376	Z	P1	3553	0,06	0,01	D
P1_Y_S01_S57	Y	P1	5073	0,06	0,03	D
P2_Z_LPMC_P2_S11_S193	Z	P2	3632	0,00	0,00	D
P2_Z_LPMC_P2_S14_S199	Z	P2	3092	0,04	0,00	D
P2_Y_S15_S151	Y	P2	3508	0,02	0,02	D
P2_Y_S28_S177	Y	P2	5228	0,05	0,02	D
P4_Z_LPMC_P1_S23_S8	Z	P4	3568	0,01	0,08	D
P4_Z_LPMC_P1_S26_S14	Z	P4	3596	0,02	0,17	D
P4_Z_LPMC_P1_S28_S18	Z	P4	4280	0,02	0,03	D
P4_Z_LPMC_P1_S30_S22	Z	P4	3934	0,01	0,03	D
P4_Z_LPMC_P1_S34_S54	Z	P4	3632	0,01	0,04	D
P4_Z_LPMC_P1_S35_S56	Z	P4	4042	0,02	0,07	D
P4_X_S32_S34	X	P4	3550	0,04	0,01	D
P4_X_S35_S40	X	P4	3019	0,01	0,01	D
P4_X_S39_S48	X	P4	5254	0,05	0,04	D
P4_Y_S02_S3	Y	P4	3001	0,01	0,16	D
P3_Z_LPMC_P1_S22_S302	Z	P3	3180	0,05	0,07	D
P3_Z_LPMC_P2_S11_S343	Z	P3	3515	0,01	0,05	D
P3_Z_LPMC_P2_S14_S349	Z	P3	3167	0,06	0,02	D
Px_Z_LPMC_P1_S20_S64	Z	Px	5800	0,02	0,02	D
Px_Z_LPMC_P1_S27_S102	Z	Px	3309	0,02	0,02	D
Px_Z_LPMC_P1_S30_S108	Z	Px	3326	0,03	0,02	D
Px_Y_S06_S89	Y	Px	4330	0,04	0,02	D
P1_Z_LPMC_P2_S11_S255	Z	P1	5322	0,02	0,06	C
P1_Z_MLN_P1_S03_S325	Z	P1	4611	0,04	0,16	C
P1_Z_MLN_P1_S05_S329	Z	P1	5441	0,03	0,11	C
P1_Z_MLN_P1_S07_S333	Z	P1	4753	0,04	0,11	C
P1_Z_MLN_P1_S10_S365	Z	P1	4376	0,03	0,08	C
P1_Z_MLN_P1_S13_S371	Z	P1	5321	0,03	0,06	C
P1_Z_MLN_P1_S16_S377	Z	P1	4639	0,05	0,08	C
P1_Z_MLN_P1_S18_S381	Z	P1	4309	0,04	0,13	C
P1_Z_MLN_P2_S27_S336	Z	P1	4656	0,04	0,11	C
P1_Z_MLN_P2_S28_S364	Z	P1	4036	0,03	0,17	C
P1_Z_MLN_P2_S29_S366	Z	P1	3670	0,03	0,09	C
P1_Z_MLN_P2_S30_S368	Z	P1	4527	0,04	0,10	C
P1_Z_MLN_P2_S31_S370	Z	P1	4079	0,04	0,11	C
P1_Z_MLN_P2_S32_S372	Z	P1	4604	0,03	0,12	C
P1_Z_MLN_P2_S33_S374	Z	P1	4030	0,04	0,08	C
P1_Z_MLN_P2_S35_S378	Z	P1	5106	0,03	0,09	C
P1_Z_MLN_P2_S37_S382	Z	P1	4693	0,04	0,06	C

P2_Y_S22_S165	Y	P2	5950	0,03	0,17	C
P2_Z_LPMC_P1_S21_S152	Z	P2	4331	0,01	0,08	A
P2_Z_LPMC_P1_S22_S154	Z	P2	5250	0,01	0,07	A
P2_Z_LPMC_P1_S24_S158	Z	P2	4415	0,01	0,09	A
P2_Z_LPMC_P1_S26_S162	Z	P2	4665	0,01	0,05	A
P2_Z_LPMC_P1_S28_S166	Z	P2	4780	0,02	0,03	A
P2_Z_LPMC_P1_S34_S202	Z	P2	5016	0,01	0,08	A
P2_Z_LPMC_P1_S38_S210	Z	P2	4341	0,00	0,08	A
P2_Z_LPMC_P2_S03_S153	Z	P2	5070	0,02	0,07	A
P2_Z_LPMC_P2_S05_S157	Z	P2	4957	0,02	0,07	A
P2_Z_LPMC_P2_S08_S163	Z	P2	5804	0,02	0,05	A
P2_Z_LPMC_P2_S09_S165	Z	P2	3534	0,01	0,07	A
P2_X_S37_S14	X	P2	3963	0,03	0,07	A
P2_X_S39_S18	X	P2	5673	0,02	0,10	A
P2_Y_S02_S31	Y	P2	4917	0,02	0,14	A

Table S3. List of discriminating genes identified through scRNAseq analysis

Gene	myAUC	avg_logFC	pct.1	pct.2	Cluster
TREM1	0,900	2,502	0,939	0,362	E
FCN1	0,890	2,785	0,949	0,515	E
PLAUR	0,883	2,247	0,990	0,832	E
RAB20	0,861	1,634	0,980	0,587	E
OLR1	0,858	2,535	0,939	0,48	E
SERPINA1	0,857	1,468	0,990	0,714	E
SLC11A1	0,854	2,181	0,908	0,464	E
TIMP1	0,838	1,976	0,980	0,821	E
GPCPD1	0,836	2,082	0,980	0,684	E
CCRL2	0,826	1,883	0,908	0,51	E
THBS1	0,825	2,327	0,908	0,495	E
IL1RN	0,821	3,037	0,898	0,536	E
C5AR1	0,819	1,618	0,949	0,551	E
LCP2	0,814	1,540	0,969	0,776	E
CD300E	0,809	2,195	0,867	0,464	E
C15ORF48	0,803	1,845	0,949	0,582	E
PPIF	0,802	1,804	0,949	0,765	E
ACSL1	0,791	2,677	0,827	0,541	E
G0S2	0,789	1,339	0,959	0,648	E
APOBEC3A	0,786	2,948	0,837	0,556	E
GK	0,785	1,699	0,969	0,689	E
KYNU	0,784	1,219	0,980	0,684	E
FPR1	0,784	1,213	0,949	0,571	E
IVNS1ABP	0,772	1,964	0,918	0,755	E
EREG	0,771	2,369	0,867	0,5	E
S100A9	0,763	1,645	0,908	0,587	E
FCAR	0,760	2,636	0,857	0,694	E
SLC2A3	0,757	1,552	0,980	0,806	E
UPP1	0,754	1,414	0,888	0,577	E
SAMSN1	0,751	1,553	0,908	0,673	E
PLD3	0,920	2,785	0,958	0,495	F
C1QC	0,918	2,529	0,944	0,446	F
SLCO2B1	0,916	2,174	0,944	0,266	F
TMEM176B	0,905	1,645	1,000	0,631	F
C1QA	0,901	2,009	0,944	0,491	F
CSF1R	0,897	1,596	0,986	0,775	F
C1QB	0,896	2,281	0,917	0,473	F
CTSD	0,895	2,459	1,000	0,779	F
CTSA	0,885	1,673	0,986	0,694	F
LIPA	0,881	2,535	0,944	0,613	F
STAB1	0,868	1,973	0,931	0,45	F
TMEM176A	0,862	1,372	0,986	0,563	F
FUCA1	0,859	4,223	0,819	0,243	F
FCGRT	0,849	1,385	1,000	0,784	F

C2	0,848	2,395	0,847	0,378	F
ACP5	0,846	2,461	0,972	0,626	F
SCPEP1	0,843	1,449	0,958	0,545	F
CMKLR1	0,842	1,868	0,792	0,14	F
CD209	0,841	1,906	0,903	0,577	F
PRDX1	0,839	1,538	0,972	0,775	F
SLC7A8	0,838	2,700	0,722	0,09	F
CD14	0,830	1,230	0,958	0,631	F
GM2A	0,827	1,756	0,931	0,64	F
IDH1	0,826	1,709	0,861	0,315	F
PLA2G7	0,826	1,626	0,944	0,486	F
AKR1B1	0,821	1,809	0,861	0,342	F
SGPL1	0,820	1,758	0,931	0,644	F
FCGR3A	0,815	2,249	0,889	0,5	F
LGALS3BP	0,814	1,762	0,861	0,369	F
SLC40A1	0,812	1,400	0,778	0,243	F
VSIG4	0,810	2,545	0,764	0,207	F
OLFML2B	0,809	2,188	0,694	0,117	F
NRP1	0,808	1,965	0,833	0,342	F
NR1H3	0,806	3,357	0,681	0,122	F
MRC1	0,803	1,236	0,958	0,509	F
DAB2	0,802	1,332	0,806	0,284	F
LPAR6	0,800	1,630	0,861	0,32	F
DNASE2	0,799	1,874	0,806	0,401	F
ACP2	0,794	1,803	0,736	0,198	F
MAF	0,789	1,297	0,708	0,149	F
MERTK	0,787	2,545	0,653	0,104	F
CD163	0,787	1,679	0,861	0,423	F
CREG1	0,786	1,491	0,875	0,495	F
PLXND1	0,782	1,295	0,778	0,252	F
CORO1B	0,781	1,246	0,917	0,514	F
FOLR2	0,776	1,893	0,681	0,144	F
CD163L1	0,773	2,771	0,611	0,108	F
VAT1	0,768	1,970	0,667	0,162	F
CAPG	0,768	1,432	0,903	0,572	F
FLVCR2	0,766	1,379	0,722	0,189	F
CST7	0,862	2,183	0,917	0,355	B
NAPSB	0,850	1,392	1,000	0,556	B
LTB	0,826	3,021	0,750	0,137	B
ADAM19	0,806	1,381	0,933	0,496	B
TUBA1A	0,797	1,413	0,950	0,765	B
SPIB	0,796	2,033	0,983	0,829	B
PKIB	0,788	3,194	0,650	0,111	B
RALA	0,788	1,260	0,950	0,65	B
FAM110A	0,780	2,043	0,817	0,41	B
PPA1	0,778	1,599	0,950	0,782	B
SPINT2	0,766	1,586	0,933	0,692	B

LOC100131551	0,870	3,452	0,938	0,744	D
DICER1-AS1	0,858	2,301	0,906	0,706	D
PDE6A	0,858	2,197	0,969	0,813	D
GREB1	0,856	2,038	1,000	0,821	D
CDHR4	0,846	3,201	0,938	0,74	D
OSBPL10	0,846	2,110	0,938	0,71	D
AK055666	0,846	1,914	0,938	0,626	D
AKAP5	0,846	1,613	0,906	0,721	D
PNMA2	0,844	2,215	0,938	0,687	D
ERCC4	0,843	1,288	1,000	0,802	D
PTK6	0,841	2,921	0,906	0,607	D
AX746683	0,836	2,175	0,938	0,771	D
AX746734	0,835	3,079	0,906	0,74	D
CCDC120	0,834	2,565	0,938	0,725	D
KDELC2	0,834	2,185	0,938	0,664	D
PRR19	0,829	1,822	0,969	0,786	D
AX746567	0,828	3,245	0,938	0,706	D
ZNF713	0,820	2,381	0,844	0,599	D
AK056524	0,818	2,566	0,875	0,725	D
FER	0,818	2,386	0,906	0,634	D
ZNF329	0,815	2,545	0,875	0,664	D
AK092965	0,815	1,897	0,906	0,588	D
MED18	0,815	1,763	0,906	0,74	D
TMEM213	0,812	2,128	0,844	0,679	D
ZNF526	0,812	1,650	0,906	0,687	D
KCNJ11	0,811	2,438	0,844	0,611	D
EMX2OS	0,809	2,520	0,875	0,649	D
PPP1R13L	0,808	1,694	0,938	0,752	D
XRCC2	0,807	3,043	0,906	0,748	D
ZNF273	0,807	1,263	0,906	0,725	D
PIWIL2	0,806	2,937	0,844	0,618	D
CCDC150	0,806	1,981	0,938	0,782	D
BC045769	0,805	2,412	0,906	0,721	D
SYT17	0,803	2,417	0,844	0,66	D
LRRC2	0,803	2,159	0,812	0,527	D
GLIPR1L2	0,802	2,391	0,938	0,786	D
AX746995	0,802	1,920	0,844	0,668	D
LOC440300	0,802	1,786	0,906	0,66	D
DNASE1	0,800	1,739	0,875	0,641	D
CCDC88B	0,799	1,352	0,906	0,584	D
WFDC6	0,797	2,627	0,875	0,714	D
BX647715	0,797	1,705	0,875	0,691	D
PPIEL	0,797	1,445	0,969	0,809	D
DMC1	0,796	2,556	0,844	0,607	D
NLRP12	0,794	1,943	0,875	0,714	D
MAP1LC3C	0,793	1,737	0,938	0,737	D
KANK2	0,792	2,666	0,844	0,649	D

CCDC113	0,792	1,763	0,844	0,641	D
LOC727896	0,791	1,492	0,875	0,676	D
AK124832	0,790	3,245	0,812	0,653	D
AX746699	0,790	2,614	0,875	0,706	D
WDR62	0,790	2,394	0,812	0,58	D
AX747172	0,789	2,689	0,875	0,653	D
TNFAIP8L3	0,785	2,473	0,812	0,588	D
PGM2L1	0,784	2,718	0,844	0,618	D
LINC00485	0,784	2,686	0,844	0,553	D
DNAJC27-AS1	0,783	1,948	0,844	0,599	D
GNRHRII	0,782	2,848	0,938	0,786	D
SEC14L4	0,781	2,128	0,875	0,691	D
RAD23B	0,780	1,717	0,844	0,676	D
LOC100289341	0,778	1,954	0,844	0,618	D
ULK2	0,778	1,834	0,875	0,691	D
SLC14A2	0,777	2,053	0,844	0,599	D
LPO	0,776	2,289	0,812	0,611	D
CCL16	0,771	1,975	0,844	0,664	D
HP09025	0,771	1,889	0,844	0,679	D
AX746787	0,769	2,687	0,844	0,687	D
PSMG4	0,769	2,134	0,875	0,706	D
CENPN	0,765	2,835	0,906	0,725	D
ZNF677	0,764	3,407	0,844	0,691	D
SKP2	0,762	1,329	0,812	0,496	D
ANKRD16	0,761	2,124	0,844	0,687	D
LOC100128288	0,761	1,794	0,812	0,615	D
FLJ90757	0,756	1,908	0,812	0,656	D
KBTBD12	0,756	1,854	0,812	0,641	D
ZNF527	0,753	1,780	0,812	0,63	D
GCLM	0,753	1,237	0,812	0,588	D
CCDC122	0,752	1,692	0,844	0,66	D
PCBD2	0,751	1,499	0,875	0,702	D
CPVL	0,939	1,977	1,000	0,71	C
SAMHD1	0,916	1,499	1,000	0,783	C
PTEN	0,909	1,857	1,000	0,764	C
ZNF652	0,888	1,523	1,000	0,692	C
P2RY13	0,878	2,167	0,944	0,424	C
HLA-DQB2	0,869	3,646	0,889	0,38	C
TOMM7	0,868	1,365	1,000	0,667	C
LGALS2	0,862	1,933	0,944	0,453	C
NMI	0,851	1,204	1,000	0,525	C
NDUFA12	0,847	1,360	1,000	0,511	C
FAM26F	0,847	1,261	0,944	0,746	C
CD1C	0,843	2,284	0,833	0,312	C
SLC38A1	0,841	1,916	0,944	0,518	C
RUFY3	0,841	1,356	0,944	0,449	C
AF007147	0,834	1,729	0,833	0,196	C

RGS18	0,826	1,652	0,833	0,279	C
OAS3	0,824	1,528	0,944	0,663	C
MNDA	0,821	1,789	0,889	0,634	C
C1ORF162	0,820	1,404	0,889	0,707	C
CAMK2D	0,817	1,801	0,833	0,38	C
C1QBP	0,814	1,319	0,889	0,627	C
PID1	0,812	1,487	0,889	0,431	C
NDRG2	0,807	1,772	0,833	0,308	C
DDB2	0,802	1,363	0,778	0,17	C
ANKRD22	0,797	1,721	0,833	0,424	C
RARRES3	0,797	1,721	0,833	0,464	C
AK293020	0,797	1,524	0,889	0,551	C
NDUFA1	0,797	1,221	1,000	0,667	C
SFT2D2	0,796	1,549	0,833	0,37	C
CLEC10A	0,792	1,268	0,889	0,612	C
SPDYE5	0,791	1,302	0,889	0,467	C
ANKRD36BP1	0,786	1,240	0,944	0,587	C
NAA20	0,779	1,709	0,833	0,424	C
SNRPE	0,774	1,444	0,833	0,359	C
CD1D	0,773	1,538	0,833	0,482	C
UBE2K	0,765	1,242	0,833	0,402	C
IFITM1	0,764	1,567	0,889	0,482	C
SPTLC2	0,758	1,527	0,889	0,656	C
TP53	0,755	1,204	0,833	0,569	C
TSPAN13	0,996	4,590	1,000	0,043	A
PTPRS	0,982	4,155	1,000	0,468	A
ALOX5AP	0,973	3,129	1,000	0,343	A
TCF4	0,972	3,133	1,000	0,371	A
CXCR3	0,960	5,276	0,929	0,096	A
CYBASC3	0,959	2,586	1,000	0,536	A
PLAC8	0,958	2,204	1,000	0,821	A
CARD11	0,957	4,834	0,929	0,05	A
MAP1A	0,956	4,711	0,929	0,036	A
IRF4	0,956	3,605	1,000	0,454	A
LILRA4	0,954	5,113	0,929	0,182	A
GZMB	0,954	4,535	0,929	0,15	A
SERPINF1	0,948	2,701	1,000	0,232	A
SEPT1	0,945	2,643	0,929	0,089	A
IL3RA	0,945	2,060	1,000	0,571	A
SLC20A1	0,940	3,678	1,000	0,732	A
ITM2C	0,933	3,358	0,929	0,257	A
CLIC3	0,923	5,891	0,857	0,05	A
IRF8	0,923	2,654	1,000	0,775	A
EGLN3	0,920	5,928	0,857	0,05	A
INPP4A	0,919	2,069	1,000	0,225	A
SEL1L3	0,918	3,345	0,929	0,211	A
C12ORF75	0,917	3,394	0,857	0,043	A

AK128525	0,916	-3,105	1,000	0,439	A
MGLL	0,909	2,823	0,929	0,207	A
IRF7	0,908	2,928	0,929	0,675	A
DCK	0,907	2,388	0,929	0,364	A
APP	0,906	2,851	1,000	0,486	A
PIM2	0,906	2,065	1,000	0,661	A
SRSF7	0,895	2,536	1,000	0,793	A
LILRB4	0,895	1,551	1,000	0,729	A
DSTN	0,894	2,983	0,929	0,457	A
SLC7A5	0,894	2,045	1,000	0,536	A
C18ORF1	0,893	3,263	0,929	0,486	A
NAPSB	0,892	1,536	1,000	0,629	A
P2RX1	0,891	2,841	0,929	0,3	A
SMPD3	0,887	5,332	0,786	0,039	A
CDH1	0,876	2,774	0,857	0,386	A
PLD4	0,873	2,952	0,857	0,386	A
LOC100190986	0,872	3,221	1,000	0,714	A
SLC44A2	0,872	2,488	0,929	0,575	A
AK093551	0,869	2,349	0,857	0,3	A
BCL11A	0,868	2,429	0,929	0,461	A
SELL	0,867	2,255	0,857	0,404	A
VEGFB	0,866	2,412	0,786	0,118	A
LOC641298	0,865	2,645	1,000	0,768	A
USP11	0,861	1,850	0,857	0,343	A
SIVA1	0,860	1,342	1,000	0,611	A
DNAJC4	0,858	1,442	1,000	0,493	A
ARHGEF7	0,857	2,215	0,929	0,396	A
PLP2	0,856	1,760	1,000	0,461	A
KRT5	0,855	9,023	0,714	0,011	A
CCDC50	0,855	2,694	0,857	0,511	A
LUC7L	0,853	1,409	1,000	0,579	A
CLEC4C	0,848	5,778	0,714	0,054	A
SEC61B	0,848	1,927	1,000	0,764	A
SLC5A3	0,844	2,497	0,857	0,261	A
LOC100271836	0,844	2,404	0,929	0,625	A
SLC15A4	0,842	3,081	0,786	0,207	A
ANKRD36BP1	0,841	1,289	1,000	0,589	A
TOB1	0,839	2,031	0,929	0,643	A
NUB1	0,839	1,410	1,000	0,639	A
GOSR2	0,839	1,407	0,929	0,343	A
SOX4	0,838	3,591	0,786	0,246	A
POLB	0,836	3,235	0,786	0,25	A
MCOLN2	0,836	2,154	0,857	0,343	A
CHAF1A	0,833	1,827	0,857	0,282	A
MKNNK2	0,832	1,984	0,929	0,468	A
SEMA7A	0,831	2,553	0,786	0,171	A
EIF2AK4	0,828	2,421	0,857	0,439	A

ACTN4	0,827	2,433	0,857	0,425	A
TRAF4	0,826	3,760	0,714	0,132	A
DERL3	0,826	2,961	0,714	0,118	A
FCHSD2	0,826	2,112	0,857	0,364	A
ZDHHC17	0,824	2,497	0,786	0,189	A
NUP88	0,823	1,774	0,786	0,243	A
AHCY	0,821	1,706	0,857	0,446	A
OFD1	0,820	2,007	0,786	0,268	A
SEPHS1	0,819	3,903	0,714	0,164	A
TP53I11	0,819	2,934	0,714	0,125	A
NOTCH4	0,819	2,308	0,929	0,632	A
HVCN1	0,819	2,153	0,857	0,368	A
OPTN	0,819	1,474	0,786	0,279	A
TSPYL2	0,816	1,539	0,857	0,368	A
BCL2L11	0,814	1,424	0,857	0,5	A
FAM160A1	0,811	4,497	0,643	0,032	A
HSPH1	0,811	2,519	0,929	0,707	A
MZB1	0,811	1,460	0,714	0,093	A
HIGD1A	0,811	1,452	0,929	0,625	A
RNF126	0,810	2,046	0,714	0,111	A
UGCG	0,809	4,190	0,714	0,146	A
ANKRD11	0,808	1,671	0,857	0,461	A
GPBP1L1	0,808	1,407	0,857	0,45	A
KIF5B	0,808	1,350	0,929	0,725	A
PPP1R2	0,807	1,258	0,929	0,779	A
CORO1C	0,806	2,119	0,929	0,654	A
GNA15	0,806	1,850	0,929	0,693	A
JOSD1	0,805	1,731	0,929	0,75	A
PDE7A	0,804	1,816	0,929	0,611	A
MAP3K8	0,804	1,553	1,000	0,661	A
TERF1	0,804	1,296	0,929	0,55	A
SEMA3C	0,801	4,032	0,643	0,054	A
SLC38A1	0,801	1,475	0,857	0,529	A
SPCS1	0,798	1,313	0,929	0,686	A
TOR3A	0,796	2,169	0,857	0,486	A
P2RY6	0,796	1,376	0,857	0,454	A
SLC25A29	0,795	3,436	0,643	0,086	A
NPIPL3	0,795	2,673	1,000	0,843	A
C4ORF26	0,795	1,204	0,857	0,511	A
C1ORF186	0,794	4,217	0,643	0,096	A
ST6GALNAC4	0,794	2,091	0,714	0,171	A
KLHDC4	0,793	1,594	0,786	0,232	A
SELS	0,793	1,539	0,929	0,65	A
LIME1	0,790	2,780	0,643	0,075	A
PTPRCAP	0,790	2,375	0,643	0,089	A
AMIGO3	0,785	1,765	0,714	0,179	A
NOP58	0,785	1,544	0,929	0,639	A

RFTN1	0,785	1,541	0,857	0,489	A
PACSN1	0,784	5,284	0,571	0,007	A
WDFY4	0,784	1,411	0,929	0,429	A
SLC32A1	0,783	4,900	0,571	0,014	A
PLXNA4	0,782	4,505	0,571	0,011	A
MYBL2	0,781	6,173	0,571	0,018	A
OGT	0,781	1,563	0,857	0,55	A
EPHB1	0,780	4,798	0,571	0,021	A
GALNT3	0,776	1,907	0,643	0,136	A
LOC100507173	0,776	1,338	1,000	0,8	A
TPM2	0,773	3,845	0,571	0,039	A
BTG2	0,773	2,156	0,929	0,779	A
SH3BP4	0,769	4,065	0,571	0,054	A
TTC3	0,769	1,463	0,929	0,743	A
CPNE1	0,769	1,275	0,857	0,593	A
POLR2A	0,765	1,358	0,929	0,707	A
TXNDC3	0,764	2,783	0,571	0,046	A
GALNT4	0,763	1,363	0,929	0,636	A
TCP1	0,760	1,705	0,929	0,754	A
PRMT10	0,758	1,649	0,929	0,614	A
RAB33B	0,752	1,891	0,857	0,596	A
IRF2BP2	0,752	1,569	0,857	0,657	A
UBE2D2	0,751	1,699	0,857	0,489	A

Table S4. Clinical information

	CD patients (n=170)														Non-CD healthy (n=12)	Non-CD colitis (n=4)																									
	Figures 1, 2, S1, S2, S3, S5A and S7B (n=97)						Figures 3 and S4 (total n= 35 patients, including 29 patients from Cohort 1 and 6 additional patients)						Figures 4A, 4C, 5 and S6 (n=28)				Figures 6, 7, 8, S7A, S7C and S8 (n=3)		Figures 4B, S2A and S5B (n=26)																						
	Cohort 1 CD active SES-CD >3 (n=36)			Cohort 2 CD active SES-CD >3 (n=46)			Remission SES-CD ≤2 (n=15)			TNFα (n=15)			IL-23 (n=15)				IL-1β (n=14)			IL-6 (n=11)			IL-10 (n=12)			TNFα/IL-23/ IL-1β/IL-6 (n=4)			Cohort 3		Cohort 4		Cohort 5		Cohort 6						
Gender	21 (58.3)			25 (53.3)			9 (60)			9 (69.2)			8 (53.3)			9 (64.3)			6 (54.5)			4 (33.3)			4 (100)			19 (67.9)		3 (100)		6 (60)		19 (73)		Figure 1					
Age at sample collection	6 (16.7)			12 (26.2)			0 (0)			3 (23.1)			2 (13.3)			2 (14.3)			3 (27.2)			2 (16.7)			2 (50)			3 (10.8)		1 (33.3)		2 (20)		1 (3.8)		0 (0)		Figure 1			
<25, n (%)	13 (36.1)			14 (30.4)			1 (6.7)			6 (46.2)			8 (53.3)			7 (50)			4 (36.4)			3 (25)			0 (0)			13 (46.4)		2 (66.7)		5 (50)		12 (46.2)		2 (16.7)		4 (100)			
26-39, n (%)	17 (47.2)			20 (43.4)			14 (93.3)			4 (30.7)			5 (33.4)			5 (35.7)			4 (36.4)			7 (58.3)			2 (50)			12 (42.8)		0 (0)		3 (30)		13 (50)		10 (83.3)		0 (0)		4 (100)	
>40, n (%)	5 (13.8)			8 (17.4)			0 (0)			2 (15.4)			2 (13.4)			1 (7.2)			2 (18.1)			2 (16.7)			0 (0)			3 (10.7)		0 (0)		3 (30)		1 (3.8)							
A1, n (%)	21 (58.4)			33 (71.7)			14 (93.3)			9 (69.2)			10 (66.6)			10 (71.4)			7 (63.6)			7 (58.3)			3 (75)			18 (64.3)		3 (100)		6 (60)		13 (50.1)							
A2, n (%)	10 (27.8)			5 (10.8)			1 (6.7)			2 (15.4)			3 (20)			3 (21.4)			2 (18.2)			3 (25)			1 (25)			7 (25)		0 (0)		1 (10)		17 (66.1)							
A3, n (%)	21 (58.3)			24 (52.2)			9 (60)			7 (54)			10 (67)			11 (77)			5 (46)			3 (25)			0 (0)			19 (67.9)		1 (33.3)		6 (60)		17 (65.4)							
L2, n (%)	15 (41.7)			22 (47.8)			6 (40)			6 (46)			5 (33)			3 (23)			6 (54)			9 (75)			4 (100)			9 (32.1)		2 (66.7)		4 (40)		9 (34.6)							
L3, n (%)	20 (55.5)			36 (78.3)			11 (73.3)			5 (38.6)			8 (53.4)			9 (64.3)			3 (27.3)			3 (25)			2 (50)			18 (64.4)		2 (66.7)		6 (60)		12 (46.1)							
B1, n (%)	9 (25)			4 (8.6)			1 (6.7)			4 (30.7)			3 (20)			3 (21.4)			5 (45.4)			4 (33.3)			0 (0)			5 (17.8)		0 (0)		1 (10)		1 (3.8)							
B2, n (%)	7 (19.5)			6 (13)			3 (20)			4 (30.7)			4 (26.6)			2 (14.3)			3 (27.3)			5 (41.7)			2 (50)			5 (17.8)		1 (33.3)		3 (30)		13 (50.1)							
B3, n (%)	96			48			216			120			180			58			60			180			132			90		48		120		180							
Duration median (months)	15 (41.7)			20 (43.5)			3 (20)			6 (46.1)			5 (33.3)			5 (35.7)			6 (54.5)			7 (58.3)			4 (100)			9 (32.1)		1 (33.3)		4 (40)		7 (26.9)							
None, n (%)	5 (13.8)			3 (6.6)			2 (13.3)			1 (7.7)			2 (14.3)			0 (0)			0 (0)			0 (0)			0 (0)			2 (7.2)		1 (33.3)		1 (10)		7 (26.9)							
S-ASA, n (%)	7 (19.4)			14 (30.4)			5 (33.3)			3 (23.1)			3 (20)			4 (28.6)			2 (18.2)			3 (25)			0 (0)			9 (32.1)		1 (33.3)		4 (40)		4 (15.3)							
Anti-TNFα, n (%)	2 (5.7)			0 (0)			0 (0)			1 (7.7)			1 (6.6)			0 (0)			1 (9.1)			1 (8.3)			0 (0)			0 (0)		0 (0)		0 (0)		1 (3.8)							
Anti-IL-12p40 n (%)	7 (19.4)			9 (19.5)			5 (33.3)			2 (15.4)			4 (26.7)			3 (21.4)			2 (18.2)			1 (8.3)			0 (0)			8 (28.6)		0 (0)		1 (10)		7 (26.9)							
Other, n (%)																																									

Table S5. Flow-cytometry antibodies

Antibody	Conjugate	Clone	Company
Anti-HLADR	APC	L243	BioLegend
Anti-HLADR	AF700	L243	BioLegend
Anti-HLADR	BV510	L243	BioLegend
Anti-CD1c	Alexa fluor 647	L161	BioLegend
Anti-CD3	BV510	UCHT1	BioLegend
Anti-CD4	BV510	RPA-T4	BioLegend
Anti-CD8a	APC	RPA-T8	BioLegend
Anti-CD14	APC	M5E2	BioLegend
Anti-CD14	Pacific blue	HCD14	BioLegend
Anti-CD25	APC	M-A251	BD Biosciences
Anti-CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences
Anti-CD45RA	Alexa fluor 488	HI100	BioLegend
Anti-CD45RO	PerCP/Cy5.5	UCHL1	BioLegend
Anti-CD62L	PE-Cy7	DREG-56	BioLegend
Anti-CD64	FITC	10.1	BioLegend
Anti-CD163	PE	GHI/61	BioLegend
Anti-CD163	PerCP/Cy5.5	GHI/61	BioLegend
Anti-CD66b	PE	G10F5	BioLegend
Anti-CD89	APC	A59	BioLegend
Anti-CD172 α	PE-Cy7	SE5A5	BioLegend
Anti-CD172 β	PE	B4B6	BioLegend
Anti-CD183 (CXCR3)	AlexaFluor 488	G025H7	BioLegend
Anti-CD196 (CCR6)	PE	G034E3	BioLegend
Anti-CD206	PE	15-2	BioLegend
Anti-CD209	PE	DCN46	BD Biosciences
Anti-INF γ	PerCP/Cy5.5	4S.B3	BioLegend
Anti-INF γ	AF700	4S.B3	BioLegend
Anti-TNF- α	PerCP/Cy5.5	Mab11	BioLegend
Anti-TNF- α	AF700	Mab11	BioLegend
Anti-IL-1 β	PE	8516	R&D
Anti-IL-6	PE	MQ2-13A5	BioLegend
Anti-IL-6	Pacific Blue	MQ2-13A5	BioLegend
Anti-IL-10	PE	JES3-9D7	BioLegend
Anti-IL-17A	Alexa 647	BL168	BioLegend
Anti-IL17A	Pacific Blue	BL168	BioLegend
Anti-IL-23p19	APC	23dcdp	EBioscience
Anti-TREM1	APC	193015	R&D
Anti-MERTK	BV421	590H11GIE2	BioLegend
Anti-CX ₃ CR1	PE	2A9-1	BioLegend

ANNEXE 4 : INFORMATIONS ADDITIONNELLES: A MUCOSAL CD14⁺ MONOCYTE-LIKE SUBPOPULATION AND IL-12 INDUCE IL-8 IN TISSUE TH17 IN ULCEARTIVE COLITIS (RESULTS B)

Table 1. Patient's characteristics

	UC	CD	Non IBD
N	83	19	4
Females, n(%)	47 (56.6)	11 (63.1)	2 (50)
Age, median (range)	42 (18-80)	37 (21-80)	62 (36-76)
Age at diagnosis			
< 16	6	3	
17-40	52	11	
> 40	25	5	
Treatment			
None	15	8	
5-ASA alone	38	1	
Thiopurine or methotrexate	14	6	
TNF α inhibitor	9	4	
Corticosteroid	21	2	
Disease location - UC			
Proctitis	15		
Left side colitis	39		
Pancolitis	25		
Proximal colitis	4		
Disease location - CD			
Terminal ileum		0	
Colon		15	
Ileocolonic		4	
Upper GI tract		0	
Disease behavior			
Non stricturing - Non penetrating		15	
Stricturing		3	
Penetrating		1	
Perianal disease		3	
Diagnosis - Control			
Screening colonoscopy			4

Table 2. Anti-human antibodies

Antibody	Conjugate	Clone	Company
Anti-HLADR	APC	L243	BioLegend
Anti-HLADR	AF700	L243	BioLegend
Anti-HLADR	BV510	L243	BioLegend
Anti-CD3	BV510	UCHT1	BioLegend
Anti-CD3	BV496	UCHT1	BD Biosciences
Anti-CD4	BV510	RPA-T4	BioLegend
Anti-CD4	BV785	OKT4	BioLegend
Anti-CD8a	APC	RPA-T8	BioLegend
Anti-CD8a	BV787	SK1	BD Biosciences
Anti-CD11b	BV510	D12	BD Biosciences
Anti-CD11c	BV711	B.Ly6	BD Biosciences
Anti-CD14	APC	M5E2	BioLegend
Anti-CD14	Pacific blue	HCD14	BioLegend
Anti-CD14	BUV737	M5E2	BD Biosciences
Anti-CD16	BUV496	3G8	BD Biosciences
Anti-CD25	APC	M-A251	BD Biosciences
Anti-CD25	BV510	M-A521	BD Biosciences
Anti-CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences
Anti-CD45RA	Alexa fluor 488	HI100	BioLegend
Anti-CD49d	PeCy7	TS217	BioLegend
Anti-CD62L	PeCy7	DREG-56	BioLegend
Anti-CD64	FITC	10.1	BioLegend
Anti-CD69	APC	IVA91	BioLegend
Anti-CD103	FITC	Be-ACT8	BD Biosciences
Anti-CD163	PerCP/Cy5.5	GHI/61	BioLegend
Anti-CD169	APC	7.239	BioLegend
Anti-CD172a	PE-Cy7	SE5A5	BioLegend
Anti-CD183 (CXCR3)	AlexaFluor 488	G025H7	BioLegend
Anti-CD196 (CCR6)	PE	G034E3	BioLegend
Anti-CD192 (CCR2)	BV650	LS132.1D9	BD Biosciences
Anti-CD206	BUV395	19.2	BD Biosciences
Anti-CD209	Pacific-Blue/BV421	DCN46	BD Biosciences
Anti-CLEC5A	PE	283834	R&D
Anti-CX ₃ CR1	PE	2A9-1	BioLegend
Anti-MERTK	APC-Cy7	590H11G1E3	BioLegend
Anti-MERTK	BV421	590H11G1E3	BioLegend
Anti-TIM-4	PE	9F4	BioLegend
Anti-TREM	APC	193015	R&D
Anti-β7	APC	Fib504	BD Biosciences
Anti-FoxP3	APC	PCH101	eBiosciences
Anti-GMCSF	PerCP/Cy5.5	BVD2-21C11	BioLegend

Anti-TNF α	Alexa Fluor-700	Mab11	Biolegend
Anti-INF γ	PerCP/Cy5.5	4S.B3	BioLegend
Anti-INF γ	AF700	4S.B3	BioLegend
Anti-INF γ	BV711	4S.B3	BioLegend
Anti-IL-1 β	PE	8516	R&D
Anti-IL-6	Pacific Blue	MQ2.13A5	Biolegend
Anti-IL-8	FITC	E8N1	Biolegend
Anti-IL12p40	PE	C8.6	eBiosciences
Anti-IL-17A	Alexa 647	BL168	BioLegend
Anti-IL-17A	PE-Cy7	BL168	BioLegend

ANNEXE 5 : INFORMATIONS ADDITIONNELLES: HIGH DIMENSIONAL PHENOTYPIC MAPPING AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF MONONUCLEAR PHAGOCYTES IN MESENTERIC LYMPH NODES REVEAL DIFFERENCES BETWEEN ULCERATIVE COLITIS AND CROHN'S DISEASE (RESULTS C)

Table S1: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in UC – FDR<0.05

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
CTSL1	-8,22089	3,599918	-14,2727	3,08E-12	3,67E-08	17,00363
SEPP1	-8,84939	3,473542	-11,6857	1,28E-10	7,25E-07	13,93515
SMPDL3A	-6,95348	2,993123	-11,461	1,82E-10	7,25E-07	13,47828
FCGR3A	-7,39715	4,602262	-11,1483	3,01E-10	8,96E-07	12,94954
THBS1	-8,26849	4,959153	-10,8045	5,27E-10	1,26E-06	12,49125
MARCO	-7,17324	2,727922	-9,80025	2,93E-09	5,12E-06	11,07393
VCAN	-7,75428	4,223605	-9,78516	3,01E-09	5,12E-06	11,07292
FCGR1A	-6,43802	2,069401	-9,11253	1,01E-08	1,51E-05	9,909817
MMP19	-6,87515	4,996967	-9,04327	1,15E-08	1,53E-05	9,56117
AQP9	-6,49491	2,906926	-8,72875	2,08E-08	2,48E-05	9,300137
FPR2	-5,49294	2,565208	-8,39134	3,98E-08	4,24E-05	8,608389
C1QB	-5,93852	4,919472	-8,31701	4,6E-08	4,24E-05	8,462985
MAFB	-6,62684	4,374304	-8,31474	4,63E-08	4,24E-05	8,352213
PTPRS	6,17312	4,657812	8,267442	5,07E-08	4,32E-05	8,385359
C2	-5,74921	1,505496	-8,13244	6,62E-08	5,26E-05	8,181787
STAB1	-5,61502	2,239731	-8,09193	7,17E-08	5,34E-05	8,123586
FCN1	-7,8508	6,007805	-7,95374	9,44E-08	6,62E-05	7,729834
S100A9	-8,24679	6,235955	-7,78567	1,32E-07	8,77E-05	7,458861
PLA2G7	-5,83182	2,3692	-7,65253	1,74E-07	0,000109	7,3442
CD163	-7,0182	5,690011	-7,17664	4,65E-07	0,000277	6,2989
C5AR1	-5,45715	3,906271	-7,1513	4,91E-07	0,000279	6,301507
OLFML2B	-5,65396	1,460881	-7,1041	5,42E-07	0,000294	6,254904
HK3	-6,63645	4,487535	-6,95456	7,45E-07	0,000386	5,936985
TCN2	-5,30098	1,830698	-6,93138	7,83E-07	0,000389	5,922939
SLC1A3	-4,97333	2,794811	-6,87462	8,84E-07	0,000422	5,780082
LYVE1	-4,61058	0,817189	-6,8023	1,03E-06	0,000474	5,626077
ABCC3	-4,73051	2,275596	-6,77127	1,1E-06	0,000488	5,586097
KCNJ2	-4,7214	4,491434	-6,7442	1,17E-06	0,000499	5,473343
MSR1	-4,56422	7,03174	-6,69744	1,3E-06	0,000514	5,511445
IRF4	4,880294	5,811656	6,692147	1,31E-06	0,000514	5,480727
CCL3L3	-5,91641	4,820894	-6,68293	1,34E-06	0,000514	5,34533
SLCO2B1	-5,73699	3,264288	-6,64178	1,46E-06	0,000545	5,328195
HMOX1	-6,02295	5,769111	-6,48711	2,05E-06	0,000741	4,968848
ABCA1	-3,57142	6,709773	-6,42953	2,33E-06	0,000808	4,964335
MYBL2	4,863844	2,05972	6,421081	2,37E-06	0,000808	4,902628

C3AR1	-5,2608	2,772154	-6,33765	2,85E-06	0,000919	4,742166
CYP1B1	-5,22403	2,966387	-6,34307	2,82E-06	0,000919	4,708169
MS4A7	-5,15922	5,886212	-6,32323	2,94E-06	0,000924	4,678643
AGTRAP	-6,06109	3,364667	-6,30085	3,09E-06	0,000946	4,682635
ARHGEF10L	-4,53939	1,693188	-6,18361	4,02E-06	0,001197	4,39783
RUNX2	4,289545	4,930559	6,16627	4,18E-06	0,001214	4,369448
CXCL3	-5,2193	1,786996	-6,09594	4,89E-06	0,001387	4,23964
CSF1R	-4,01651	6,776554	-6,04169	5,52E-06	0,001497	4,13246
COBLL1	4,139456	0,889201	6,031313	5,65E-06	0,001497	4,081353
CD300E	-5,64083	4,601874	-6,03912	5,55E-06	0,001497	4,074605
SLC11A1	-5,19894	2,037672	-5,88733	7,83E-06	0,002028	3,801269
EREG	-4,48047	5,700979	-5,83754	8,76E-06	0,002223	3,696368
CYP27A1	-4,99788	2,334279	-5,78608	9,85E-06	0,002447	3,58693
IL1RN	-4,62223	4,809504	-5,59745	1,52E-05	0,003692	3,155855
LRP1	-3,99972	1,901688	-5,57008	1,62E-05	0,003853	3,11035
FOLR2	-5,51702	1,555295	-5,55352	1,68E-05	0,003925	3,091473
CCL3	-5,95247	6,089637	-5,52811	1,78E-05	0,004081	3,028806
IGJ	5,073745	7,96208	5,487295	1,96E-05	0,004374	2,942278
CRISPLD2	-5,43887	2,956349	-5,47979	1,99E-05	0,004374	2,938661
APOE	-5,49664	1,544721	-5,46994	2,04E-05	0,004374	2,916591
TLR2	-4,72596	3,93716	-5,46221	2,07E-05	0,004374	2,872041
LGALS3	-3,49846	7,813198	-5,44879	2,14E-05	0,004374	2,870604
SOD2	-5,08156	6,735348	-5,44738	2,15E-05	0,004374	2,868164
FAM198B	-4,1465	2,208032	-5,44346	2,17E-05	0,004374	2,838349
TYMS	5,167061	1,975711	5,423478	2,27E-05	0,004505	2,816975
DUSP6	-5,30244	5,124524	-5,40751	2,35E-05	0,004599	2,757648
TRAF4	3,925308	0,820183	5,371948	2,56E-05	0,004836	2,694136
MS4A4A	-3,78202	4,49319	-5,37628	2,53E-05	0,004836	2,688737
CD14	-4,84411	5,154922	-5,35739	2,64E-05	0,004899	2,651651
CXCL2	-5,10665	3,421025	-5,34094	2,75E-05	0,004899	2,638515
IL22RA2	4,337174	1,984572	5,335237	2,78E-05	0,004899	2,617439
IL8	-6,06892	5,600841	-5,33651	2,77E-05	0,004899	2,613897
GPNMB	-4,14137	2,990448	-5,33346	2,79E-05	0,004899	2,600773
MPP3	3,792345	1,020634	5,324663	2,85E-05	0,004916	2,592645
PPM1J	4,294527	2,74773	5,319524	2,89E-05	0,004916	2,570455
ACSL1	-3,92061	5,400988	-5,2649	3,28E-05	0,005428	2,466946
RGL1	-3,80408	4,022222	-5,26906	3,25E-05	0,005428	2,451811
MT2A	-5,90374	3,644413	-5,25176	3,38E-05	0,00552	2,44439
S100A8	-6,79438	2,7373	-5,2225	3,62E-05	0,005831	2,379604
EGLN3	4,940799	3,09942	5,208768	3,74E-05	0,005941	2,339002
RNASE1	-5,79317	3,49804	-5,18568	3,94E-05	0,006188	2,294956
CDH1	3,92743	3,719141	5,164402	4,15E-05	0,006346	2,244445
DRAM1	-4,29046	3,67561	-5,16379	4,15E-05	0,006346	2,233871

LILRA6	-4,139	3,956859	-5,13999	4,39E-05	0,006625	2,182636
FAM46C	3,842467	4,359413	5,130025	4,49E-05	0,006649	2,17791
IL1B	-3,68027	6,9554	-5,12775	4,52E-05	0,006649	2,173599
PLIN2	-4,08496	6,609933	-5,11139	4,69E-05	0,006825	2,132881
GGTA1P	-5,03918	3,05154	-5,06865	5,19E-05	0,007454	2,036169
C1QC	-4,89621	5,495192	-5,04674	5,46E-05	0,00768	1,991099
GIMAP1	-4,0982	2,639769	-5,04577	5,48E-05	0,00768	1,981018
ANPEP	-4,16387	4,164151	-5,02921	5,69E-05	0,007892	1,945454
SCAMP5	4,005503	1,074272	5,011451	5,94E-05	0,008134	1,91856
FPR1	-5,06943	4,51443	-4,99057	6,24E-05	0,008447	1,867778
PLTP	-4,93333	2,418076	-4,97349	6,49E-05	0,008455	1,836423
ADAMDEC1	-4,43417	4,550709	-4,974	6,48E-05	0,008455	1,83482
PTAFR	-3,87876	6,749162	-4,97542	6,46E-05	0,008455	1,830781
BCL11A	3,313519	7,621961	4,971267	6,53E-05	0,008455	1,793517
LILRB2	-4,12645	5,949912	-4,9648	6,63E-05	0,008493	1,817715
TMEM176B	-5,3475	5,01499	-4,93597	7,09E-05	0,008993	1,749874
FLVCR2	-3,65206	3,137255	-4,91533	7,44E-05	0,009342	1,699814
CCR1	-4,03127	4,932831	-4,88868	7,93E-05	0,009845	1,650767
IER3	-5,38244	3,372352	-4,85224	8,64E-05	0,010619	1,566721
CPM	-3,53391	5,74929	-4,84353	8,82E-05	0,01068	1,55219
HLA-DOB	4,423037	2,902333	4,836956	8,96E-05	0,01068	1,536657
FCGR2A	-3,40377	7,237752	-4,83912	8,91E-05	0,01068	1,519189
PPP1R16B	3,886556	1,78645	4,826718	9,18E-05	0,010833	1,516497
APOC1	-4,78523	1,874068	-4,81702	9,39E-05	0,010976	1,495399
CLEC4D	-5,44884	2,842761	-4,79607	9,87E-05	0,011422	1,44888
SLC7A7	-4,1761	4,845657	-4,76035	0,000107	0,01231	1,370684
CLEC4E	-4,16951	3,783261	-4,74753	0,000111	0,012355	1,340398
UHRF1	3,843676	1,795964	4,745227	0,000111	0,012355	1,338724
FPR3	-3,87191	3,617236	-4,74287	0,000112	0,012355	1,330443
CTSB	-2,67463	9,207252	-4,75444	0,000109	0,012355	1,298261
P2RX5	4,087259	2,092897	4,738023	0,000113	0,012383	1,323011
PTGER2	-4,2727	1,748058	-4,72426	0,000117	0,012677	1,292426
HBEGF	-4,17332	3,560831	-4,7109	0,000121	0,012968	1,263149
EBF1	3,769851	2,646024	4,701312	0,000124	0,013147	1,24041
FCRL2	3,902168	0,928874	4,643396	0,000142	0,014951	1,116326
ABCA6	3,345179	1,869539	4,594242	0,000159	0,016541	1,008325
MAP4K1	3,235581	5,103766	4,593463	0,00016	0,016541	1,004565
ALDH3B1	-4,3377	3,503994	-4,55306	0,000176	0,018052	0,920221
MS4A1	4,206415	2,902118	4,493086	0,000203	0,020642	0,789443
GIMAP6	-4,10183	2,057506	-4,48831	0,000205	0,020701	0,774773
NCF1B	3,917444	3,681943	4,465173	0,000217	0,02169	0,7293
STAP1	4,191607	3,042581	4,45897	0,00022	0,021829	0,715287
CXCL9	-4,94207	3,877024	-4,45382	0,000222	0,021861	0,703177

RNF135	-3,28533	5,700698	-4,45142	0,000224	0,021861	0,683143
GMPPA	-4,08367	1,938139	-4,43559	0,000232	0,022516	0,660987
RHOH	3,495872	4,309346	4,430095	0,000235	0,022629	0,651998
VSIG4	-4,88166	2,24138	-4,42541	0,000238	0,022699	0,626049
SMPD3	3,604956	2,456286	4,415936	0,000243	0,023033	0,62257
DOCK4	-3,73351	1,167454	-4,40788	0,000248	0,023201	0,602058
MARCKS	-2,99465	8,046181	-4,40628	0,000249	0,023201	0,507611
LDLRAD3	-3,55686	0,853496	-4,39313	0,000257	0,023754	0,568658
NAMPT	-3,16946	9,589161	-4,38825	0,00026	0,023847	0,438098
NPL	-3,9834	2,378251	-4,38451	0,000262	0,023877	0,550948
CD93	-3,90105	3,155351	-4,37297	0,00027	0,024357	0,52866
ADAP2	-3,71025	4,133581	-4,35353	0,000282	0,02532	0,487134
CXCL10	-5,09449	3,12714	-4,30764	0,000315	0,028036	0,365833
ATP2A3	3,288521	2,010488	4,302919	0,000319	0,028143	0,374885
DMXL2	-3,76924	3,38111	-4,28785	0,00033	0,028958	0,344808
TLR4	-3,82646	2,771152	-4,27167	0,000343	0,029878	0,30738
MERTK	-3,6651	3,085812	-4,25974	0,000353	0,030518	0,284202
CLEC7A	-2,47354	8,365307	-4,25123	0,000361	0,030919	0,160228
CD22	3,675805	2,444207	4,23795	0,000372	0,031686	0,231465
GPX7	3,670059	1,805664	4,23282	0,000377	0,031848	0,214007
ZNF296	3,421115	2,26941	4,224855	0,000384	0,032005	0,206879
GIMAP5	-3,98836	1,720494	-4,22672	0,000382	0,032005	0,198965
SIGLEC9	-3,71474	2,420118	-4,22169	0,000387	0,032024	0,196921
MAF	-3,52837	2,735345	-4,20781	0,0004	0,032828	0,170519
CD68	-2,50995	7,764452	-4,20551	0,000402	0,032828	0,087972
PHPT1	-4,15478	2,897983	-4,19996	0,000407	0,033039	0,146937
FAM129C	3,970584	3,449049	4,192651	0,000415	0,033215	0,134591
MRPL34	3,697323	2,873336	4,189848	0,000417	0,033215	0,126047
SLC7A8	-4,02872	3,991192	-4,18926	0,000418	0,033215	0,121139
ADAM19	2,427917	7,352396	4,183951	0,000423	0,033415	0,01892
TMEM8B	3,554447	0,912112	4,170821	0,000437	0,034252	0,079983
BLVRB	-4,40471	5,411991	-4,16749	0,00044	0,034299	0,073933
HES1	-3,55982	0,681819	-4,14586	0,000464	0,03588	0,025875
MRAS	-3,47391	1,818908	-4,12578	0,000486	0,037397	-0,00862
FAM102A	3,57646	2,887116	4,112788	0,000502	0,038327	-0,03686
FAM160A1	3,240556	0,74514	4,090576	0,000529	0,040154	-0,0928
C1QA	-4,44616	5,701514	-4,07712	0,000546	0,041201	-0,13076
GLUL	-2,73866	6,459633	-4,06601	0,000561	0,04204	-0,18968
SPOCK2	3,472142	2,546384	4,060323	0,000568	0,04221	-0,14832
PDK4	-3,39353	1,863454	-4,05908	0,00057	0,04221	-0,16298
BICD1	2,88084	0,531022	4,055244	0,000575	0,042335	-0,17033
TTYH3	-3,17416	2,522298	-4,03068	0,00061	0,04434	-0,21749
MCOLN1	-3,97202	2,792693	-4,03267	0,000607	0,04434	-0,21777

RAB3D	-2,9515	5,552677	-4,01187	0,000638	0,046092	-0,30934
GPR34	-4,20573	2,283715	-4,00877	0,000643	0,046154	-0,26702
SAT1	-2,27995	13,4442	-3,99699	0,000661	0,047183	-0,52129
HK2	-3,50608	4,937805	-3,98805	0,000675	0,047912	-0,33398
NLRP3	-3,09484	5,167254	-3,98183	0,000685	0,04834	-0,34265
SDK2	3,258143	1,776546	3,961369	0,00072	0,049699	-0,36097
EMR1	-4,47279	2,893369	-3,95609	0,000729	0,049699	-0,37962
SIGLEC16	-3,57388	2,206932	-3,95385	0,000733	0,049699	-0,38065
BST1	-3,47995	1,585352	-3,9547	0,000731	0,049699	-0,38858
FAM20A	-3,18014	0,765933	-3,95389	0,000732	0,049699	-0,39144
SLA	-2,35031	6,43464	-3,96086	0,00072	0,049699	-0,42805
CCR6	2,509048	5,126567	3,950772	0,000738	0,049699	-0,42941
CTSS	-2,70923	7,979312	-3,95217	0,000735	0,049699	-0,49908

Table S2: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in CD – FDR<0.05

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
S100A9	-10,9752	5,137113	-14,3414	2,21E-13	2,63E-09	19,3829
SEPP1	-8,58139	2,689678	-9,6441	8,5E-10	4,23E-06	12,1544
CD14	-7,22463	3,907765	-9,53351	1,06E-09	4,23E-06	11,86978
CTSL1	-7,32153	3,617087	-9,14419	2,38E-09	4,81E-06	11,18663
FCN1	-7,69876	5,536829	-9,18332	2,19E-09	4,81E-06	11,06774
C5AR1	-5,90068	4,366817	-9,13483	2,42E-09	4,81E-06	10,95953
HK3	-7,3032	4,908913	-8,97713	3,37E-09	5,74E-06	10,72734
CD300E	-7,4477	4,455103	-8,8478	4,43E-09	6,3E-06	10,6048
PYGL	-6,0248	2,960834	-8,81483	4,76E-09	6,3E-06	10,53008
CD163	-7,64908	5,179587	-8,39345	1,18E-08	1,41E-05	9,610722
MMP19	-7,51824	4,819489	-8,2352	1,67E-08	1,81E-05	9,320091
MAFB	-7,33803	4,962498	-8,15315	2E-08	1,99E-05	9,137811
SOD2	-4,99747	7,426557	-8,05105	2,51E-08	2,31E-05	9,104469
FPR2	-6,23317	2,727137	-8,01192	2,74E-08	2,34E-05	8,976345
PTAFR	-4,73798	7,536715	-7,85672	3,89E-08	3,09E-05	8,744335
FCGR3A	-7,35341	3,903696	-7,62883	6,53E-08	4,86E-05	8,194256
IL1B	-6,03324	6,325914	-7,47798	9,23E-08	6,47E-05	7,796821
CLEC4D	-7,57085	3,283099	-7,44414	9,98E-08	6,61E-05	7,815651
SERPINA1	-5,87706	3,833038	-7,36444	1,2E-07	7,53E-05	7,580793
PTPRS	7,653879	5,68588	7,225618	1,66E-07	9,89E-05	7,206291
TLR2	-5,93278	3,829584	-7,1987	1,77E-07	0,0001	7,221912
CSF1R	-4,80442	5,938603	-7,14993	1,98E-07	0,000107	7,122491
C2	-6,70194	2,30979	-6,99495	2,86E-07	0,000148	6,852704
PID1	-5,06729	2,616747	-6,92547	3,37E-07	0,000167	6,622647
EREG	-4,65241	6,411696	-6,907	3,52E-07	0,000168	6,65025
F13A1	-5,49177	3,567457	-6,84572	4,07E-07	0,000187	6,425221
RIN2	-5,11265	7,276459	-6,82897	4,24E-07	0,000187	6,52055
S100A8	-6,678	3,261598	-6,7488	5,13E-07	0,000219	6,292571
VSIG4	-5,96979	2,143508	-6,66302	6,31E-07	0,000251	6,094069
C1QB	-6,09111	4,192292	-6,6761	6,11E-07	0,000251	6,07801
FPR3	-5,31844	3,15593	-6,64925	6,52E-07	0,000251	6,032193
TLR4	-5,33435	2,091811	-6,63457	6,76E-07	0,000252	5,99742
MSR1	-7,01009	6,422337	-6,60495	7,26E-07	0,000262	5,977432
F3	-5,59147	6,399974	-6,43611	1,09E-06	0,000364	5,594477
FCGR1A	-5,69026	2,125929	-6,43405	1,1E-06	0,000364	5,57067
EMR1	-6,40916	3,048785	-6,43404	1,1E-06	0,000364	5,56866
SLC40A1	-5,81782	2,780355	-6,42007	1,14E-06	0,000366	5,539233
RNASE1	-6,45374	2,440267	-6,39681	1,2E-06	0,000378	5,498068
CCL4	-6,36903	4,308098	-6,37952	1,26E-06	0,000384	5,442984
MRC1	-4,97394	4,62308	-6,35071	1,35E-06	0,000401	5,33922

AQP9	-5,6322	2,91801	-6,27962	1,6E-06	0,000456	5,223646
FAM20A	-4,74412	2,311663	-6,27911	1,6E-06	0,000456	5,182341
MS4A7	-4,30292	5,869955	-6,26165	1,68E-06	0,000464	5,196663
IRF4	4,798265	7,767173	6,248657	1,73E-06	0,000469	5,188597
LGALS3	-4,73815	7,13502	-6,17879	2,05E-06	0,000544	5,02487
ABCA1	-3,66838	7,303353	-6,10583	2,46E-06	0,0006	4,859415
LILRB2	-3,48938	6,415943	-6,10483	2,47E-06	0,0006	4,848799
HBEGF	-5,14793	4,097754	-6,13034	2,31E-06	0,0006	4,83849
FRMD3	-4,56007	0,827744	-6,11658	2,39E-06	0,0006	4,796937
NCF2	-3,87167	6,590831	-6,09529	2,52E-06	0,000602	4,823052
CLEC7A	-3,55182	8,654127	-6,08649	2,58E-06	0,000603	4,814879
THBS1	-8,05	5,008552	-6,02553	3E-06	0,000688	4,634965
VCAN	-6,83978	4,498853	-5,96761	3,46E-06	0,000765	4,509932
CYP1B1	-6,29575	3,836651	-5,96811	3,46E-06	0,000765	4,493456
IL1RN	-5,7249	4,979978	-5,94712	3,64E-06	0,00079	4,424666
RCBTB2	-4,09808	2,360706	-5,90009	4,1E-06	0,000872	4,303227
CSF3R	-3,58564	5,872072	-5,88208	4,29E-06	0,000876	4,319872
PLIN2	-3,98714	6,767757	-5,87762	4,33E-06	0,000876	4,319558
SLC11A1	-4,9985	2,61143	-5,87767	4,33E-06	0,000876	4,287702
CCL3	-6,09224	6,51937	-5,86318	4,49E-06	0,000893	4,263285
APOE	-6,66469	2,095106	-5,83272	4,85E-06	0,000947	4,208432
TJP2	-4,25222	3,309328	-5,82336	4,96E-06	0,000954	4,132006
SLA	-3,52081	6,20574	-5,79055	5,39E-06	0,001009	4,111482
LILRA3	-6,10322	2,984913	-5,78825	5,42E-06	0,001009	4,095673
LYZ	-3,68059	15,45811	-5,77671	5,58E-06	0,001023	4,067043
CRISPLD2	-5,98963	3,566684	-5,74762	6E-06	0,001083	3,98738
IGJ	6,249148	10,15096	5,722126	6,39E-06	0,001138	3,951408
MARCO	-6,42773	2,620227	-5,69596	6,83E-06	0,001197	3,89046
CXCL3	-4,93858	2,504852	-5,67785	7,15E-06	0,001234	3,823512
NLRP3	-4,88697	5,02202	-5,64064	7,85E-06	0,001336	3,729029
SIGLEC1	-4,22494	2,433216	-5,58919	8,93E-06	0,001499	3,601879
MAF	-5,33539	3,136195	-5,57956	9,15E-06	0,001515	3,585808
FPR1	-4,9445	4,750594	-5,55965	9,62E-06	0,001571	3,537688
SERINC5	-3,1989	6,944366	-5,55233	9,8E-06	0,001579	3,550046
PLAUR	-3,24862	7,527952	-5,54295	1E-05	0,001595	3,528176
STAB1	-4,64311	1,775747	-5,50149	1,11E-05	0,001748	3,404308
ACSL1	-4,80731	5,276012	-5,49476	1,13E-05	0,001755	3,396072
DPYD	-4,07758	3,317374	-5,4415	1,3E-05	0,001972	3,254054
HIST1H2BG	6,484916	3,981309	5,438331	1,31E-05	0,001972	3,252469
RTN1	-4,92505	1,552326	-5,40432	1,42E-05	0,002123	3,186616
C1QA	-6,1164	3,384504	-5,39581	1,46E-05	0,002134	3,173393
FGL2	-3,31472	6,354345	-5,38778	1,49E-05	0,002134	3,161702
IER3	-5,05468	4,64795	-5,3871	1,49E-05	0,002134	3,142505

BLVRA	-3,6865	4,740296	-5,37962	1,52E-05	0,002134	3,12898
APLP2	-2,93714	6,765064	-5,37376	1,54E-05	0,002134	3,125101
SERPINF1	5,179809	5,683909	5,377988	1,52E-05	0,002134	3,121095
SMPDL3A	-5,96541	2,577329	-5,34021	1,68E-05	0,002296	3,047332
IRAK3	-4,12212	3,877481	-5,33196	1,71E-05	0,002318	3,010001
C1QC	-5,44017	4,046026	-5,319	1,77E-05	0,002321	2,984097
GIMAP2	-4,54686	4,475124	-5,3183	1,77E-05	0,002321	2,983542
SDK2	4,112652	2,712616	5,320201	1,76E-05	0,002321	2,977328
LOC338758	-4,82684	4,188781	-5,3107	1,81E-05	0,00234	2,962813
SERPINB2	-6,43957	2,246671	-5,29521	1,88E-05	0,002391	2,942158
TLR5	-4,44483	2,926984	-5,29378	1,89E-05	0,002391	2,920942
AIF1	-3,83776	7,200749	-5,26979	2E-05	0,002515	2,876139
IL8	-4,981	6,68864	-5,25927	2,06E-05	0,002556	2,856228
KCNJ2	-4,93866	4,850299	-5,21687	2,29E-05	0,002818	2,752462
SH3BGRL	-3,3841	7,943229	-5,19672	2,41E-05	0,002936	2,691292
IL1A	-5,12748	1,640401	-5,15375	2,69E-05	0,003242	2,603966
GBP2	-4,14258	6,112386	-5,13362	2,83E-05	0,003348	2,558117
ANXA5	-2,80823	7,881897	-5,13323	2,84E-05	0,003348	2,536681
STOM	-3,37955	6,976111	-5,11555	2,97E-05	0,003465	2,500762
HMOX1	-4,86226	4,832831	-5,10829	3,02E-05	0,003465	2,494567
SIGLEC9	-4,00833	1,229215	-5,11024	3,01E-05	0,003465	2,48916
PLXDC2	-3,41469	7,91509	-5,09246	3,15E-05	0,003574	2,43904
CDH1	4,426893	4,827334	5,067709	3,35E-05	0,003771	2,38251
PLA2G7	-5,31678	2,171864	-5,06237	3,4E-05	0,003787	2,389425
BCL11A	3,042992	8,920172	5,056383	3,45E-05	0,003809	2,346572
ABCC3	-4,56241	2,481357	-5,05172	3,49E-05	0,00382	2,359048
ZEB2	-3,05854	5,613951	-5,04526	3,55E-05	0,003848	2,347728
SLC16A6	-4,26062	2,778792	-5,039	3,61E-05	0,003875	2,325561
RAB31	-2,88598	8,623447	-5,03274	3,67E-05	0,003902	2,288547
DDX60L	-3,6521	2,036281	-5,02581	3,73E-05	0,003936	2,285122
DRAM1	-3,5993	4,343618	-5,00718	3,91E-05	0,004092	2,256762
PTX3	-4,54299	1,213104	-4,90269	5,11E-05	0,005275	2,007861
CCL3L3	-6,04994	4,77601	-4,89935	5,16E-05	0,005275	2,001787
OLR1	-4,46648	3,913004	-4,8977	5,18E-05	0,005275	1,997142
EPB41L3	-3,72857	2,093297	-4,89428	5,22E-05	0,005276	1,982342
C19orf38	-3,31494	4,391993	-4,89085	5,27E-05	0,005278	1,982806
EAF1	-2,87294	9,105258	-4,86834	5,58E-05	0,005544	1,885433
GZMB	6,579565	3,808046	4,854394	5,78E-05	0,005698	1,893189
PRDM1	-2,71459	8,418609	-4,82964	6,16E-05	0,006021	1,794346
FAM129C	4,529965	4,171391	4,750263	7,55E-05	0,007215	1,64446
SERPINB6	-2,61979	6,738466	-4,75393	7,48E-05	0,007215	1,627323
STX11	-3,17704	6,589563	-4,74951	7,57E-05	0,007215	1,617566
PLBD1	-3,89657	4,380175	-4,72997	7,95E-05	0,007496	1,603155

CAMK2D	-3,0455	6,190855	-4,72837	7,99E-05	0,007496	1,576126
NAMPT	-2,60581	11,06484	-4,70789	8,42E-05	0,007839	1,478412
CD63	-3,00711	6,573231	-4,7027	8,53E-05	0,007882	1,515216
RGL1	-4,53849	2,935977	-4,6873	8,87E-05	0,008093	1,502694
SQRDL	-3,79696	6,562673	-4,68637	8,89E-05	0,008093	1,473075
CYFIP1	-3,16267	4,127755	-4,67264	9,21E-05	0,00832	1,468352
PTGS2	-4,31535	3,40588	-4,64393	9,92E-05	0,008887	1,40044
CD79A	4,306181	1,578688	4,627918	0,000103	0,009191	1,361178
C3AR1	-4,84466	2,828431	-4,60173	0,00011	0,009756	1,299961
PTGER2	-4,65635	2,288849	-4,59359	0,000113	0,009888	1,281515
GCH1	-3,28184	5,830662	-4,59007	0,000114	0,009905	1,253383
CCRL2	-4,40275	3,716255	-4,57251	0,000119	0,010286	1,232988
WDFY3	-3,50595	1,603951	-4,55844	0,000123	0,010587	1,198883
ANPEP	-4,06313	3,511539	-4,55317	0,000125	0,010654	1,187937
EGLN3	4,073425	5,238026	4,537138	0,00013	0,011011	1,150042
APOBEC3A	-3,84157	6,53819	-4,53478	0,000131	0,011011	1,118892
FCER1G	-2,96943	8,771761	-4,52136	0,000136	0,011247	1,041682
MARCKS	-2,91184	9,196278	-4,52107	0,000136	0,011247	1,036873
HNMT	-4,05995	2,358095	-4,51747	0,000137	0,011272	1,104212
SLC25A37	-2,57411	8,442309	-4,51221	0,000139	0,011347	1,025321
CCL4L1	-4,5731	1,605823	-4,50572	0,000141	0,011382	1,076694
CCL4L2	-4,5731	1,605823	-4,50572	0,000141	0,011382	1,076694
DUSP6	-3,99912	5,383786	-4,49834	0,000144	0,011521	1,054494
AGTRAP	-3,20766	4,281727	-4,48972	0,000147	0,0117	1,039482
ADAMDEC1	-4,70083	4,95401	-4,47889	0,000151	0,011871	0,997412
TNFRSF1B	-2,70126	8,011345	-4,48006	0,000151	0,011871	0,946942
PLTP	-4,36029	1,875023	-4,47199	0,000154	0,012004	0,997435
PLOD1	-3,78897	2,426325	-4,4681	0,000156	0,012045	0,989058
SMPD3	4,665092	2,550479	4,460008	0,000159	0,012163	0,966804
FCGR2A	-5,01298	6,115203	-4,45927	0,000159	0,012163	0,935168
CTSS	-2,61825	8,02744	-4,45092	0,000163	0,012347	0,875408
CLEC12A	-4,34645	4,1103	-4,44575	0,000165	0,012384	0,936047
TMEM176A	-3,62193	4,676437	-4,4448	0,000165	0,012384	0,930391
SLC1A3	-4,69567	3,271226	-4,43569	0,000169	0,012597	0,911229
COBLL1	3,914437	1,546835	4,429016	0,000172	0,012734	0,890013
MPP1	-3,98706	4,305367	-4,42253	0,000175	0,012734	0,881554
GPNMB	-5,07719	2,259411	-4,41946	0,000176	0,012734	0,864904
TBK1	-2,55177	5,399943	-4,41956	0,000176	0,012734	0,849662
LDLR	-2,76094	6,562422	-4,42644	0,000173	0,012734	0,838913
GBP1	-3,48737	7,188652	-4,39413	0,000188	0,013506	0,752013
CPVL	-3,41131	6,215198	-4,39164	0,000189	0,013511	0,777705
FABP3	-4,27272	0,479396	-4,3848	0,000193	0,013668	0,793503
RAB32	-3,50935	2,3734	-4,37053	0,0002	0,014092	0,761913

RAB3D	-3,79186	5,587442	-4,35445	0,000208	0,014598	0,683717
ZNF165	3,916621	6,212881	4,348443	0,000211	0,014738	0,666312
ASAH1	-2,79611	6,582022	-4,34332	0,000214	0,014846	0,641757
NCEH1	-3,15326	1,979815	-4,33856	0,000217	0,014855	0,687452
ITGA5	-3,28181	5,070063	-4,33974	0,000216	0,014855	0,666915
MAPK6	-3,44608	5,933262	-4,33136	0,000221	0,015045	0,62676
SIGLEC14	-3,57809	8,109368	-4,32249	0,000226	0,015303	0,564895
SLC31A2	-3,69822	5,564043	-4,29294	0,000244	0,016411	0,552107
RND3	-4,35163	0,55548	-4,28831	0,000247	0,016514	0,56819
CXCL2	-4,3149	4,050578	-4,27349	0,000256	0,017056	0,532331
TYMP	-3,1253	6,022503	-4,26864	0,000259	0,017078	0,483406
RNF13	-2,34906	5,695519	-4,26929	0,000259	0,017078	0,475396
SLCO3A1	-3,37324	3,862491	-4,26512	0,000262	0,017138	0,508714
OAZ2	-3,16218	5,424664	-4,25838	0,000266	0,01734	0,477731
FBP1	-3,90854	3,981509	-4,25447	0,000269	0,017419	0,489639
SECTM1	-4,07901	3,117137	-4,24425	0,000276	0,017784	0,464018
FAM198B	-3,63767	1,835189	-4,23927	0,00028	0,017915	0,456864
IFNGR2	-2,64094	7,378328	-4,23481	0,000283	0,018023	0,361262
UBXN11	-4,36148	2,84372	-4,22691	0,000288	0,018293	0,418537
CCL2	-4,88381	1,940268	-4,22238	0,000292	0,018408	0,402315
TNFSF10	-2,95652	6,163653	-4,19629	0,000312	0,019573	0,303263
LIMK2	-3,40485	4,044598	-4,1872	0,000319	0,019928	0,333908
AUTS2	3,275783	1,69781	4,179316	0,000326	0,020228	0,314656
LILRA6	-3,4723	3,699241	-4,16849	0,000335	0,02058	0,291355
SLC43A3	-2,91286	5,041659	-4,17006	0,000334	0,02058	0,26861
CCR1	-4,6217	4,287102	-4,14979	0,000351	0,021476	0,24199
GLUL	-3,15648	5,845966	-4,14321	0,000357	0,021728	0,191009
STRBP	3,407323	2,613097	4,137402	0,000363	0,02194	0,217972
FNDC3B	-4,21463	3,732603	-4,13231	0,000367	0,022115	0,198599
AHR	-2,35638	6,346764	-4,12971	0,00037	0,022151	0,124285
TMX4	-3,6488	2,284045	-4,10936	0,000389	0,022905	0,15599
NR1H3	-4,9586	1,821328	-4,11213	0,000387	0,022905	0,142462
LILRB1	-2,88388	6,059448	-4,11084	0,000388	0,022905	0,097747
SGPL1	-2,96855	9,103095	-4,10878	0,00039	0,022905	0,034706
CHST15	-3,28995	2,113705	-4,10105	0,000398	0,023133	0,138984
MFSD1	-2,78111	6,071769	-4,10291	0,000396	0,023133	0,07856
CARD11	3,59909	4,5636	4,098546	0,0004	0,023168	0,129662
LRP1	-3,35122	0,863092	-4,09137	0,000408	0,023481	0,115479
PFKFB4	-3,54964	1,235899	-4,07258	0,000428	0,024515	0,072698
ACP2	-3,33438	2,435476	-4,07045	0,00043	0,02453	0,065901
RUNX2	2,910484	5,385623	4,066063	0,000435	0,024688	0,009951
PTPN12	-2,71409	5,875256	-4,06071	0,000441	0,024908	-0,04172
CASP4	-2,21998	9,636681	-4,05503	0,000447	0,025152	-0,103

GK	-2,7371	5,494187	-4,04645	0,000457	0,025586	-0,03685
TNFAIP8	-2,44405	6,525644	-4,03765	0,000468	0,026044	-0,09758
SEMA7A	3,854308	1,160331	4,028791	0,000478	0,026514	-0,0452
ANXA1	-3,07191	7,308471	-4,02245	0,000486	0,02682	-0,14009
SLC15A4	3,080521	6,562006	4,012586	0,000498	0,027375	-0,15546
SBF2	-2,94403	3,460417	-4,0078	0,000504	0,027398	-0,08486
TRAF4	3,369134	1,03976	4,00686	0,000506	0,027398	-0,09115
RBM47	-2,48938	5,929072	-4,007	0,000505	0,027398	-0,15468
CDC42EP3	-3,44911	6,468029	-3,99938	0,000515	0,027798	-0,18364
HIF1A	-1,99512	10,00088	-3,9971	0,000518	0,027834	-0,24267
FGR	-2,54696	7,969062	-3,99392	0,000523	0,027933	-0,22525
SLC7A7	-4,17398	4,450513	-3,9902	0,000528	0,028074	-0,14616
VENTX	-2,79061	5,110436	-3,98074	0,00054	0,028628	-0,18464
MYO1F	-2,06827	6,546557	-3,97348	0,00055	0,029032	-0,24815
ETS2	-2,89688	5,279549	-3,97032	0,000555	0,029138	-0,20858
SOX4	2,735218	7,977928	3,953267	0,000579	0,030294	-0,31881
MTSS1	-3,53835	2,354973	-3,94241	0,000596	0,031005	-0,232
BST1	-4,28891	2,470373	-3,93246	0,000611	0,031609	-0,26525
ASGR2	-4,18076	3,801965	-3,93137	0,000613	0,031609	-0,26839
ATP2B1	-2,64059	5,698349	-3,92148	0,000628	0,032273	-0,35184
SIGLEC10	-2,71171	7,339697	-3,89611	0,00067	0,034269	-0,45281
IFI30	-2,25435	10,34579	-3,89069	0,000679	0,034595	-0,50315
ITGAV	-3,77306	1,964703	-3,87634	0,000704	0,035723	-0,38502
LY9	3,685058	4,540199	3,870641	0,000714	0,035936	-0,39491
FNIP2	-2,30064	4,7322	-3,87099	0,000714	0,035936	-0,43862
SLC7A8	-4,33603	4,28844	-3,86514	0,000724	0,036288	-0,4563
HIST1H2AC	4,446782	3,918793	3,854355	0,000745	0,036981	-0,43069
TIMP1	-4,03631	5,152919	-3,85463	0,000744	0,036981	-0,45261
IL22RA2	2,839666	0,739233	3,845707	0,000761	0,037637	-0,46146
GIMAP4	-3,92791	2,163481	-3,84249	0,000767	0,037637	-0,4665
C15orf48	-3,69703	4,475491	-3,84314	0,000766	0,037637	-0,47011
APOL3	-3,24615	4,063273	-3,83744	0,000777	0,03785	-0,47935
TPRA1	-3,16477	4,536523	-3,83656	0,000779	0,03785	-0,50483
FOXO3	-2,54874	5,370725	-3,83541	0,000781	0,03785	-0,56642
OAF	-3,71941	1,891297	-3,82748	0,000797	0,03833	-0,49497
EPHB2	-3,93508	1,362487	-3,82722	0,000797	0,03833	-0,49702
SLC38A7	-3,21102	1,647664	-3,81822	0,000816	0,038815	-0,50853
GAA	-2,56491	3,892932	-3,81846	0,000815	0,038815	-0,51699
SLCO2B1	-4,26365	3,176926	-3,81749	0,000817	0,038815	-0,52772
GAB1	3,36106	1,907502	3,811445	0,00083	0,039004	-0,53576
SLAMF8	-4,43665	3,001895	-3,81087	0,000831	0,039004	-0,54653
HK2	-3,21808	5,216188	-3,81265	0,000827	0,039004	-0,59959
PILRA	-3,74135	3,885697	-3,80703	0,000839	0,039229	-0,54275

FOLR2	-4,6826	1,291146	-3,80153	0,000851	0,039623	-0,57615
IFITM3	-3,04425	6,228938	-3,79912	0,000856	0,039709	-0,63066
NAIP	-2,05267	5,70328	-3,79185	0,000872	0,039978	-0,65553
LILRA5	-2,56206	6,204684	-3,79217	0,000871	0,039978	-0,66305
CAPZA2	-1,98114	6,541634	-3,7947	0,000866	0,039978	-0,67445
ATP6V1B2	-3,05664	4,998198	-3,77726	0,000905	0,041319	-0,63648
CLEC10A	-2,95929	5,551312	-3,76944	0,000923	0,041981	-0,68286
FUCA2	-3,02981	2,681143	-3,7576	0,000951	0,042954	-0,64591
ZFP30	3,291268	3,649289	3,757337	0,000951	0,042954	-0,6496
CCL20	-4,69742	1,69715	-3,7524	0,000963	0,043164	-0,68468
TMEM33	-1,95246	8,115389	-3,7533	0,000961	0,043164	-0,80449
ZEB1	2,874676	2,129307	3,748877	0,000972	0,043262	-0,67178
AGTPBP1	-2,47148	4,976969	-3,74854	0,000973	0,043262	-0,72305
SPNS1	-2,27461	4,623892	-3,74509	0,000981	0,043477	-0,70971
MPHOSPH6	-3,98369	2,83349	-3,7416	0,00099	0,043698	-0,70326
CLEC4E	-3,12927	3,680306	-3,73594	0,001004	0,044162	-0,70669
IGSF6	-3,2539	5,619054	-3,72822	0,001024	0,044864	-0,78349
LYVE1	-3,80222	0,368329	-3,71226	0,001066	0,046531	-0,75522
CREG1	-3,10756	4,596006	-3,70191	0,001094	0,047584	-0,80721
TNFAIP3	-2,53944	7,040456	-3,6867	0,001136	0,049258	-0,94024

Table S3: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in UC – 0.05<FDR<0.1

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
ERO1L	-3,40478	2,483276	-3,93777	0,000761	0,050973	-0,41602
SLA	-2,35031	6,43464	-3,96086	0,00072	0,049699	-0,42805
CCR6	2,509048	5,126567	3,950772	0,000738	0,049699	-0,42941
PLBD1	-3,93498	4,678456	-3,92471	0,000785	0,05229	-0,44978
FCRL1	3,665771	2,355667	3,914769	0,000804	0,052659	-0,46624
LOC338758	-3,83296	3,87877	-3,90299	0,000827	0,053861	-0,48982
CTSS	-2,70923	7,979312	-3,95217	0,000735	0,049699	-0,49908
SAT1	-2,27995	13,4442	-3,99699	0,000661	0,047183	-0,52129
CSTA	-4,34112	2,91936	-3,89088	0,000851	0,054954	-0,52985
KCNE3	-3,38581	3,955013	-3,88402	0,000865	0,055438	-0,53148
APLP2	-2,29094	6,919191	-3,91929	0,000795	0,052383	-0,53848
APOBEC3A	-3,11196	4,812865	-3,88998	0,000853	0,054954	-0,53911
CCPG1	-3,07464	3,451099	-3,87338	0,000887	0,055982	-0,54671
DUSP22	3,601353	3,140363	3,869792	0,000895	0,056139	-0,56046
SLC38A7	-3,49598	1,969898	-3,87319	0,000888	0,055982	-0,56187
LEPREL1	3,025709	0,669179	3,867482	0,0009	0,056153	-0,57881
SH3BGRL	-2,40869	8,159901	-3,91954	0,000795	0,052383	-0,58531
KIF23	2,908467	1,364247	3,858517	0,000919	0,056476	-0,59463
ADM	-3,70016	2,288926	-3,85257	0,000932	0,056912	-0,60524
GNS	-3,44352	5,425703	-3,86185	0,000912	0,056476	-0,60771
P2RX7	-3,03104	4,952789	-3,86047	0,000915	0,056476	-0,6107
IRAK3	-3,08831	4,287834	-3,8417	0,000957	0,057592	-0,62721
TCL1A	3,566157	4,955871	3,847399	0,000944	0,057106	-0,62996
CD79A	3,411477	1,310487	3,833108	0,000976	0,058485	-0,65715
SASH1	-2,97695	2,541548	-3,82206	0,001002	0,059481	-0,65722
PRDM1	-2,65471	7,322607	-3,87766	0,000878	0,055982	-0,6708
TMEM2	-2,48349	5,595377	-3,85097	0,000936	0,056912	-0,67796
ACVRL1	-2,94769	0,646185	-3,8218	0,001003	0,059481	-0,67859
TMPRSS13	3,038694	0,867897	3,816986	0,001014	0,059867	-0,6927
LOC100188947	3,432109	2,274603	3,798812	0,001059	0,0622	-0,72749
RBM38	3,847206	2,867541	3,794467	0,00107	0,062538	-0,73311
TPM2	3,804227	2,804566	3,787996	0,001087	0,063196	-0,74552
GPR114	3,389652	2,19333	3,78151	0,001104	0,063557	-0,75359
GZMB	5,569911	3,208443	3,785897	0,001092	0,063204	-0,75629
NRG1	-3,85539	2,001999	-3,77112	0,001131	0,063602	-0,77747
GCH1	-3,87859	4,671469	-3,77486	0,001121	0,063602	-0,79084
PSENN	-4,26651	3,007772	-3,77278	0,001127	0,063602	-0,7916
MT1E	-4,04513	1,718232	-3,7672	0,001142	0,063602	-0,79837
CAMKK2	-3,03026	3,823223	-3,74789	0,001195	0,065524	-0,82733
AP3S2	-3,76435	3,137325	-3,74859	0,001193	0,065524	-0,83123

MCOLN2	2,866873	3,432804	3,745077	0,001203	0,065524	-0,83138
MBIP	3,29696	1,378266	3,744923	0,001204	0,065524	-0,84644
TSPAN14	-3,19817	5,008543	-3,73576	0,00123	0,066357	-0,87362
PSAP	-2,6416	8,888671	-3,7768	0,001116	0,063602	-0,90536
GBP2	-3,54717	5,171637	-3,72478	0,001263	0,067497	-0,90776
CCND2	2,659088	4,663932	3,739836	0,001218	0,066018	-0,91551
SLC16A6	-3,64092	2,183159	-3,70362	0,001328	0,069718	-0,92298
SOX4	2,592395	7,12416	3,76723	0,001142	0,063602	-0,92418
GFRA2	-3,37585	1,714907	-3,70611	0,00132	0,069614	-0,92436
VMP1	-1,98099	8,720874	-3,77098	0,001132	0,063602	-0,93239
EAF1	-2,44316	7,617913	-3,75734	0,001169	0,064805	-0,95265
SLC7A5	3,295618	3,608713	3,685261	0,001387	0,072181	-0,96209
ACY3	3,595004	2,335669	3,678596	0,001409	0,072401	-0,98305
CYBB	-2,32102	8,025134	-3,7304	0,001246	0,066903	-0,99462
BANK1	3,293554	3,191656	3,661811	0,001466	0,074476	-1,00551
STOM	-2,08724	6,894001	-3,7134	0,001297	0,068726	-1,01227
CYFIP2	2,938793	3,920536	3,660794	0,001469	0,074476	-1,02325
RIN2	-2,58763	7,383137	-3,71914	0,00128	0,0681	-1,03892
PID1	-3,30372	3,88081	-3,64661	0,001519	0,076427	-1,04471
AOAH	-3,43542	5,849637	-3,65932	0,001474	0,074476	-1,04728
SLC5A6	2,712521	5,124657	3,671912	0,001431	0,07322	-1,05318
CD63	-2,41935	7,343755	-3,68901	0,001374	0,071857	-1,05354
PAIP2B	2,889556	2,533408	3,636255	0,001557	0,077258	-1,05695
PYGL	-3,59423	3,237846	-3,63629	0,001557	0,077258	-1,06289
NREP	3,052292	3,883986	3,634959	0,001562	0,077258	-1,07402
SERPINB2	-3,84094	2,904722	-3,62629	0,001594	0,078209	-1,09191
CREG1	-3,65374	4,638332	-3,619	0,001622	0,079242	-1,11088
LINC00189	-3,02319	1,485288	-3,61285	0,001646	0,080003	-1,11243
HSPA7	-3,53656	2,988431	-3,6115	0,001651	0,080003	-1,11399
PLXDC2	-2,16403	7,883075	-3,67848	0,001409	0,072401	-1,12335
SH3PXD2B	-2,93109	0,859943	-3,60634	0,001671	0,080332	-1,14505
C19orf59	-3,16118	1,405317	-3,60675	0,00167	0,080332	-1,14615
PRICKLE1	2,581881	0,4279	3,596169	0,001712	0,081954	-1,16813
HIF1A	-1,86142	9,488781	-3,67986	0,001404	0,072401	-1,17278
GPR84	-3,34704	2,224349	-3,58204	0,00177	0,084017	-1,17829
GPCPD1	-2,06866	6,299954	-3,6307	0,001578	0,077716	-1,18773
RHOF	2,669867	6,631206	3,635781	0,001559	0,077258	-1,19511
SCO2	-4,2686	3,813044	-3,58057	0,001776	0,084017	-1,19588
ENPP2	-3,59387	4,063011	-3,57386	0,001804	0,084738	-1,19815
ANKRD22	-3,32101	3,101503	-3,56436	0,001845	0,085057	-1,2114
RBM47	-2,92426	5,178592	-3,591	0,001733	0,082628	-1,21552
CAMK1	-3,47465	1,387068	-3,57133	0,001815	0,084738	-1,22454
TMEM5	2,887622	0,927531	3,566505	0,001836	0,085057	-1,23193

MPP1	-2,60227	5,366632	-3,57252	0,00181	0,084738	-1,24118
OAF	-2,97171	0,625577	-3,54901	0,001913	0,087221	-1,26044
NFIA	-2,87392	2,736647	-3,53869	0,00196	0,088188	-1,26462
SLC31A2	-3,60612	5,292656	-3,55145	0,001902	0,087221	-1,27856
SULT1A1	-3,00997	4,76119	-3,5469	0,001923	0,087221	-1,28599
GPBAR1	-3,35798	0,512013	-3,53927	0,001958	0,088188	-1,29442
NDRG2	3,466753	3,423026	3,523593	0,002031	0,090023	-1,30454
AMIGO3	2,693435	4,446084	3,546587	0,001924	0,087221	-1,30974
SLC29A1	3,275244	3,099322	3,510967	0,002093	0,091381	-1,32697
STEAP3	-2,75456	0,335648	-3,53187	0,001992	0,08912	-1,32755
PTX3	-3,63624	1,362601	-3,52187	0,00204	0,090055	-1,33384
NFIL3	-1,90819	7,063843	-3,57027	0,00182	0,084738	-1,33801
ACP2	-4,0612	3,008311	-3,50817	0,002107	0,09165	-1,34324
TNFRSF1B	-2,4058	7,591991	-3,56374	0,001848	0,085057	-1,36333
OLR1	-3,388	2,624158	-3,49007	0,002198	0,093923	-1,37409
HOMER3	-3,06398	0,811379	-3,49323	0,002182	0,093742	-1,38209
ZEB1	2,885768	0,600238	3,492414	0,002186	0,093742	-1,38786
SERPINF1	2,629505	5,532674	3,5135	0,00208	0,091364	-1,40022
LILRA4	3,43928	5,433086	3,512607	0,002085	0,091364	-1,40246
ZNF165	3,1437	5,000444	3,525049	0,002024	0,090023	-1,40628
PSMD12	-2,59367	6,723698	-3,53104	0,001996	0,08912	-1,42211
GNAQ	-3,52814	2,740003	-3,46509	0,002331	0,098888	-1,43672
CMKLR1	-3,66831	2,920464	-3,4636	0,002339	0,098888	-1,44157

Table S4: Differentially expressed genes between DCs and Macrophages in CD – 0.05<FDR<0.1

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B
ANKRD22	-4,18262	4,480432	-3,67583	0,001168	0,050438	-0,86663
AOAH	-2,92897	5,3138	-3,67297	0,001176	0,050618	-0,90651
WARS	-2,25269	8,099089	-3,66727	0,001193	0,051163	-1,00672
POLB	3,385068	3,813401	3,658954	0,001218	0,051869	-0,87251
SAMSN1	-2,07881	5,616616	-3,65948	0,001217	0,051869	-0,96184
PLEKHG1	2,923454	1,925746	3,657428	0,001223	0,051883	-0,88345
PPFIBP2	-3,20398	1,982146	-3,6518	0,00124	0,052249	-0,887
ANO10	-3,81377	2,105236	-3,65311	0,001236	0,052249	-0,89885
SNX27	-2,23603	8,523614	-3,64927	0,001248	0,052396	-1,05264
DSC2	-2,57366	4,704835	-3,64678	0,001256	0,052539	-0,96543
GPCPD1	-2,1704	6,931307	-3,64485	0,001262	0,052609	-1,03906
TOMM40L	-3,38677	2,263211	-3,64069	0,001275	0,052976	-0,91815
MGAT1	-2,08556	8,566722	-3,63255	0,001302	0,053879	-1,09506
GIMAP8	-3,45251	2,220444	-3,63045	0,001309	0,053976	-0,94149
GIMAP5	-3,89261	1,427067	-3,62779	0,001317	0,054134	-0,95377
DAAM1	3,987411	4,471001	3,626535	0,001321	0,054134	-0,96983
SLC35F6	-2,21527	9,21305	-3,62486	0,001327	0,054175	-1,12416
SMA5	-3,01594	6,591429	-3,62246	0,001335	0,054316	-1,09116
PLB1	-2,81739	0,840944	-3,61938	0,001345	0,05455	-0,95999
ARL8B	-1,87145	7,369003	-3,61602	0,001357	0,054824	-1,11762
CHSY1	-2,39289	5,152316	-3,60896	0,001381	0,055614	-1,08707
ITGAM	-2,91657	3,275557	-3,59712	0,001422	0,057092	-1,01375
LOC93622	2,393736	0,329209	3,5941	0,001433	0,057332	-1,03433
HCK	-2,21372	6,127365	-3,58798	0,001455	0,058022	-1,13686
CD33	-2,70168	4,640002	-3,57729	0,001495	0,059395	-1,08991
KCNMA1	-3,28696	0,664405	-3,57374	0,001508	0,059525	-1,06703
IQGAP1	-1,66529	6,433072	-3,574	0,001507	0,059525	-1,19591
CLEC4C	3,672525	2,554566	3,56405	0,001545	0,060783	-1,11614
LAMP5	3,709566	1,31314	3,562377	0,001551	0,060823	-1,11966
CD44	-2,29655	8,342537	-3,56115	0,001556	0,060823	-1,2635
GAS7	-3,01003	3,050519	-3,55827	0,001567	0,060987	-1,09423
SDC3	-3,63376	0,491236	-3,55632	0,001575	0,060987	-1,1066
TBXAS1	-3,17254	4,359713	-3,55485	0,001581	0,060987	-1,12123
IRAK2	-2,75208	4,487689	-3,55556	0,001578	0,060987	-1,14712
CLIP1	-1,99878	4,221022	-3,55297	0,001588	0,061077	-1,16521
IL18R1	2,883115	2,378712	3,548953	0,001604	0,061493	-1,13171
CPM	-2,60647	5,634749	-3,54429	0,001623	0,062013	-1,23626
EIF4E3	-3,2454	2,451581	-3,53654	0,001655	0,063015	-1,15142
GIMAP1	-3,23508	2,752796	-3,53529	0,00166	0,063015	-1,16013
ADAP2	-3,1149	4,132217	-3,53314	0,001669	0,063153	-1,21153

CAST	-1,91554	6,333039	-3,53171	0,001675	0,063177	-1,2891
UPP1	-3,26069	3,783114	-3,52747	0,001692	0,063647	-1,17602
IL2RA	-2,87792	2,471448	-3,5204	0,001723	0,064574	-1,17668
FLT3	3,078439	3,867284	3,514625	0,001747	0,065304	-1,19379
MS4A4A	-3,67072	2,840231	-3,51177	0,00176	0,065564	-1,21369
CLIP4	-2,87571	0,900052	-3,50648	0,001783	0,065816	-1,20784
IRAK1	-2,13653	7,683173	-3,50785	0,001777	0,065816	-1,37248
MXD1	-2,04396	7,661297	-3,50676	0,001782	0,065816	-1,37377
SFXN3	-2,45557	4,147818	-3,50297	0,001799	0,065983	-1,24395
GLIPR2	-1,90666	7,370394	-3,50407	0,001794	0,065983	-1,37481
NOTCH3	2,221873	0,094064	3,500233	0,001811	0,066231	-1,25112
RIPK2	-3,00684	5,684293	-3,4912	0,001852	0,067529	-1,33803
DOCK4	-3,31475	2,207867	-3,48709	0,001871	0,068014	-1,26288
PAPSS2	-3,45387	1,93363	-3,48255	0,001893	0,068576	-1,26882
SGK1	-2,62826	6,393844	-3,48044	0,001903	0,068727	-1,39567
ARHGEF40	-3,02409	1,383127	-3,47509	0,001928	0,069227	-1,27781
TCF4	2,393019	6,476504	3,476298	0,001922	0,069227	-1,40959
BNIP3L	-2,31431	5,553077	-3,47324	0,001937	0,069338	-1,39935
SIDT1	3,843056	3,736139	3,470263	0,001951	0,069642	-1,30262
TBC1D2	-3,54018	2,581532	-3,46804	0,001962	0,069653	-1,31589
ABHD15	2,821405	4,80535	3,467793	0,001963	0,069653	-1,32849
LRRK2	-2,88394	2,410403	-3,46209	0,001991	0,070227	-1,30465
USP2	-2,38419	4,267377	-3,46213	0,001991	0,070227	-1,39801
OGT	2,009995	7,059915	3,453814	0,002032	0,071473	-1,47882
SLC19A1	-2,02582	4,496899	-3,45116	0,002046	0,071734	-1,39082
TNF	-3,25204	2,824864	-3,44733	0,002065	0,072205	-1,34681
SDC4	-2,42963	8,251961	-3,44545	0,002075	0,07233	-1,53119
LTBR	-2,49953	4,159673	-3,43742	0,002117	0,073568	-1,38302
LOC441081	-2,52316	5,573854	-3,43562	0,002126	0,073682	-1,49681
CYBB	-2,14797	8,306938	-3,43012	0,002155	0,074476	-1,56688
IFI6	-2,66347	8,290774	-3,42008	0,00221	0,076129	-1,58832
ADCY9	-2,67241	0,869466	-3,41391	0,002244	0,077077	-1,40722
CARNS1	3,008558	1,983925	3,406913	0,002283	0,077888	-1,44818
CEACAM4	-3,31359	1,101494	-3,40522	0,002292	0,077888	-1,4491
FCGR1B	-3,87565	1,676075	-3,40504	0,002293	0,077888	-1,45457
TKT	-2,33912	5,910705	-3,40622	0,002287	0,077888	-1,54136
ADAMTSL4	-2,91182	0,122599	-3,39467	0,002353	0,079457	-1,46174
FYB	-2,41081	7,539379	-3,39545	0,002348	0,079457	-1,63458
SLC48A1	-2,25174	6,014987	-3,39294	0,002363	0,079571	-1,6042
MAGED1	4,024815	3,398883	3,383422	0,002419	0,081005	-1,49799
GLT25D1	-1,98203	10,09291	-3,38359	0,002418	0,081005	-1,69692
TCL1A	4,794311	5,239296	3,371371	0,002492	0,08311	-1,54449
EMR2	-2,19707	5,363554	-3,37075	0,002496	0,08311	-1,61363

FAM57A	2,883505	1,251023	3,362178	0,002549	0,084413	-1,55375
FAM102B	-2,5608	3,231013	-3,36316	0,002543	0,084413	-1,55803
TGIF1	-2,42789	4,869416	-3,35757	0,002578	0,08514	-1,65828
ZNF559	3,099832	2,195113	3,354821	0,002596	0,085247	-1,56849
PLD3	-2,22171	4,820636	-3,35576	0,00259	0,085247	-1,60544
SPI1	-3,42089	1,466876	-3,34584	0,002654	0,086364	-1,57366
ATF6	-2,09565	4,503747	-3,34779	0,002641	0,086364	-1,64449
RBPJ	-1,88617	6,748301	-3,34663	0,002649	0,086364	-1,72761
EGR1	-2,8449	10,44966	-3,34508	0,002659	0,086364	-1,78382
FCGR2B	-2,82138	3,629048	-3,34102	0,002685	0,086993	-1,58949
WNT5A	2,801518	1,183092	3,339551	0,002695	0,087072	-1,60559
PVRL2	-3,14059	3,35317	-3,33778	0,002707	0,087216	-1,60355
DYSF	-3,33104	0,435448	-3,33272	0,002741	0,08807	-1,59906
ARRB1	-2,85549	2,739621	-3,33147	0,002749	0,088104	-1,59665
TNFRSF1A	-2,09515	5,395999	-3,3273	0,002778	0,088773	-1,71867
SOAT1	-1,73095	6,409451	-3,32553	0,00279	0,088921	-1,76657
ABL2	-2,12263	4,651577	-3,3244	0,002797	0,08893	-1,69298
MED12L	2,56442	2,671709	3,320357	0,002825	0,089342	-1,6156
ATP2A3	2,686274	2,866084	3,320516	0,002824	0,089342	-1,62294
DOCK5	-2,23363	4,965455	-3,31602	0,002856	0,090059	-1,73826
RARRES3	-4,08805	2,435853	-3,31428	0,002868	0,090206	-1,66032
SLC31A1	-1,98373	5,4076	-3,31307	0,002876	0,090237	-1,75812
GGT5	-3,06971	0,68582	-3,30957	0,002901	0,090775	-1,6456
ENG	-3,1122	2,894488	-3,30707	0,002919	0,091095	-1,65523
ZC3H12C	-2,50054	0,069985	-3,29645	0,002996	0,09246	-1,67074
DMXL2	-2,87374	3,549159	-3,29696	0,002992	0,09246	-1,68802
TREM1	-3,93162	2,01087	-3,29851	0,002981	0,09246	-1,69209
DAB2	-2,30257	4,88627	-3,29571	0,003002	0,09246	-1,77131
CXCL16	-1,97595	5,727011	-3,29974	0,002972	0,09246	-1,78459
TANK	-1,7136	7,220068	-3,29425	0,003012	0,092553	-1,85568
GFRA2	-3,08307	0,590973	-3,29296	0,003022	0,092607	-1,68055
APOL6	-2,42306	5,151465	-3,29014	0,003043	0,09301	-1,81132
C12orf44	2,786412	4,105342	3,287231	0,003065	0,093435	-1,70855
OSBPL1A	-3,45343	2,10916	-3,28493	0,003082	0,093572	-1,71929
PSAP	-2,42647	8,427148	-3,28455	0,003085	0,093572	-1,89688
PPIF	-3,08753	4,938247	-3,28318	0,003095	0,093649	-1,76334
ATP8B4	-2,84999	2,168754	-3,2739	0,003166	0,095076	-1,71541
CPQ	-3,37256	3,147138	-3,27409	0,003165	0,095076	-1,75732
CXCL9	-4,91641	6,233916	-3,27561	0,003153	0,095076	-1,84887
ADAM9	-2,12427	4,026408	-3,27177	0,003183	0,095095	-1,79468
VMP1	-2,01896	9,12657	-3,27246	0,003178	0,095095	-1,93196
ACVR2A	-3,06761	4,568825	-3,26776	0,003214	0,095749	-1,84061
ADAM17	-1,7094	7,877708	-3,26692	0,003221	0,095749	-1,93095

SPON2	2,908929	1,135717	3,263858	0,003245	0,096229	-1,77723
EPS8	-3,07225	0,957631	-3,24996	0,003357	0,099062	-1,77649
FCGRT	-2,29104	7,054256	-3,25083	0,00335	0,099062	-1,94722

Table S5: Chi square test for distribution HLA-DR⁺SIRPα⁺ subpopulations

CD14 ⁻ CD64 ⁻ FlowSOM clusters											
		Cluster A	Cluster B	Cluster C	Cluster D						
UC	count	94	18	18	262	*** p-value = 0.0001					
	%	24.00	4.59	4.49	66.80						
CD	count	49	14	13	318						
	%	12.40	3.55	3.30	80.70						
CD14 ⁺ CD64 ⁺ FlowSOM clusters											
		Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4				Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
UC	count	36	33	42	19	30	138	62	**** p-value < 0.0001		
	%	10.00	9.17	11.70	5.28	8.33	38.30	17.20			
CD	count	99	21	38	18	19	68	17			
	%	35.40	7.50	13.60	6.43	6.79	24.30	6.07			

Table S6: Clinical information

	UC	CD	Non IBD
N	14	35	12
Females, n(%)	9(64,2)	22(62.8)	6(50)
Age, median (range)	33(18-80)	41(12-67)	60(41-80)
Age at diagnosis			
< 16	3	9	
17-40	7	23	
> 40	4	3	
Treatment			
None	0	3	
Thiopurine or methotrexate	6	17	
TNF α inhibitor	6	19	
Anti-IL-12p40	0	1	
Anti- α 4 β 7 integrin	2	0	
Corticosteroid	9	13	
Disease location - UC			
Proctitis	1		
Left side colitis	3		
Pancolitis	10		
Proximal colitis	0		
Disease location - CD			
Terminal ileum		0	
Colon		13	
Ileocolonic		22	
Upper GI tract		0	
Disease behavior - CD			
Non stricturing - Non penetrating		2	
Stricturing		20	
Penetrating		13	
Perianal disease		8	
Diagnosis - Control			
Diverticulosis			12

Table S7 : Flow cytometry human antibodies

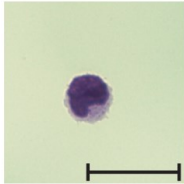
Antibody	Conjugate	Clone	Company
Anti-HLADR	APC	L243	BioLegend
Anti-HLADR	AF700	L243	BioLegend
Anti-HLADR	BV510	L243	BioLegend
Anti-CD3	BV510	UCHT1	BioLegend
Anti-CD3	BV496	UCHT1	BD Biosciences
Anti-CD4	BV510	RPA-T4	BioLegend
Anti-CD4	BV785	OKT4	Biolegend
Anti-CD8a	APC	RPA-T8	BioLegend
Anti-CD8a	BV787	SK1	BD Biosciences
Anti-CD14	APC	M5E2	BioLegend
Anti-CD14	Pacific blue	HCD14	BioLegend
Anti-CD14	BUV737	M5E2	BD Biosciences
Anti-CD25	APC	M-A251	BD Biosciences
Anti-CD25	BV510	M-A521	BD Biosciences
Anti-CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences
Anti-CD45RA	Alexa fluor 488	HI100	BioLegend
Anti-CD45RO	PerCP/Cy5.5	UCHL1	BioLegend
Anti-CD62L	PeCy7	DREG-56	Biolegend
Anti-CD64	FITC	10.1	BioLegend
Anti-CD163	PerCP/Cy5.5	GHI/61	BioLegend
Anti-CD172a	PE-Cy7	SE5A5	BioLegend
Anti-CD183 (CXCR3)	AlexaFluor 488	G025H7	BioLegend
Anti-CD196 (CCR6)	PE	G034E3	BioLegend
Anti-TNF α	Alexa Fluor-700	Mab11	Biolegend
Anti-INF γ	PerCP/Cy5.5	4S.B3	BioLegend
Anti-INF γ	AF700	4S.B3	BioLegend
Anti-INF γ	BV711	4S.B3	BioLegend
Anti-IL-1 β	PE	8516	R&D
Anti-IL-6	Pacific Blue	MQ2.13A5	Biolegend
Anti-IL-10	PE	JES3-9D7	Biolegend
Anti-IL12p40	PE	C8.6	eBiosciences
Anti-IL-17A	Alexa 647	BL168	BioLegend
Anti-IL-17A	PE-Cy7	BL168	BioLegend
Anti-IL-23p19	APC	23dcdp	EBioscience

Table S8 : CyTOF anti-human antibodies

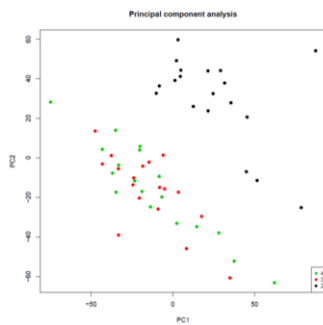
Target	Clone	Metal	Catalog	Status
CD66b	6/40c	141Pr		Custom Conjugation (Biolegend®)
MARCO	polyclonal	153Eu		Custom Conjugation (R&D system®)
CD169	7-239	154Sm		Custom Conjugation (Biolegend®)
CD1c - BDCA1	L161	162Dy		Custom Conjugation (Biolegend®)
MERTK	590H11G1E2	164Dy		Custom Conjugation (Biolegend®)
CD103	Ber-ACT8	166Er		Custom Conjugation (Biolegend®)
CD19	H1B19	142Nd	3142001B	Fluidigm®
Slan (biotin)	MDC-8	143Nd	3143008B	Fluidigm®
CD16	3G8	148Nd	3148004B	Fluidigm®
CD123 (IL-3R)	6H6	151Eu	3151001B	Fluidigm®
CD11c	Bu15	159Tb	3159001B	Fluidigm®
CD14	M5E2	160Gd	3160001B	Fluidigm®
CD3	UCHT1	170Er	3170001B	Fluidigm®
CD38	HIT2	172Yb	3172007B	Fluidigm®
HLA-DR	L243	174Yb	3174001B	Fluidigm®
CD45	HI30	89Y	3089003B	Fluidigm®
CD209 - FITC	Anti-FITC	144Nd	3144006C	Fluidigm®
CD163	GHI/61	145Nd	3145010C	Fluidigm®
CD64	10.1	146Nd	3146006C	Fluidigm®
CD303 (BDCA2)	201A	147Sm	3147009C	Fluidigm®
CD127	A019D5	149Sm	3149011C	Fluidigm®
FceRI	AER-37 [CRA-1]	150Nd	3150027C	Fluidigm®
CD36	5-271	152Sm	3152007C	Fluidigm®
IRF4-3155014B	3E4	155Gd	3155014C	Fluidigm®
CD204	351615	156Gd	3156025C	Fluidigm®
CD135 (Flt3)	BV10A4H2	158Gd	3158019C	Fluidigm®
CD370 (CLEC9A)	8F9	161Dy	3161018C	Fluidigm®
CD272 (BTLA)	MIH26	163Dy	3163009C	Fluidigm®
CD300E - PE	Anti-PE	165Ho	3165015C	Fluidigm®
CD197 (CCR7)	G043H7	167Er	3167009A	Fluidigm®
CD206 (MMR)	15-2	168Er	3168008C	Fluidigm®
CD33	WM53	169Tm	3169010C	Fluidigm®
CD68	Y1/82A	171Yb	3171011C	Fluidigm®
CD141	1A4	173Yb	3173002C	Fluidigm®
CD172a/b (SIRPa/b)	SE5A5	175Lu	3175024C	Fluidigm®
TREM1 - APC	anti-APC	176Yb	3176007C	Fluidigm®
CD11b (Mac-1)	ICRF44	209Bi	3209003C	Fluidigm®

ANNEXE 6 : MORPHOLOGIE, CLUSTERING ET FONCTION PRÉSENTATRICE D'ANTIGÈNE DES MPNS CD14⁺CD64⁺CD163⁻ GANGLIONNAIRES

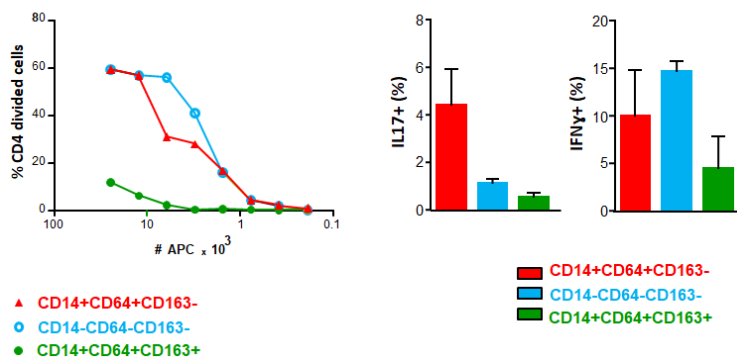
A.



B.



C.

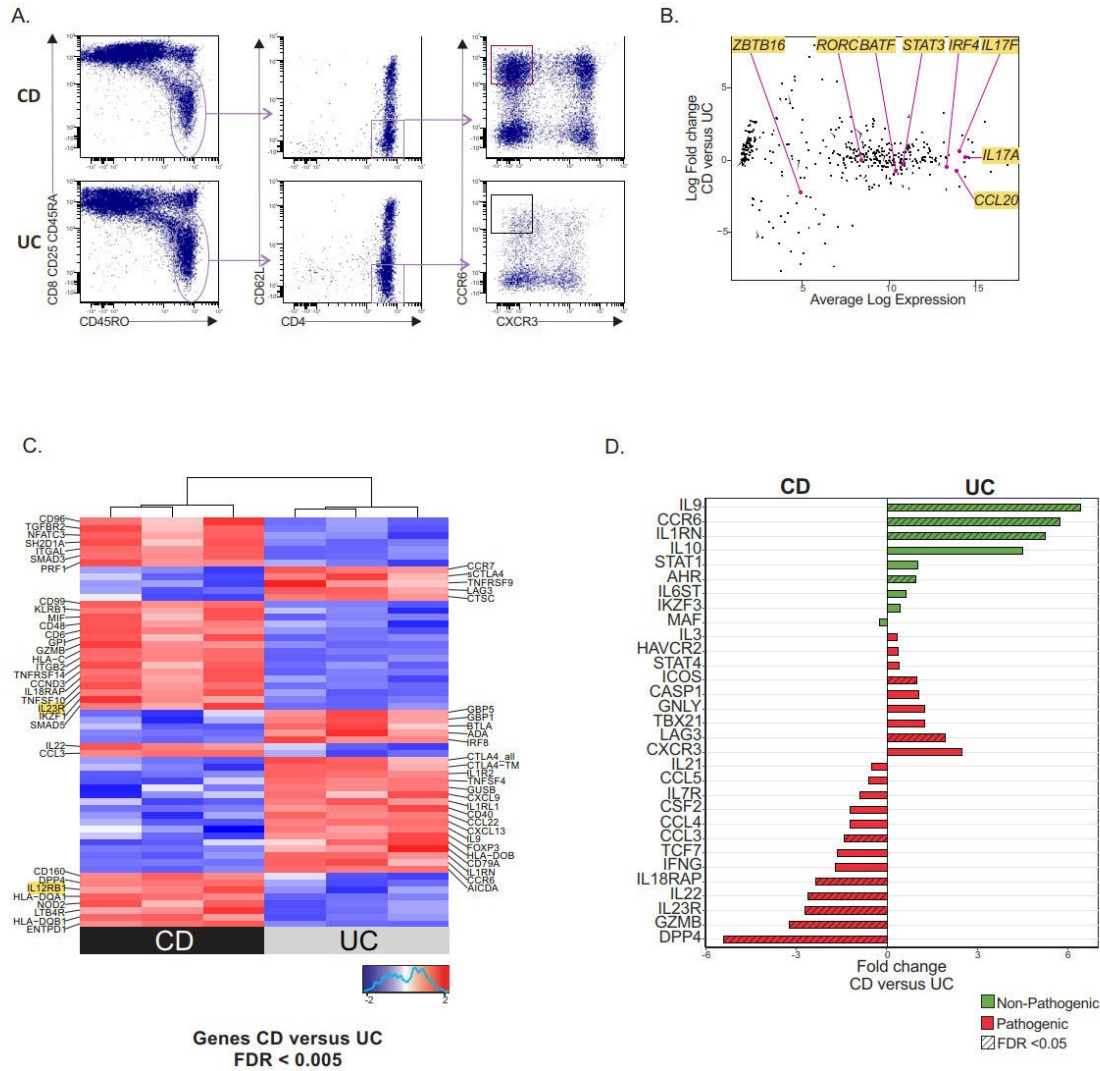


A. Morphologie des cellules CD14⁺CD64⁺CD163⁻ isolées des MLNs d'un patient atteint de MC (bar=20µm).

B. Séquençage de l'ARN total ('Bulk RNA') des cellules CD14⁻CD64⁻CD163⁻ (black dots : $n=7$ MC, $n=5$ CU), CD14⁺CD64⁺CD163⁺ (red dots : $n=5$ MC, $n=5$ CU), et CD14⁺CD64⁺CD163⁻ (green dots : $n=5$ MC, $n=5$ CU), purifiées des MLNs et de la muqueuse de patients atteints de MC et CU. Analyse en PCA (Principal component analysis).

C. Les cellules CD14⁻CD64⁻CD163⁻, CD14⁺CD64⁺CD163⁺ et CD14⁺CD64⁺CD163⁻ isolées des MLNs de patients atteints de CD et UC ont été cultivées avec des lymphocytes T naïfs allogéniques. **Panel gauche** : Prolifération des cellules marquées au CFSE. Une expérience représentative (MC : $n=6$ patients, CU : $n=1$ patient). **Panel droit** : Expression intra-cytoplasmique d'IL-17 et d'IFN- γ après culture par les lymphocytes T CD4⁺.

ANNEXE 7 : TRANSCRIPTOME DES LYMPHOCYTES GANGLIONNAIRES Th17 MEMOIRES EN MC ET EN CU



A. Gating strategy for sorting CCR6⁺CXCR3⁻ Th17 T_{EM} from MLNs of UC and CD patients.

B to D. Transcriptomic analysis (Nanostring technology – human immunology V2 panel – 570 genes) after 6 days culture of anti-CD3/anti-CD28 stimulated Th17 T_{EM}, purified from MLNs of UC ($n=3$) and CD ($n=3$) patients.

B, Log fold change of RNA expression in UC vs CD versus average log expression.

C, Heatmap of discriminative genes between CD and UC patients (FDR<0.005).

D, Relative expression (fold change) of human pathogenic Th17-signature (red, Ramesh et al., 2014; Hu et al., 2017) and non pathogenic Th17-signature (green, Ramesh et al, 2014; Hu et al., 2017) in CD and UC patients.