

Université de Montréal

**Caractérisation des variations fonctionnelles des cellules
NK entre deux lignées murines**

par

Victor Mullins-Dansereau

Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de Maîtrise (M.Sc.)

en Microbiologie et Immunologie

Août, 2018

© Victor Mullins-Dansereau, 2018

Résumé

Les cellules tueuses naturelles (NK) font partie du système immunitaire inné et participent activement à l'immunosurveillance antivirale et antitumorale. Celles-ci sont principalement cytotoxiques et induisent la lyse des cellules cibles par de multiples fonctions effectrices telles que la production de cytokines et de granules cytotoxiques ou l'expression de ligands de mort. Alors que la différenciation des cellules hématopoïétiques en cellules NK se fait dans la moelle osseuse, l'acquisition de leurs fonctions cytotoxiques se fait principalement en périphérie au cours d'un processus séquentiel en quatre étapes appelé maturation fonctionnelle. Cette maturation est caractérisée par l'expression de la molécule de costimulation CD27 et de l'intégrine CD11b ($CD27^{lo}CD11b^{lo} \rightarrow CD27^{hi}CD11b^{lo} \rightarrow CD27^{hi}CD11b^{hi} \rightarrow CD27^{lo}CD11b^{hi}$). Ce processus est essentiel à la génération ainsi qu'au maintien d'une population de cellules NK fonctionnelles. La réponse cytotoxique des cellules NK peut grandement varier d'un individu à l'autre et d'une lignée murine à l'autre. Il a été démontré à plusieurs reprises que la population de cellules NK de la souris *Non-obese diabetic* (NOD) est caractérisée par de profonds défauts fonctionnels. Afin de comprendre la provenance d'un tel déficit, le processus de maturation fonctionnelle des cellules NK de la lignée murine NOD a été caractérisé et comparé à celui de la lignée B6. Des études de cytométrie en flux ont pu révéler une accumulation de cellules NK dans les stades les moins fonctionnels, témoignant d'un défaut de ce processus chez la NOD. Des études de liaisons génétiques et l'exploitation de la lignée murine B6.Trp53^{-/-} ont aussi permis de valider l'implication de la protéine antitumorale p53 dans ce processus. De plus, des essais de stimulation *ex vivo* ont pu mettre en lumière chez les cellules NK de la lignée NOD un défaut dans l'acquisition des effecteurs clés IFN γ , TNF α et

granzyme B au cours des différents stades de la maturation fonctionnelle. De manière générale, ces études sont les premières à étudier exhaustivement les défauts fonctionnels des cellules NK de la lignée NOD au cours de leur processus d'acquisition fonctionnelle.

Mots-clés : Cellules *Natural killer*, maturation fonctionnelle, CD27, CD11b, fonctions cytotoxiques, lignée *Non-Obese Diabetic*

Abstract

Natural killer (NK) cells are potent innate lymphoid cells that play an important role in both tumoral immunosurveillance and viral clearance by producing vast amounts of cytokines and cytotoxic effectors and by expressing death ligands on their surface. These effector functions have been shown to be sequentially acquired along a 4-stage peripheral maturation process called functional maturation that can be identified by the expression of the co-stimulation molecule CD27 and the integrin CD11b ($CD27^{lo}CD11b^{lo} \rightarrow CD27^{hi}CD11b^{lo} \rightarrow CD27^{hi}CD11b^{hi} \rightarrow CD27^{lo}CD11b^{hi}$). As such, this process is required for the generation and the maintenance of potent cytotoxic NK cells. However, NK cell population functions can greatly vary between individuals and between mouse strains. For the last 30 years, NK cells coming from the Non-Obese Diabetic (NOD) background, a type 1 diabetes-prone mouse strain, have been shown to exhibit profound functional defects. To understand the cause of such defect, we compared the functional maturation process of NOD NK cells with B6 NK cells. Flow cytometry analyses revealed that the former accumulate in the earlier stages of the process, implying a defect in the progression of the maturation. Moreover, genetic linkage analyses and the use of the Trp53 mouse strain allowed us to identify the antitumor protein p53 as being involved in the functional maturation process. Finally, *ex vivo* stimulation assays demonstrated profound acquisition defects of the key effectors IFN γ , TNF α and granzyme B in NOD NK cells compared to their B6 counterparts. Ultimately, this work is the first to explicitly study the functional defects of NOD NK cells in a functional maturation stage-dependent manner.

Keywords: Natural killer cells, functional maturation, CD27, CD11b cytotoxic functions, Non-Obese Diabetic mouse strain

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Résumé | i |
| Abstract | iii |
| Table des matières | iv |
| Liste des tableaux | viii |
| Liste des figures | ix |
| Liste des sigles et abréviations | xii |
| Remerciements | xvii |
| CHAPITRE 1 : Introduction | 1 |
| 1.1 Le système immunitaire..... | 2 |
| 1.1.1 Le système immunitaire inné..... | 2 |
| 1.2 Les cellules Natural killer (NK)..... | 5 |
| 1.2.1 Différenciation des cellules NK murines..... | 5 |
| 1.2.1.1 Cellules NK résidant dans les tissus (trNK) | 10 |
| 1.2.2 Maturation fonctionnelle des cellules NK | 14 |
| 1.2.3 Éducation des cellules NK..... | 16 |
| 1.2.3.1 Mécanismes dépendant des molécules du CMH-1 | 19 |
| 1.2.3.2 Mécanismes indépendants des molécules de CMH-1..... | 21 |
| 1.2.4 Fonctions des cellules NK | 22 |
| 1.2.4.1 Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK..... | 22 |

| | |
|---|-----------|
| 1.2.4.2 Les cellules NK dans la réponse antitumorale | 26 |
| 1.2.4.3 Les cellules NK dans la réponse antivirale | 30 |
| 1.3 La souris Non-obese diabetic (NOD) | 32 |
| 1.3.1 Les cellules NK dans la souris NOD | 33 |
| CHAPITRE 2 : La protéine antitumorale p53 est couplée à la maturation fonctionnelle des cellules NK..... | 38 |
| 2.1 Préface..... | 39 |
| 2.2 Abstract | 41 |
| 2.3 Introduction..... | 42 |
| 2.4 Materials and methods | 44 |
| 2.4.1 Mice | 44 |
| 2.4.2 Flow cytometry | 44 |
| 2.4.3 Linkage Analysis | 45 |
| 2.4.4 Statistical analysis..... | 46 |
| 2.4.5 Ingenuity pathway analysis..... | 46 |
| 2.5 Results..... | 47 |
| 2.5.1 Identification of a block in the functional maturation of NK cells from the NOD background..... | 47 |
| 2.5.2 Linkage analysis for NK cell functional maturation..... | 51 |
| 2.5.4 Candidate genes based on differential expression | 57 |
| 2.6 Discussion..... | 71 |

| | |
|---|------------|
| CHAPITRE 3 : Les cellules NK de la souris NOD exhibent un défaut fonctionnel tout au long de leur processus de maturation..... | 96 |
| 3.1 Préface..... | 97 |
| 3.2 Résumé..... | 97 |
| 3.3 Introduction..... | 99 |
| 3.4 Matériels et méthodes | 101 |
| 3.4.1 Lignées murines | 101 |
| 3.4.2 Anticorps..... | 101 |
| 3.4.3 Sélection positive des cellules NK par billes magnétiques..... | 102 |
| 3.4.4 Stimulation ex vivo | 103 |
| 3.4.5 Marquage extracellulaire | 104 |
| 3.4.6 Marquage intracellulaire des effecteurs cytotoxiques..... | 105 |
| 3.4.7 Simulation in vivo d'infection virale | 105 |
| 3.4.8 Génération de chimères hématopoïétiques compétitives et non compétitives..... | 106 |
| 3.5 Résultats..... | 106 |
| 3.5.1 L'acquisition de la fonction des cellules NK au cours de leur maturation fonctionnelle. | 106 |
| 3.5.2 Le potentiel d'activation des stades de maturation entre les lignes B6 et NOD.... | 114 |
| 3.5.3 Études des mécanismes régissant la maturation et l'acquisition fonctionnelle | 117 |
| 3.6 Discussion..... | 120 |
| CHAPITRE 4 : Discussion | 123 |

| | |
|---|--------------|
| Conclusion | 138 |
| Bibliographie | 140 |
| Annexe 1: Figures supplémentaires | xviii |
| Annexe 2: Articles | xxi |
| ANNEXE 2.1: An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation | xxi |
| ANNEXE 2.2: Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, Idd2 and Idd13, in determining immunoregulatory DN T cell proportion | xxxviii |

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 : Introduction

Tableau 1.1 Rôle des facteurs de transcription dans la différenciation des cellules NK..... 13

CHAPITRE 2 : La protéine antitumorale p53 est couplée à la maturation fonctionnelle des cellules NK

Table 1. Upstream regulators of DEGs encoded within *Nkfm* loci (CD11b^{low} vs DP)..... 60

Table 2 Upstream regulators of DEGs encoded within *Nkfm* loci (DP vs CD27^{low})..... 61

Supplementary Table 2.1. Genes found within the *Nkfm* loci. 93

Supplementary Table 2.2. Differentially expressed genes found within the loci of interest (CD11b^{lo} → DP and DP → CD11b^{hi})..... 94

Liste des figures

CHAPITRE 1 : Introduction

| | |
|--|----|
| Figure 1.1. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et maturation des cellules NK..... | 12 |
| Figure 1.2. Étapes de maturation fonctionnelle des cellules NK..... | 16 |
| Figure 1.3. Mécanismes d'activation des cellules NK..... | 18 |
| Figure 1.4. Dégranulation des cellules NK..... | 24 |
| Figure 1.5. Immunosurveillance antitumorale des cellules NK..... | 30 |

CHAPITRE 2 : La protéine antitumorale p53 est couplée à la maturation fonctionnelle des cellules NK

| | |
|---|----|
| Figure 2.1. NOD mice exhibit a block in mNK cell functional maturation..... | 49 |
| Figure 2.2. The block in mNK cell functional maturation is conserved in Rag1-deficient NOD mice. | 50 |
| Figure 2.3. mNK cell maturation is a multigenic trait. | 54 |
| Figure 2.4. Linkage analysis of mNK cell functional maturation in F2.Rag1-deficient mice. | 55 |
| Figure 2.5. Upstream regulator analysis of differentially expressed genes between CD11b ^{low} , DP and CD27 ^{low} mNK cells. | 64 |
| Figure 2.6. Upstream regulators common to both CD11b ^{low} to DP and DP to CD27 ^{low} NK cell functional maturation stages. | 65 |

Figure 2.7. Upstream miRNA analysis between CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cells.. . 67

Figure 2.8. Trp53 impacts mNK cell functional maturation..... 69

Figure 2.9. Trp53 enhances proliferation and apoptosis of specific mNK cell subsets..... 70

Supplementary figure 2.1. Gating strategy for mNK cells. 92

Supplementary figure 2.2. p53 expression in B6 and NOD cell subsets. 93

CHAPITRE 3 : Les cellules NK de la souris NOD exhibent un défaut fonctionnel tout au long de leur processus de maturation.

Figure 3.1. Les cellules NK de la NOD présentent des défauts dans l’expression des effecteurs GrzB, TNF α et IFN γ 111

Figure 3.2. Le défaut fonctionnel est conservé dans les souris NOD déficientes pour Rag. 113

Figure 3.3. Les cellules NK de la NOD ont un défaut dans l’induction de NKG2D..... 116

Figure 3.4. Le fond génétique B6.1.2 restaure le défaut fonctionnel des cellules NK provenant de souris déficientes en p53. 119

CHAPITRE 4 : Discussion

Figure 4. Haplotype du groupe de gènes des Ly49 parmi différentes lignées murines..... 136

Annexe 1: Figures supplémentaires xviii

Figure supplémentaire 1. Stratégie de gating pour les populations de cellules NK totales et leurs stades de maturation suite à la stimulation ex vivo pour les cellules NK des lignées B6, NOD, B6.NODIdd1, B6.Rag et NOD.Rag. xviii

Figure supplémentaire 2. Stratégie de gating pour les populations de cellules NK totales et leurs stades de maturation suite à la stimulation ex vivo sur les chimères hématopoïétiques B6 / B6.Trp53^{-/-}..... xix

Figure supplémentaire 3. Les fonctions effectrices sont conservées dans les souris B6 portant l'haplotype du CMH de la souris NOD (B6.NODIdd1)..... xx

Liste des sigles et abréviations

| | |
|---------------------|---|
| ADCC | <i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps) |
| ARNm | Acide ribonucléique messenger |
| B6 (souris) | C57BL/6 |
| B6.NODIdd1 (souris) | B6.NOD-(D17Mit21-D17Mit10)/LtJ |
| BFA | Bréfeldine A |
| CLRs | <i>C-lectin Receptors</i> |
| CLP | <i>Common lymphoid progenitor</i> (progéniteur lymphoïde commun) |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| DAMPs | <i>Danger associated molecular patterns</i> (motifs moléculaires associés aux dangers) |
| DNT | <i>Double-negative T cells</i> (cellules T double-négatives) |
| FADD | <i>Fas-Associated protein with Death Domain</i> (protéine associée au Fas avec un domaine de mort) |
| Fas | <i>First apoptosis signal receptor</i> (récepteur du premier signal d'apoptose) |
| FasL | <i>First apoptosis signal receptor ligand</i> (ligand du récepteur du premier signal d'apoptose) |
| GITR | <i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i> (récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes) |
| GrzB | Granzyme B |
| GvH | <i>Graft versus Host</i> (Greffon contre l'hôte) |

| | |
|--------|---|
| KLF | <i>Krüppel-Like Factor</i> |
| ID | <i>Inhibitor of DNA binding</i> |
| IFN | Interféron |
| Ig | Immunoglobuline |
| IKDC | <i>Interferon-producing killer dendritic cells</i> (cellules dendritiques tueuses produisant de l'interféron) |
| IL | Interleukine |
| ILC | <i>Innate lymphoid cell</i> (cellule lymphoïde innée) |
| iNK | Cellule NK immature |
| i.p. | Intrapéritonéal |
| ITAM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> (motif des récepteurs immuns d'activation basé sur la tyrosine) |
| ITIM | <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i> (motif des récepteurs immuns d'inhibition basé sur la tyrosine) |
| LTi | <i>Lymphoid Tissue inducers</i> (inducteurs de tissus lymphoïdes) |
| MCA | 3-Methylcholanthrène |
| MCMV | <i>Murine Cytomegalovirus</i> (cytomegalovirus murin) |
| MEF | <i>Myocyte Enhancer Factor</i> |
| MFI | <i>Mean Fluorescence Intensity</i> (intensité de fluorescence moyenne) |
| MTOC | <i>Microtubule Organizing Center</i> (centre d'organisation microtubulaire – centrosome) |
| MULT-1 | <i>Murine UL16-binding protein-Like Transcript 1</i> (transcrit murin ressemblant à une protéine liant l'UL16 1) |

| | |
|--------------|--|
| mNK | Cellule NK mature |
| NK | Cellule <i>Natural Killer</i> (tueuse naturelle) |
| NKC | <i>Natural killer gene complex</i> (complexe des gènes tueurs naturels) |
| NKP | Précurseur des cellules NK |
| NLR | <i>NOD-Like Receptor</i> (récepteur de type NOD) |
| NOD (souris) | <i>Non-obese diabetic</i> (non-obèse diabétique) |
| PAMP | <i>Pathogen associated molecular pattern</i> (motif moléculaire associé aux pathogènes) |
| pDC | <i>Plasmacytoid dendritic cells</i> (cellules dendritiques plasmacytoïdes) |
| PKC | <i>Protein kinase C</i> (protéine kinase C) |
| PI | <i>Propidium iodide</i> (iodure de propidium) |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acétate |
| PRR | <i>Pattern Recognition Receptor</i> (récepteur de reconnaissance de motifs) |
| Rae1 | <i>Retinoic acid early induced protein-1</i> (protéine-1 précocement induite par l'acide rétinoïque) |
| RLRs | <i>RIG-1-Like Receptors</i> (récepteurs de type RIG-1) |
| SAP | <i>SLAM-associated protein</i> (protéine associée au SLAM) |
| SH2 | <i>Src Homology 2 domain</i> (domaine d'homologie 2 au Src) |
| SLAM | <i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule</i> (molécule signal de l'activation lymphocytaire) |
| SNARE | <i>Soluble NSF Attachment Protein Receptor</i> (récepteur de la protéine soluble d'association au NSF) |
| STZ | Streptozotocine |

| | |
|-------|---|
| T1D | <i>Type 1 diabetes</i> (diabète de type 1) |
| TF | <i>Transcription Factor</i> (facteur de transcription) |
| Th | <i>T helper cell</i> (cellule T auxiliaire) |
| TIGIT | <i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i> (récepteur des cellules T avec des domaines Ig et ITIM) |
| TLR | <i>Toll-Like Receptor</i> (récepteur de type Toll) |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> (Facteur de nécrose tumorale) |
| TRAIL | <i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand</i> (ligand d'induction apoptotique relié au TNF) |
| trNK | <i>Tissue-resident NK cells</i> (cellules NK résidant dans les tissus) |
| XLP | <i>X-linked lymphoproliferative disease</i> (maladie lymphoproliférative liée au chromosome X) |

Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées.

Marie Curie

Remerciements

Tout d'abord, merci à vous, membres du jury, d'avoir si gentiment accepté d'évaluer ce présent travail.

Je tiens très sincèrement à remercier ma directrice de recherche Dre Sylvie Lesage. Pour avoir été la première à me donner ma chance et pour m'avoir pris sous son aile. Au cours des dernières années, elle m'a permis de piloter mes propres projets et de me développer à mon rythme tout en m'offrant un mentorat d'une qualité exceptionnelle. Ta confiance m'a permis de me développer intellectuellement comme je ne l'aurais jamais imaginé possible. Merci pour toutes ces longues discussions dans ton bureau. Je suis convaincu que tes commentaires me serviront tout au long de ma carrière.

Évidemment, ces dernières années n'auraient pas été aussi mémorables sans la merveilleuse équipe avec qui j'ai eu la chance de travailler. À Cindy, Roxanne, Félix, Adrien, merci pour tous ces fous-rires, ces karaokés impromptus, pour tout le soutien moral et l'atmosphère familiale qui régnait dans le laboratoire. À Geneviève et Erin, merci d'avoir partagé avec moi vos innombrables connaissances scientifiques et techniques.

Un merci tout particulier à ma famille qui a été présente à tout moment tout au long de ces deux années, autant dans les hauts que dans les bas. Je dois avouer quand sans votre support et votre fierté inconditionnels, je n'aurais pas pu être où j'en suis aujourd'hui.

Je réserve ma dernière pensée à Marc-André qui a su me faire décrocher du laboratoire quand il le fallait. Merci de m'inspirer à toujours donner le meilleur de moi-même grâce à ta persévérance et ton dévouement exceptionnel dans les nombreux projets que tu as décidé d'entreprendre.

CHAPITRE 1 :

Introduction

1.1 Le système immunitaire

Tout au long de sa vie, le corps humain est exposé à une multitude d'agents pathogènes ; des toxines aux bactéries en passant par les virus et même ses propres cellules tumorales. Cependant, il peut compter sur un réseau complexe et finement régulé de populations cellulaires appelé système immunitaire. Ces populations ont toutes un rôle différent à jouer lors de la réponse contre un pathogène et peuvent être séparées en deux groupes distincts, représentant chacun une facette de l'immunité : le système inné et adaptatif [1].

La réponse innée est non-spécifique et a pour but de répondre rapidement à la présence de tout agent étranger par une réponse inflammatoire classique [2] ou à la présence de dommage tissulaire par une réponse inflammatoire stérile [3]. Elle est de courte durée et représente la première ligne de défense de l'organisme et est essentielle à l'induction du volet adaptatif de la réponse.

La réponse adaptative est, quant à elle, ciblée envers un pathogène précis. Celle-ci nécessite l'intégration de plusieurs signaux ainsi que la prolifération clonale de cellules exprimant à leur surface des récepteurs capables de reconnaître spécifiquement ce pathogène. Cette réponse est plus lente que la réponse innée, mais induira généralement une réponse plus efficace ainsi qu'une protection à plus long terme contre le pathogène cible [1].

1.1.1 Le système immunitaire inné

Le système immunitaire inné est composé d'éléments qui ont pour but d'empêcher l'établissement et la prolifération d'un agent pathogène via une série de barrières passives et actives. Le premier de ces éléments se trouve à être les barrières dermiques et endothéliales qui empêchent mécaniquement l'entrée du corps étranger dans l'organisme. Cependant, elles ne

sont pas infaillibles et d'autres mécanismes cellulaires entrent en jeu lorsque ces barrières sont transgressées. Les cellules immunitaires innées sont importantes pour la surveillance active de tout l'organisme et ont toutes des rôles ainsi que des localisations bien précises. Les cellules dendritiques ont comme fonction de sonder la présence de pathogènes et sont donc retrouvées au niveau des barrières physiques mentionnées ci-haut. Les monocytes et macrophages phagocytent les débris cellulaires, les cellules mortes et infectées et sont majoritairement retrouvés résidant dans les organes et tissus. Les neutrophiles, basophiles et éosinophiles sont les premiers répondants lors d'une infection (parasitaire dans les cas des basophiles et éosinophiles) et sont importants pour l'induction de la réponse immunitaire. On les retrouve donc dans la circulation sanguine en condition normale [4]. L'objet de ce mémoire porte sur les cellules tueuses naturelles (NK) qui font partie de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILCs). Leur rôle est décrit plus en détail dans les prochaines sections. Les ILCs ont la particularité de véritablement être à mi-chemin entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Effectivement, ces cellules partagent beaucoup de fonctions avec les lymphocytes T du système adaptatif. Tout comme ces dernières, les ILCs sont dérivées des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) et sont classées dans des catégories similaires basées sur les cytokines qu'elles produisent [5]. Les ILC1s, qui incluent par ailleurs les cellules NK, sont surtout retrouvées en circulation et produisent principalement les cytokines pro-inflammatoires $IFN\gamma$ et $TNF\alpha$ et sont surtout utiles au contrôle des pathogènes intracellulaires (bactéries, virus) et des tumeurs [6, 7]. Les ILC2s ont quant à elles un rôle important à jouer dans la réponse contre les helminthes et produisent de l'IL-4, IL-5, IL-13 et l'amphiréguline [8-10]. Finalement, les ILC3s produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 et sont particulièrement importantes pour le maintien de l'homéostasie microbienne et intestinale [11, 12]. Parmi les ILC3s, il existe aussi les inducteurs de tissus

lymphoïdes (LTi) qui, comme leur nom l'indique, participent à la génération des tissus lymphoïdes durant l'embryogenèse puis à leur maintien par la suite [13].

Ces mêmes fonctions et dénominations sont retrouvées chez leurs homologues du système adaptatif (cellules T auxiliaires 1 (Th1), Th2, Th17, respectivement. Cependant, contrairement aux cellules T, les ILCs ne sont pas spécifiques à un antigène précis, mais sont hautement réactives à leur environnement (signaux de stress, pathogènes, etc.) [5].

À l'inverse de la réponse adaptative, le système immunitaire inné ne peut donc pas compter sur la génération de cellules spécifiques contre un antigène, mais est plutôt dépendant de la reconnaissance de signaux généraux que l'organisme considère comme étant du « non-soi ». Ces signaux se déclinent en deux grandes familles : les motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular motifs* ; PAMPs) et les motifs moléculaires associés au danger (*danger-associated molecular motifs* ; DAMPs) induisant l'inflammation stérile. Les PAMPs sont des structures moléculaires retrouvées chez une multitude d'organismes pathogènes (bactéries, virus, champignons) et sont détectés par les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptors* ; PRRs) [2]. Ces récepteurs sont scindés en plusieurs groupes : les récepteurs *Toll-like* (TLRs), les récepteurs *RIG-I-like* (RLRs), les récepteurs *NOD-like* (NLRs) et les récepteurs *C-type lectin* (CLRs) qui contiennent eux-mêmes plusieurs éléments. Cette grande variété de PRRs permet donc une reconnaissance assez large de différents signaux ainsi que l'induction d'une multitude de réponses immunitaires différentes. Les TLRs reconnaissent les pathogènes extracellulaires (bactéries, champignons, parasites) et intracellulaires (virus), les RLRs reconnaissent principalement les virus, les NLRs reconnaissent les bactéries intracellulaires [14] alors que les CLRs sont particulièrement importants pour l'immunité antifongique [15]. Un signal via un de ces récepteurs mène à

l'activation de la cellule immunitaire par la voie NF κ B et la production de cytokines inflammatoires ou d'interférons de type 1 (IFN α et IFN β). En ce qui concerne les NLRs, ceux-ci peuvent aussi induire la génération d'inflammasomes permettant le relâchement d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β ou l'IL-18 [16].

Au même titre que les autres cellules immunitaires innées, les cellules NK murines expriment aussi leur lot de PRRs. Cependant, contrairement aux macrophages ou aux cellules dendritiques qui dépendent d'une activation directe par leurs PRRs, l'activation des cellules NK suite à la présence d'un pathogène se fait principalement par les cytokines produites par les autres cellules du système immunitaire inné. Le répertoire restreint des PRRs exprimés à la surface des cellules NK (TLR-2, TLR-3 et TLR-9) servira plutôt à augmenter leur niveau d'activation [17]. L'activation ainsi que l'activité des cellules NK seront élaborées plus en détail au cours des prochaines sections.

1.2 Les cellules *Natural killer* (NK)

1.2.1 Différenciation des cellules NK murines

Tout comme un grand nombre de cellules immunitaires, les cellules NK sont majoritairement générées dans la moelle osseuse tout d'abord à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les cellules HSC sont nécessaires à la génération des différentes lignées immunitaires en se différenciant d'abord en précurseurs multipotents (MPP), puis en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) ou progéniteurs myéloïdes communs (CMP) responsables de la génération des lignées lymphoïdes et myéloïdes, respectivement [18] . Comme leur nom l'indique, les CLPs sont responsables de la génération des cellules lymphocytaires T et B, mais aussi des cellules NK qui font partie de la même famille

immunitaire. Une fois les CLPs engagés dans la voie des cellules NK, ceux-ci se différencient d'abord en pré-progénéiteurs des cellules NK (pré-NKP), puis en progénéiteurs des cellules NK (NKP). En acquérant l'expression de récepteurs propres aux cellules NK, ces progénéiteurs deviennent par la suite des cellules NK immatures (iNK) puis matures (mNK). Finalement, ces cellules mNK entreprennent un processus de maturation fonctionnelle au cours duquel elles acquièrent leurs fonctions cytotoxiques. Schématisée simplement, la différenciation des cellules NK se détaille donc ainsi : **CLP → pré-NKP → NKP → iNK → mNK → maturation fonctionnelle** [19].

Malgré son apparente simplicité et linéarité, ce processus est très étroitement contrôlé par l'implication temporelle de multiples groupes de facteurs de transcription (TFs). Leur fonction dans la différenciation cellulaire a majoritairement été déterminée par l'exploitation de modèles animaux chez qui ces TFs sont inhibés ou supprimés [20]. Les prochains paragraphes présentent une synthèse de ces études.

Le facteur de transcription E4BP4 revêt une importance toute particulière dans la différenciation des cellules NK puisqu'il agit le plus tôt dans ce processus. Effectivement, l'engagement vers les cellules NK nécessite qu'E4BP4 soit fortement exprimé dès le stade CLP. Dans le cas contraire, comme en témoigne la lignée *E4bp4^{-/-}*, son absence induit une déplétion quasi complète du stade NKP. En plus, E4BP4 sert à induire d'autres facteurs de transcription importants pour l'engagement des CLPs en pré-NKP, puis en NKP tel qu'ID2 et Eomes [21]. Les cellules pré-NKP furent identifiées par Fathman et son groupe il y a quelques années lorsque ceux-ci ont découvert dans la moelle une population exprimant certains marqueurs clés des cellules NKP tels que le récepteur d'activation CD44 et la molécule de costimulation CD27, mais sans exprimer le CD122 (la sous-unité bêta du récepteur à l'IL-2 et à l'IL-15) qui

caractérise cette population progénitrice. En transférant cette population inconnue dans des souris hôtes, le groupe a pu générer des cellules NKP et des cellules NK, démontrant que cette population précède en fait celle des cellules NKP, d'où leur nom pré-NKP [22].

Il a été observé que les souris *knock-out* pour *PU.1*, *Id2* ou *Ikaros* (codant pour les protéines IKAROS, HELIOS et AIOLOS) démontrent une lourde diminution des cellules NK en périphérie due à une absence dans la moelle des cellules NKP [23-25]. ID2 semble aussi être indispensable à la génération d'une population de cellules NK – thymiques cette fois – dérivée de la moelle osseuse. Effectivement, en l'absence de ce facteur de transcription, Ikawa et al. ont pu démontrer une fois de plus une absence complète de cellules NKP (CD122⁺) causée par l'engagement de tous les précurseurs bipotents (T / NK) en lymphocytes T [24]. L'expression de CD122 aussi tôt dans le développement des cellules NK est essentielle puisque celle-ci permet l'intégration du signal de l'IL-15 qui est nécessaire à la survie et la prolifération de la population de cellules NK retrouvées dans la moelle osseuse et en périphérie. Il a d'ailleurs récemment été démontré par Delconte et al. que la réponse des cellules NK face à l'IL-15 était étroitement régulée par ID2. Effectivement, ils ont pu observer qu'en inhibant spécifiquement ID2 dans les cellules NK matures, celles-ci mouraient par apoptose due à un signal exagéré par la cytokine [26].

La différenciation en cellules iNK se poursuit lorsque les NKP commencent à exprimer faiblement de nombreux récepteurs régulateurs relativement spécifiques aux cellules NK tel que NKG2D, NKp46 ou NK1.1 (activation) ainsi que NKG2A et la famille de lectines de type C Ly49 (inhibition). Au cours de la maturation des cellules iNK en cellules mNK, celles-ci expriment de façon accrue leurs récepteurs d'activation et d'inhibition puis commencent à

exprimer le marqueur panspécifique des cellules NK, l'intégrine CD49b et à démontrer des propriétés cytolytiques. Ce processus de maturation est assuré par un deuxième groupe de facteurs de transcription ; le principal étant ETS-1. Les souris déficientes en ETS-1 (*Ets-1^{-/-}*) exhibent une forte diminution de la population de cellules mNK (CD3⁻CD49b⁺) en périphérie ainsi qu'une activité cytolytique significativement diminuée [27]. De plus, Ets-1 est exprimé très tôt lors du processus de différenciation des cellules iNK en cellules mNK et permet l'expression de T-bet et ID2, aussi impliqués dans ce processus [28, 29]. Comparé à Ets-1, GATA-3 est quant à lui non-essentiel au processus de maturation. Cependant, ce facteur joue un rôle important dans la fonction des cellules mNK, tel que démontré par le groupe de Di Santo qui ont observé une diminution de la production d'IFN γ ainsi qu'une susceptibilité accrue à être infectée par la bactérie intracellulaire *Listeria monocytogenes* chez les souris où l'expression de *Gata-3* est spécifiquement abolie dans les cellules NK [30]. Plus récemment, un autre groupe a pu aussi démontrer que GATA-3 est important pour l'émigration des cellules mNK de la moelle osseuse vers la rate et le foie [31].

Récemment, un nouvel intermédiaire, situé tout juste entre les cellules iNK et mNK a pu être identifié ; les cellules pré-mNK. Ce sous-type exprime CD122 ainsi que CD49b, des marqueurs intimement liés à la signature d'une cellule NK. Cependant et de manière assez surprenante, elles expriment aussi à leur surface l'intégrine CD11c, associée aux cellules dendritiques, ainsi que la phosphatase CD45R (B220), associée aux cellules B et aussi cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ainsi, avec leur capacité à produire de l'IFN γ , leur étroite ressemblance phénotypique avec les pDCs [32, 33] , et leur capacité à présenter des antigènes aux cellules T [34], les pré-mNKs ont tout d'abord été identifiées comme cellules dendritiques tueuses produisant de l'interféron (IKDC). Cependant, des expériences de caractérisation

généétique et de transfert adoptifs ont pu révéler que ces « cellules dendritiques » mènent à la génération de cellules mNK et ont ainsi été renommées cellules pré-mNKs [35]. En cohérence avec leur réassignation à titre de cellules NK, et leur position intermédiaire entre les stades iNK et mNK, les cellules pré-mNKs dépendent fortement du facteur de transcription ID2 [36].

Suite à leur migration dans les différents organes périphériques (rate, ganglions, foie, poumons), les mNK entreprennent alors une maturation fonctionnelle séquentielle au cours de laquelle celles-ci acquièrent différentes fonctions cytotoxiques (couverte plus en profondeur dans la section 1.2.2 de ce mémoire). Ce processus est assuré par un troisième groupe de facteurs de transcription tels que BLIMP-1, ZEB2, ID2, MEF et GATA-3. BLIMP-1 régule entre autres le potentiel prolifératif des cellules dans les stades les moins matures, mais les plus prolifératifs de la maturation fonctionnelle [37]. ZEB2 est quant à lui essentiel à la régulation de la maturation terminale des cellules NK. Il a été démontré qu'en absence de *Zeb2*, la survie de ce dernier sous-type du processus de maturation est complètement abrogée [38]. Un autre facteur de transcription, KLF2, est nécessaire au contrôle homéostatique des cellules NK dans les premiers stades de cette maturation fonctionnelle. En effet, en exploitant des modèles murins d'inhibition conditionnelle, les auteurs ont pu démontrer qu'en absence de KLF2, les cellules NK s'accumulent dans les premiers stades les moins matures du processus de maturation fonctionnelle. De plus, KLF2 semble jouer un rôle important dans la migration des cellules NK ainsi que leur survie dans les tissus périphériques (rate, foie, ganglions mésentériques) par la régulation de certains récepteurs « homing » qui leur permettent d'accéder aux zones riches en IL-15 essentiel à leur survie [39].

Pour finir, il est nécessaire de mentionner l'importance que les facteurs de transcriptions *T-box* T-bet et Eomes revêtent tout au long de la différenciation des cellules NK. [40]. Il a tout

d'abord été observé que les souris déficientes en *T-bet* avaient une augmentation des cellules NK dans la moelle au détriment des populations périphériques, démontrant ainsi l'importance de T-bet dans leur émigration hors de la moelle [29]. Quant à lui, Eomes a été démontré essentiel pour la génération des NKPs en régulant leur expression de CD122 et pour leur migration dans le sang et la rate [41, 42]. T-Bet et Eomes ont de plus un rôle important à jouer dans la maturation fonctionnelle des cellules NK. Alors qu'il a été observé que l'expression de T-bet augmente au cours de ce processus, l'expression d'Eomes suit le motif d'expression inverse [40, 43]. Finalement, les cellules NK déficientes en T-bet présentent d'importants défauts de cytotoxicité ainsi qu'une production d'IFN γ diminuée [29].

1.2.1.1 Cellules NK résidant dans les tissus (trNK)

Il est important de souligner qu'en plus des cellules NK conventionnelles (cNK) que l'on peut retrouver majoritairement dans la moelle, la circulation ainsi que dans la rate et les ganglions (processus de différenciation décrit au cours des paragraphes ci-haut), il existe une grande variété parmi les populations de cellules NK résidant dans les tissus (cellules trNK) non-lymphoïdes. La population de trNK la mieux caractérisée demeure sans doute celle que l'on retrouve dans le foie. Contrairement aux cellules cNK, les cellules trNK hépatiques sont toutes CD49b⁻CD49a⁺ et expriment le récepteur CXCR6 [44]. L'intégrine CD49a est par ailleurs exclusivement exprimée par les cellules trNK hépatiques [45] On peut aussi y retrouver une forte expression de surface du marqueur de mort TRAIL, associé à un phénotype plutôt immature [46]. Cette population a été démontrée comme étant essentielle à la génération d'une réponse mémoire des cellules NK face à certains antigènes [47]. Bien que les cellules trNK soient toutes caractérisées par leur expression de marqueurs de résidence tissulaire, tels que

l'intégrine CD49a, celles-ci revêtent des fonctions bien précises, propres au contexte physiologique et pathologiques des tissus qui transcendent la fonction cytotoxique des cellules NK dites conventionnelles [48]. Par exemple, les cellules trNK utérines sont peu cytotoxiques, mais participent activement au maintien et à l'angiogenèse de l'endomètre lors de la grossesse [49]. Quant à elle, les cellules NK résidant dans les glandes salivaires présentent une forte expression du récepteur du facteur de nécrose tumorale induit par les glucocorticoïdes (GITR), et seraient donc immunorégulatrices et participeraient au maintien de l'homéostasie locale [50]. À l'inverse, les cellules NK rénales exhibent un phénotype d'activation et de cytotoxicité exacerbé comparé aux cellules NK en circulation et seraient impliquées dans la pathologie d'une ischémie rénale [51].

De manière générale, ces études démontrent bien à quel point le processus de différenciation des cellules NK, des progéniteurs de la moelle aux cellules NK fonctionnellement matures est hautement complexe et étroitement régulé (Fig 1.1, p. 12). La grande diversité, autant phénotypique que fonctionnelle, que l'on retrouve chez les populations de cellules cNK et trNK témoigne par ailleurs de l'étendue des mécanismes de différenciation des cellules NK. Il est donc essentiel de réaliser le rôle de chacun de ces facteurs de transcription afin de mieux comprendre comment il serait possible de générer des cellules NK *in vitro* (Tableau 1.1, p. 13).

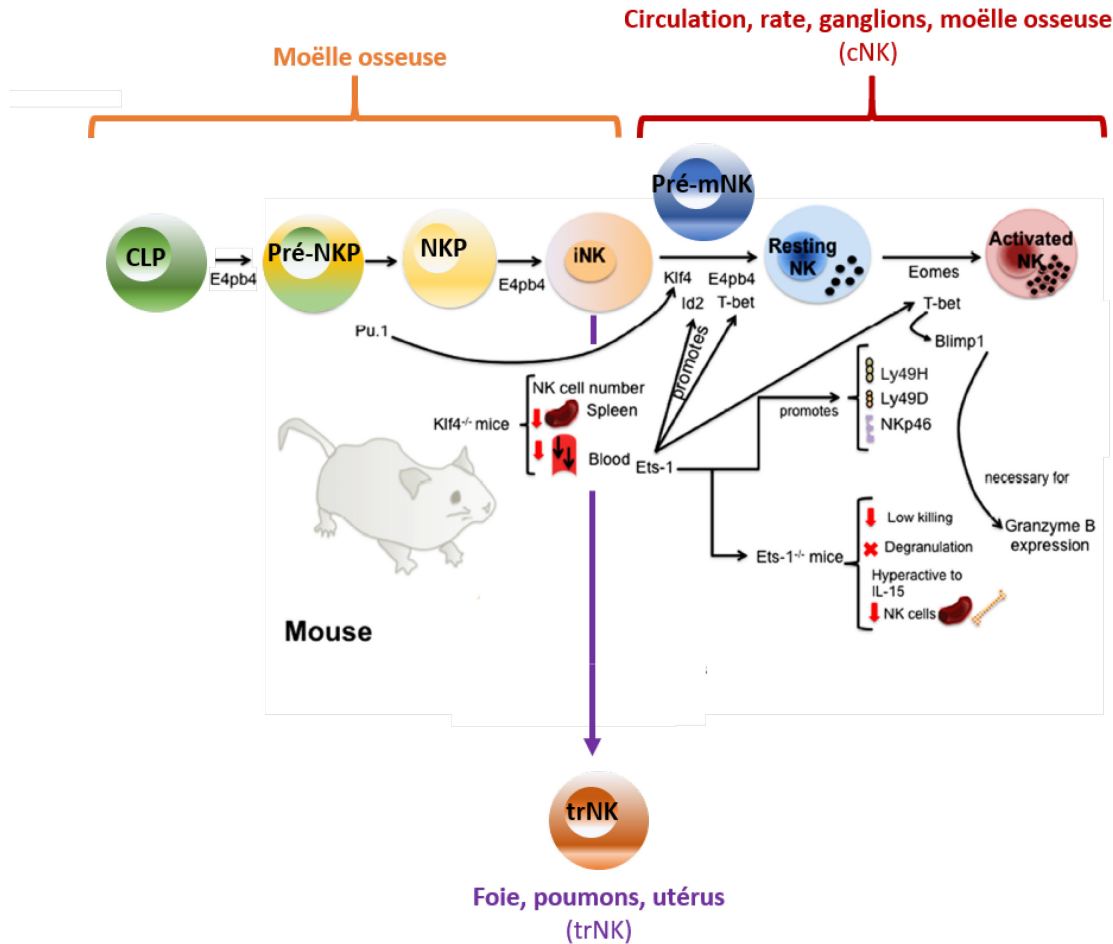


Figure 1.1. Facteurs de transcription impliqués dans la différenciation et maturation des cellules NK. Le processus de différenciation des cellules NK est caractérisé par l'activité temporelle de plusieurs groupes de facteurs de transcription. Le premier groupe composé de Pu.1 et E4BP4 est important pour l'engagement des cellules progénitrices en cellules NK. Le deuxième groupe (Ets-1, KLF4, ID2, T-bet et E4BP4) est quant à lui responsable de la différenciation des cellules iNK en cellule mNK. Finalement, Eomes, T-bet et BLIMP1 participent au processus de maturation fonctionnelle des cellules mNK au cours duquel elles acquièrent leurs fonctions effectrices. (Figure adaptée de Luevano et al., 2012)

Tableau 1.1 Rôle des facteurs de transcription dans la différenciation des cellules NK

| Facteurs de transcription [Refs] | MOELLE OSSEUSE (MO) | | ORGANES PÉRIPHÉRIQUES ET MO (RATE, GANGLIONS, THYMUS, FOIE...) | | |
|----------------------------------|---------------------|---|--|--|--|
| | NKP | iNK | mNK | Maturation fonctionnelle | Fonctions |
| E4BP4 [21, 52] | KO Ø NKP | KO Ø iNK | KO Ø mNK | - | KO ↓ IFN γ (<i>in vitro</i>) |
| Pu.1 [25] | KO ↓ NKP | KO ↓ iNK | KO ↓ mNK (rate) | - | - |
| Id2 [26] | - | KO Ø réponse à l'IL-15 | KO ↓ survie (Ø mNK) | - | KO Ø IFN γ |
| Ikaros [23] | KO Ø NKP | KO Ø iNK | KO Ø mNK | - | - |
| Ets-1 [28] | KO ↓ pré-NKP | KO ↓ iNK | KO ↓ mNK (rate) | - | KO ↓ cytotoxicité (<i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>) ↓ IFN γ (<i>in vitro</i>) |
| Irf2 [53, 54] | - | - | KO ↓ mNK (rate et foie) ↑ apoptose des mNK (MO) | KO Ø CD11b ^{hi} (rate, foie, MO) | KO ↓ IFN γ (<i>in vitro</i>) |
| Gata-3 [30] | - | - | - | cKO* ↓ CD11b ^{hi} | cKO* ↓ IFN γ |
| Blimp-1 [37] | - | - | KO ↓ mNK (foie et poumons) ↑ mNK (MO et ganglions) | KO ↓ CD11b ^{hi} (rate) | KO ↑ prolifération (↑ réaction IL-15) |
| Zeb2 [38] | - | - | - | KO ↓ réaction IL-15 ↓ survie (Ø CD11b ^{hi}) (rate et MO) ↓ export MO (CD11b ^{hi}) | KO ↓ contrôle tumeurs B16F10 (poumons) (fonctions normales) |
| Klf2 [39] | - | - | cKO# ↓ survie ↓ mNK (rate, sang, poumons) | cKO# Ø CD11b ^{hi} | cKO# ↓ cytotoxicité ↓ granzyme B (<i>in vitro</i>) |
| Mef [55] | - | - | KO : ↓ mNK (rate, foie, thymus) | - | KO : ↓ cytotoxicité (<i>in vitro</i>) ↓ IFN γ ↓ perforine (<i>in vivo</i>) |
| T-bet [29, 43] | - | KO ↑ iNK (MO) | KO ↓ mNK (rate, foie, thymus, sang) ↓ mNK (MO) | KO ↓ CD11b ^{hi} | KO ↓ cytotoxicité (<i>in vitro</i>) ↓ IFN γ (<i>in vitro</i>) |
| Eomes [41-43] | - | KO Ø expression CD122 (diminution des iNK) | cKO [§] ↓ mNK | - | cKO [§] Ø expression Ly49H (↓ cytotoxicité MCMV) ↓ IFN γ (<i>in vitro</i>) |

Légende
 KO : knock-out
 cKO : knock-out conditionnel
 ↑ : augmentation
 ↓ : diminution
 Ø : perte complète

cKO*: *Gata3* KO conditionnel pour cellules hématopoïétiques (chimères hématopoïétiques : HSC embryonnaires de *Gata3*^{-/-} dans souris B6.Rag yc^{-/-})

cKO#: *Klf2* KO conditionnel pour les cellules hématopoïétiques (Flox-Cre : *Vav-cre*, *Klf2*^{fl/fl})

cKO[§]: *Eomes* KO conditionnel pour les cellules hématopoïétiques (Flox-Cre : *Vav-cre*, *Eomes*^{fl/fl})

1.2.2 Maturation fonctionnelle des cellules NK

Les cellules mNK sont caractérisées par l'expression ubiquitaire de l'intégrine CD49b. Cependant, cette population retrouvée en périphérie et dans la moelle osseuse est hautement hétérogène et se décline en multiples sous-populations exhibant des phénotypes, fonctions effectrices et capacités prolifératives différentes. Les premiers indices d'une maturation fonctionnelle des cellules mNK remontent au début des années 1980 lorsque le groupe de Lanier a pu identifier chez l'humain deux sous-populations de cellules NK sanguines avec des capacités lytiques différentes [56]. Toujours chez l'humain, cette idée s'est raffinée à la fin des années 1990 avec la découverte que la molécule d'adhésion CD56 identifie deux sous-types de cellules NK fonctionnellement différentes [57, 58]. En 2003, Kim et al. ont pu identifier chez la souris deux populations de cellules NK délimitées par l'expression ou non de l'intégrine ITGAM (CD11b) : l'une fortement lytique et capable de produire de l'IFN γ et l'autre faiblement lytique est incapable d'une telle production, respectivement. Ces travaux ont donc pu démontrer l'importance de CD11b à titre d'indicateur de la maturation fonctionnelle [59]. Le groupe d'Hayakawa a par la suite davantage disséqué la population de cellules NK CD11b^{hi} en deux autres groupes, basé cette fois sur l'expression ou non de la molécule de costimulation CD27. Dans cette étude, les cellules CD11b^{hi} exprimant CD27 exhibent une capacité proliférative *in vitro* accrue ainsi qu'une meilleure réponse migratoire via CXCR3, mais un phénotype de maturation ainsi qu'une capacité lytique diminuée comparée aux cellules NK CD11b^{hi}CD27^{lo}. Les cellules CD11b^{lo}CD27^{hi} quant à elle semblent exhiber un phénotype encore plus immature [60]. Plus récemment, d'autres travaux effectués par l'équipe de Thierry Walzer ont pu identifier les quatre étapes bien distinctes qui composent la maturation fonctionnelle. En exploitant un modèle murin de déplétion de cellules NK, le groupe a pu identifier l'ordre séquentiel

d'expression de CD27 et CD11b durant ce processus : $CD27^{lo}CD11b^{low}$ (double négatif, DN) $\rightarrow CD27^{hi}CD11b^{lo} \rightarrow CD27^{hi}CD11b^{hi}$ (double positif, DP) $\rightarrow CD27^{lo}CD11b^{hi}$ (Fig 1.2, p. 16). Leurs études de micropuces à ARN ont aussi pu révéler que ce processus de maturation corrèle avec une perte progressive de l'expression des gènes associés au cycle cellulaire et un gain de ceux associés aux processus cytotoxiques et sécrétoires [61]. En parallèle au développement de ce modèle de maturation en 4 étapes, Caligiuri et son équipe ont aussi pu établir une caractérisation phénotypique grâce à la densité d'expression de surface de CD94. Brièvement, une haute expression de ce récepteur corrèle avec une meilleure expression d'IFN γ ainsi qu'une activité lytique plus efficace comparée aux cellules NK l'exprimant faiblement [62]. De manière intéressante, les populations $CD94^{lo}$ et $CD94^{hi}$ ne concordent pas nécessaire avec les populations $CD11b^{lo}$ et $CD11b^{hi}$. Effectivement, ils ont plutôt pu observer une répartition de l'expression de CD94 chez ces deux populations, scindant ainsi davantage les stades de maturation fonctionnelle ($CD11b^{lo}CD94^{hi}$ ou $CD94^{lo}$ et $CD11b^{hi}CD94^{hi}$ ou $CD94^{lo}$).

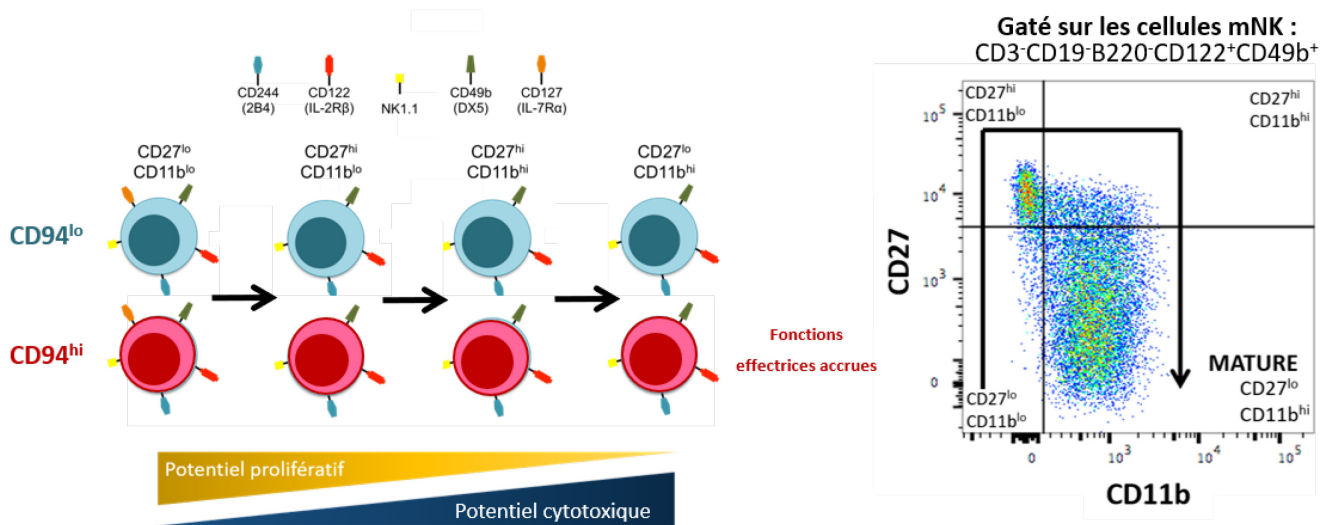
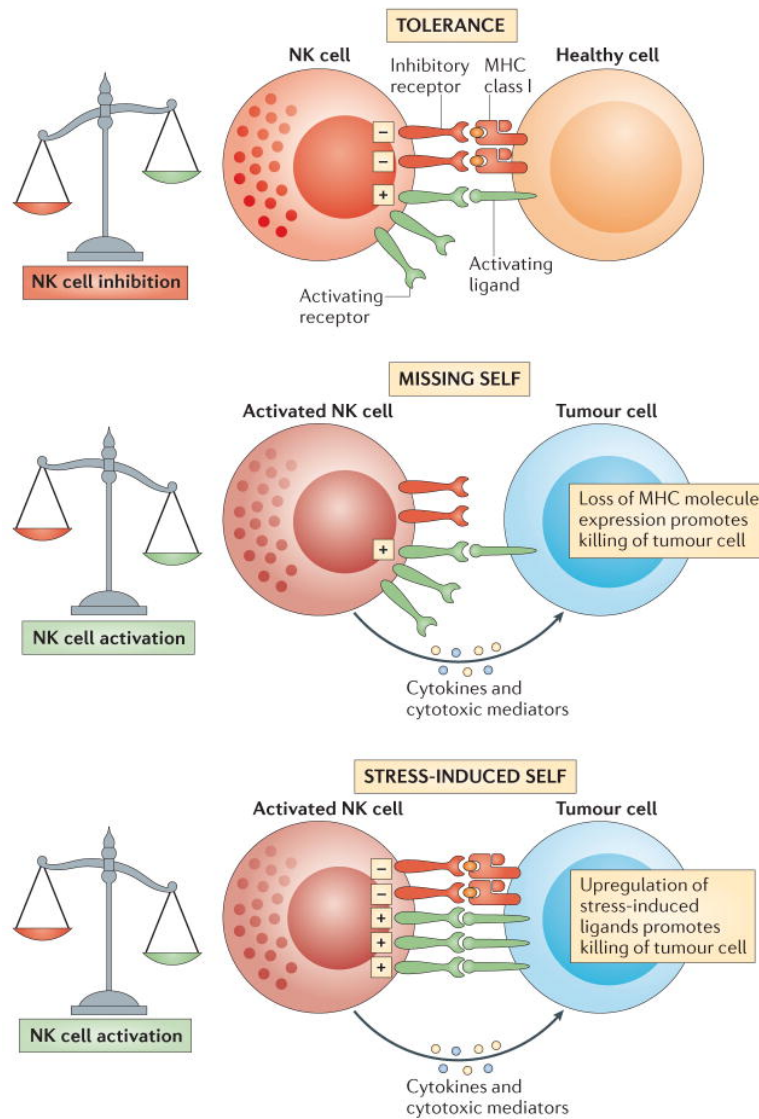


Figure 1.2. Étapes de maturation fonctionnelle des cellules NK. Suite à la différenciation des cellules iNK (CD122⁺) en cellules mNK (CD122⁺CD49b⁺), ces dernières entreprennent un processus de maturation fonctionnelle scindé en 4 étapes caractérisées par l'expression de CD27 et CD11b. 1 – double négatif (DN) : CD27^{lo}CD11b^{lo} / 2- CD27 : CD27^{hi}CD11b^{lo} / 3- double positif (DP) : CD27^{hi}CD11b^{hi} / 4- CD11b : CD27^{lo}CD11b^{hi}. Les cellules mNK comprises dans les deux premiers stades (CD11b^{lo}) sont les moins matures et sont caractérisées par un fort potentiel prolifératif ainsi qu'une forte production de cytokines. Les cellules mNK incluses dans les deux derniers stades (CD11b^{hi}) sont les plus matures et sont plutôt dotées d'un fort potentiel cytotoxique (granules, ligands de mort). Au travers de ces stades, l'expression de CD94 rend les cellules NK plus ou moins effectrices.

1.2.3 Éducation des cellules NK

La principale fonction des cellules NK est de détecter puis détruire tout agent du « non-soi » tel que les cellules infectées exprimant des structures virales à leur surface ou encore des cellules tumorales exprimant des marqueurs de stress. De ce fait, l'activation des cellules NK se fait différemment des autres lignées lymphoïdes. Alors que les lymphocytes T et B requièrent des signaux directs d'activation (via leur TCR/BCR ou via des récepteurs cytokiniques), les cellules NK dépendent plutôt d'une balance de signaux activateurs et inhibiteurs. En d'autres mots, ces cellules sont activées lorsque les signaux d'activation reçus sont plus nombreux que les signaux d'inhibition. Cette balance est extrêmement importante puisqu'elle prévient la

destruction impromptue des cellules saines de l'organisme. L'intégration de ces signaux par les cellules NK dépend d'un processus important appelé éducation qui a pour but de déterminer leur réactivité aux signaux activateurs ainsi que leur sensibilité aux signaux inhibiteurs (Fig 1.3, p. 18) [63, 64].



Nature Reviews | Immunology

Figure 1.3. Mécanismes d'activation des cellules NK. TOLÉRANCE : Les cellules saines expriment à leur surface les molécules du CMH-1 du soi qui sont reconnues par les récepteurs d'inhibition de la cellule NK, rendant ainsi la cellule NK tolérante (Haut). ABSENCE DU SOI : La cellule tumorale perd à sa surface l'expression des molécules du CMH-1 du soi, désinhibant ainsi la cellule NK. Cette dernière devient alors activée et induit la lyse de la cellule tumorale. INDUCTION DE LIGANDS DE STRESS : Certaines tumeurs n'induisent pas l'internalisation des molécules du CMH-1 du soi. Cependant, sa réplication excessive induit l'expression de ligands de stress à sa surface qui sont reconnus par les récepteurs d'activation de la cellule NK. La balance de signaux favorise alors l'activation de la cellule NK et par conséquent la lyse de la cellule tumorale. Ces principes s'appliquent aussi à une infection virale. (Vivier et al., 2012)

1.2.3.1 Mécanismes dépendant des molécules du CMH-1

Ce processus d'éducation est principalement basé sur la capacité des cellules NK à reconnaître les molécules du CMH-1 du soi, ubiquitaires à presque toutes les cellules de l'organisme, par leurs récepteurs inhibiteurs. Chez la souris, ceux-ci peuvent être séparés en deux familles : la famille des récepteurs Ly49, contenant à la fois des récepteurs inhibiteurs et activateurs, ainsi que le récepteur dimérique CD94-NKG2. Le fonctionnement par lequel ces récepteurs permettent l'éducation des cellules NK à attaquer uniquement les cellules transformées ou infectées est encore mal compris. Cependant, plusieurs modèles de fonctionnement (armement et désarmement) et de modulation (réglage/rhéostat) ont été suggérés.

Pour commencer, le modèle de l'armement (*arming*) suggère que, de base, les cellules NK ont un très faible niveau d'activation et que c'est leur reconnaissance des molécules du CMH-1 lors de leur éducation qui les rendent plus réactives à la présence de signaux activateurs retrouvés à la surface des cellules cibles. Des études exploitant des modèles murins déficients en SHIP (nécessaire à la transduction du signal d'inhibition) ou chez qui les motifs de récepteurs immuns d'inhibition basés sur la tyrosine (ITIM) du Ly49A sont non fonctionnels ont pu démontrer que les cellules NK provenant de ceux-ci exhibent de profonds défauts fonctionnels de dégranulation et de rejet de cellules cibles [65-67].

À l'opposé de ce modèle, celui du désarmement (*disarming*) suggère plutôt qu'avant leur éducation, les cellules NK sont toutes extrêmement réactives et seraient à long terme ainsi désensibilisées et désarmées. Dans ce modèle, seules les cellules NK recevant des signaux d'inhibition par leur reconnaissance des molécules du CMH-1 du soi seraient capables de conserver leur réactivité face aux cellules cibles. En accord avec ce modèle, il a d'ailleurs été

démontré que la surexpression par des modèles transgéniques de plusieurs ligands activateurs des cellules NK amène effectivement à leur anergie [67-69].

Les deux modèles décrits ci-haut sous-entendent qu'une fois établi, le niveau d'activité des cellules NK est fixe. Cependant, c'est loin d'être le cas puisqu'il a été montré que la réactivité peut être modulée vers le haut ou vers le bas lorsqu'une cellule NK est exposée à un répertoire de molécules du CMH-1 différent [70, 71]. C'est ainsi qu'il a été proposé que les modèles d'armement et de désarmement étaient aussi sujets à du réglage (*tuning*) dépendant des molécules du CMH-1 présentes. De plus, il est important de mentionner que les récepteurs de la famille Ly49 présentent d'importantes variations alléliques entre chaque cellule NK. Autrement dit, chacune d'entre elles exprime à sa surface un répertoire ainsi qu'un nombre de récepteurs différents des autres cellules. En cohérence avec cette hétérogénéité, le modèle du rhéostat indique donc que la force des signaux inhibiteurs reçus lors de leur éducation varie d'une cellule à l'autre résultant à des réactivités intrinsèquement différentes et indépendantes de l'expression des molécules de CMH-1 [72]. Il va sans dire qu'une bonne compréhension de ces deux derniers mécanismes est essentielle à l'immunothérapie puisque ceux-ci pourraient permettre une modulation de la réactivité des cellules NK personnalisée à chaque patient.

Ultimement, malgré leurs différences, tous ces modèles amènent à la même finalité à savoir que le processus d'éducation par les molécules du CMH-1 est hautement important pour induire la tolérance des cellules NK envers les cellules saines de l'hôte exprimant ces molécules tout en leur permettant de conserver une activité cytotoxique adéquate contre les cellules cibles.

1.2.3.2 Mécanismes indépendants des molécules de CMH-1

Tel que mentionné précédemment, l'éducation des cellules NK dépend principalement de la reconnaissance des molécules de CMH-1. Cependant, notre compréhension du processus d'éducation devient de plus en plus étendue et de nouveaux mécanismes, indépendants du CMH-1 cette fois, ont pu être identifiés au cours des dernières années [67].

L'immunorécepteur des cellules T avec des domaines Ig et ITIM (TIGIT) a récemment été identifié comme récepteur inhibiteur exprimé à la surface des cellules T et NK dont son ligand est le récepteur du poliovirus CD155. Il a été démontré que les cellules NK provenant de souris déficientes en TIGIT exhibent une dégranulation et une production d'IFN γ moindres comparées aux cellules NK *wild-type* en réponse aux cellules n'exprimant le CMH-1 [73]. Ces travaux démontrent donc la participation de la voie CD155-TIGIT dans l'éducation des cellules NK et dans leur reconnaissance des cellules du non-soi.

Un autre de ces mécanismes s'effectue par la famille des molécules signaux de l'activation lymphocytaire (SLAMs). La souris exprime sur la plupart de ses cellules d'origine hématopoïétiques – incluant les cellules NK – quatre de ces molécules : le 2B4, le CRACC, le CD84 et le Ly9 (CD229). Les SLAMs ont la particularité de participer à des interactions homotypiques et ainsi être leur propre ligand; à l'exception du 2B4 qui reconnaît le ligand CD48 aussi exprimé par les cellules hématopoïétiques. À défaut d'avoir des motifs intracellulaires d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine (ITAMs) dans leurs domaines cytoplasmiques, les SLAMs se lient avec une haute affinité aux membres de la famille des protéines adaptatrices associées aux SLAMs (SAP). Cette famille est composée des protéines SAP, EAT-2 et ERT qui ont toutes la caractéristique d'avoir un important domaine d'homologie 2 au Src (SH2) qui est important pour la transduction du signal de la voie tyrosine kinase [74-

76]. L'importance de SAP dans la reconnaissance des cellules hématopoïétique a été montrée à plusieurs reprises dans le cas de la maladie lymphoproliférative lié au chromosome X (XLP) où il existe plusieurs mutations dans le gène codant pour cette protéine adaptatrice. Le XLP est ainsi caractérisé par une prolifération excessive des cellules lymphocytaires, le développement de lymphomes et une diminution de la cytotoxicité des cellules NK en réponse à la présence du virus d'Epstein-Barr [77-79]. Les modèles murins présentant des mutations dans SAP, EAT-2 et ERT exhibent également des défauts dans la fonction de leurs cellules NK [80]. Des travaux récemment effectués par l'équipe de Dong et ses collaborateurs se sont penchés plus en détail sur l'impact des SLAMs sur l'éducation des cellules NK. Ils ont pu démontrer que ces récepteurs sont principalement impliqués dans leur activation, mais qu'en absence de ceux-ci, les cellules NK répondent beaucoup plus fortement à la présence de lignées cancéreuses lymphoïdes (YAC-1, RMA-S). Ils ont expliqué cette dichotomie par le fait que l'engagement chronique des récepteurs SLAMs par les récepteurs retrouvés à la surface des autres cellules hématopoïétiques lors de l'éducation des cellules NK induit leur désensibilisation et les rendant ainsi moins sensibles à leur présence une fois matures [81]. En résumé, ces travaux démontrent donc la double-fonction des récepteurs SLAM. D'un côté, ceux-ci permettent la destruction des cellules hématopoïétiques par les cellules NK activées, tout en induisant à long terme une condition tolérogène de ces dernières face aux cellules hématopoïétiques lors du processus d'éducation.

1.2.4 Fonctions des cellules NK

1.2.4.1 Mécanismes de cytotoxicité des cellules NK

La reconnaissance d'une cellule cible s'effectue lorsque la balance entre les signaux reçus par les récepteurs activateurs et inhibiteurs à la surface de la cellule NK favorise

l'activation de celle-ci. Dès lors, la cellule NK induit la lyse de cellule cible par l'entremise de plusieurs mécanismes cytotoxiques [82].

Son principal mode d'action est le processus de dégranulation au cours duquel la cellule NK sécrète par exocytose des lysosomes contenant de la perforine et des protéases (granzymes). En premier lieu, tel que son nom l'indique, la perforine se polymérise à la surface de la cellule affectée et perce sa membrane. Cette action permet alors aux granzymes d'entrer dans la cellule, d'activer ses caspases en les clivant de la forme inhibée (procaspases) et ainsi induire son apoptose. Ce processus de dégranulation est caractérisé par la formation d'une synapse immunologique entre la cellule cible et la cellule NK via un important réarrangement cytosquelettique de cette dernière [83]. La formation d'une synapse immunologique est essentielle à une réponse efficace ainsi qu'à une sécrétion spécifique et dirigée exclusivement contre la cellule cible afin d'empêcher l'apoptose des cellules saines environnantes. Non seulement celle-ci permet le renforcement des signaux activateurs via l'agglomération des récepteurs d'activation de la cellule NK, mais induit aussi la migration des lysosomes cytotoxiques vers la cellule cible. Il est entendu que suite au réarrangement cytosquelettique, le centrosome (MTOC) migre vers le site de la synapse immunologique entraînant ainsi la migration des lysosomes contenant les granules cytotoxiques. Suite à la fusion des deux membranes cellulaires, les lysosomes fusionnent finalement avec la membrane de la cellule cible via l'engagement de complexes de récepteurs de la protéine soluble d'association au NSF (SNAREs). Ce n'est qu'une fois cette fusion effectuée que les lysosomes peuvent perforer la membrane plasmique puis induire l'apoptose de la cellule cible (Fig 1.4, p. 24). Expérimentalement, le potentiel de dégranulation des cellules NK peut être étudié par cytométrie par l'expression de la protéine lysosomale CD107a que l'on peut retrouver à la

surface de la cellule suite à leur exocytose [84, 85]. Plusieurs groupes ont pu faire l'observation que des mutations dans les protéines impliquées dans le processus d'exocytose impactent dramatiquement la capacité des cellules NK à lyser une cellule cible, démontrant ainsi son importance dans leur processus cytotoxique [86-88].

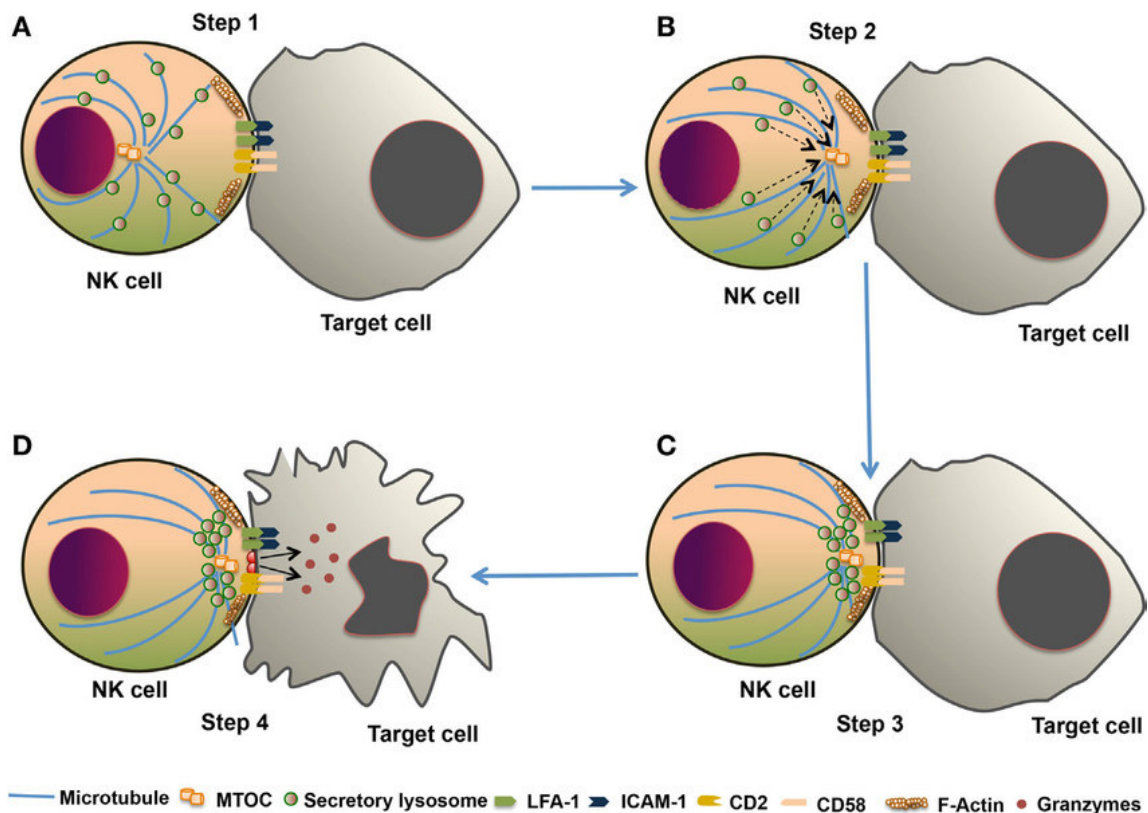


Figure 1.4. Dégranulation des cellules NK. Ce mécanisme est scindé en 4 étapes étroitement régulées. A : La cellule NK reconnaît une cellule cible et entreprend un réarrangement de l'actine de son cytosquelette induisant la formation d'une synapse immunologique. B : Les microtubules et les lysosomes sécrétoires contenant les granules se polarisent vers le site de la synapse. C : Une fois au MTOC, les lysosomes migrent vers la membrane cellulaire de la cellule NK. D : Les lysosomes fusionnent avec la membrane de la cellule cible, libérant ainsi leur perforine et leurs granzymes. (Paul et al. 2017)

Les cellules NK peuvent aussi induire la lyse d'une cellule cible via l'engagement des récepteurs de mort de cette dernière. Les cellules NK et les cellules cytotoxiques en général expriment à leur surface des protéines appelées ligands de mort faisant partie de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF) : le TNF, le ligand d'induction apoptotique relié au TNF (TRAIL) et le ligand du récepteur du premier signal apoptotique (FasL). Lors de la lyse cellulaire, ces ligands se lient à leur récepteur exprimé à la surface de cellule cible. Le signal induit alors le recrutement de protéines adaptatrice avec des domaines de mort (qui recruteront eux-mêmes la procaspase 8 aux récepteurs de mort. Le contact entre la procaspase 8 et les récepteurs activés induit son clivage et, par conséquent, son activation menant alors au processus d'apoptose de la cellule cible [89]. La variété de ligands de mort exprimés par les cellules NK leur offre une flexibilité fonctionnelle puisque chacun de ces ligands est impliqué dans l'apoptose de cellules cibles différentes.

Finalement, les cellules NK peuvent aussi induire la lyse cellulaire par le processus appelé cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Il reprend les mêmes mécanismes de dégranulation et de ligands de mort décrits plus haut ; cependant, l'ADCC dépend de la reconnaissance d'anticorps produits par les cellules B. Suite à l'activation des cellules B, celles-ci sécrètent des anticorps qui reconnaissent et se lient spécifiquement à un antigène exprimé à la surface d'une cellule cible. Grâce à l'expression à sa surface du récepteur CD16 (FCRIII γ), la cellule NK peut alors reconnaître l'immunoglobuline (Ig) via sa région constante (Fc). Non seulement cette interaction rapproche la cellule NK de sa cible, mais permet aussi son activation. Effectivement, cette interaction phosphoryle les ITAMs du CD16, enclenchant ainsi une cascade activatrice résultant en la dégranulation de la cellule NK et la lyse de la cellule cible [90]. Il a été montré que ce mécanisme présente, dans différentes

circonstances, l'avantage d'induire une réponse cytotoxique antivirale et antitumorale (dégranulation, production de cytokine) plus forte et rapide en contournant les ligands inhibiteurs exprimés par la cellule cible [91-93]. Ces recherches démontrent très clairement l'importance de l'ADCC dans la cytotoxicité des cellules NK et présentent donc une approche thérapeutique intéressante dans la modulation de la réponse effectrice de celles-ci.

1.2.4.2 Les cellules NK dans la réponse antitumorale

Les cellules NK sont fortement impliquées dans l'immunosurveillance antitumorale. D'ailleurs, l'infiltration des cellules NK dans le microenvironnement tumoral est généralement garant de meilleurs pronostics de survie pour une multitude de cancers différents, du carcinome gastrique au cancers du poumon [94-96]. Leur activité antitumorale fut aussi élégamment démontrée chez de nombreux modèles animaux de cancers spontanés ou chimiquement induits. Entre autres, on peut observer dans les souris déplétées en cellules NK un piètre contrôle de la croissance tumorale et du développement métastatique suite à l'injection de mélanomes [97].

Les cellules NK présentent diverses stratégies afin de reconnaître une cellule tumorale. Dans un premier temps, plusieurs cellules tumorales peuvent perdre à leur surface l'expression du CMH-1. Alors que cette caractéristique les rend peu immunogènes face aux autres cellules immunitaires participant à la surveillance antitumorale, une telle perte les rend aussi significativement plus sensibles à l'activité cytotoxique des cellules NK, pour lesquelles le CMH-1 agit comme inhibiteur. Cette désinhibition potentialise alors les fonctions effectrices des cellules NK en facilitant leur activation par les ligands exprimés à la surface de ces cellules tumorales. De manière générale, les ligands des stress sont très peu ou pas exprimés par les

cellules saines et ce n'est qu'au cours de sa transformation en cellule tumorale que celle-ci en acquerra l'expression. La reconnaissance de ceux-ci par les cellules NK s'effectue principalement via les récepteurs NKG2D, DNAM-1 ainsi que Ncr-1 [98].

NKG2D

L'expression de ce récepteur est principalement restreinte aux cellules cytotoxiques. Cependant, contrairement aux cellules T CD8 qui l'expriment uniquement suite à leur activation, NKG2D est exprimé par toutes les cellules NK, activées ou non. Il est important de mentionner que NKG2D ne contient aucun ITAM, sa signalisation nécessite les protéines adaptatrices DAP10 et DAP12. Chez les cellules NK, NKG2D peut lier DAP10 et DAP12, lui conférant une grande capacité de signalisation qui lui permet d'agir comme récepteur d'activation principal. Chez les cellules T CD8, le récepteur ne peut se paier qu'avec DAP10 est induit donc un signal plus modeste et agira plutôt à titre de récepteur de costimulation [99-101]. NKG2D a la capacité de reconnaître une multitude de ligands de stress différents exprimés par les cellules tumorales. Chez la souris, les ligands du NKG2D sont classés en trois grandes familles : les protéines précocement inductibles par l'acide rétinoïque-1 (Rae-1 α à Rae-1 ϵ), les protéines H60 (H60a à H60c) ainsi que le transcrit murin ressemblant à une protéine liant l'UL-16 (MULT)-1 [102-104]. Tous les ligands reconnus par NKG2D ont la particularité d'être structurellement similaires à une molécule du CMH-1, mais sont dépourvus du domaine α 3 et de la sous-unité β -microglobuline les empêchant d'avoir une conformation adéquate pour la présentation antigénique [105].

L'importance de NKG2D dans l'immunité antitumorale a été mainte fois montrée *in vitro* et *in vivo*. Effectivement, il a entre autres été démontré que la transduction de ligands du

NKG2D dans des lignées tumorales n'en exprimant pas était suffisante pour induire leur lyse [106, 107]. D'autres travaux ont aussi montré qu'une diminution des niveaux de NKG2D empêchait le contrôle ou le rejet de tumeurs [108, 109]. Mis ensemble, ces travaux démontrent la grande importance que joue NKG2D dans la reconnaissance de ligands exprimés spécifiquement par des cellules transformées ainsi que son rôle dans l'immunosurveillance tumorale en général.

DNAM-1

DNAM-1 est une molécule d'adhésion, qui de manière similaire à NKG2D, est exprimée par toutes les cellules NK et est importante pour l'induction de leur cytotoxicité et leur production d'IFN γ . Ce récepteur reconnaît deux ligands : la Nectine-2 (CD112) et le récepteur du poliovirus CD155. Bien que ces ligands soient exprimés sur différents tissus endothéliaux et épithéliaux en condition normale, il a été démontré que leur expression était largement augmentée dans plusieurs cancers hématopoïétiques et non hématopoïétiques comme les carcinomes, neuroblastomes et myélomes [110, 111]. Plusieurs modèles ont démontré l'importance de DNAM-1 dans l'immunité antitumorale. Effectivement, l'expression ectopique de ses ligands sur par des cellules tumorales peut induire l'activité leur lyse par les cellules NK [112]. La délétion de DNAM-1 a aussi été montrée comme exacerbant la croissance tumorale dans un modèle de carcinogenèse chimique [113].

Ncr-1 (NKp46)

Ce récepteur est le seul de la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle que l'on retrouve chez la souris. Son expression est presque exclusive aux cellules NK, à l'exception

d'un sous-type rare de cellules NKT [114]. Le principal ligand du Ncr-1 est l'hémagglutinine qui est généralement présente à la surface des cellules lors d'une infection virale. Cependant, bien que ses ligands dans ce contexte soient encore inconnus, Ncr-1 a un rôle très important dans la lyse des cellules tumorales. Entre autres, il a été démontré que ce récepteur est impliqué dans le contrôle de lymphomes ainsi que dans la prévention métastatique et que sa surexpression dans un modèle murin transgénique augmente l'immunité des cellules NK [115-117].

Outre leur activation par la reconnaissance directe de ligands à la surface d'une cellule tumorale, les cellules NK participent aussi indirectement à l'immunosurveillance. À la suite de l'intégration des signaux provenant de leurs récepteurs d'activation, les cellules NK peuvent aussi induire l'activation d'autres sous-types immunitaires telles que les cellules T et B via leur production massive de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance. Avec leur production d'IFN γ , les cellules NK peuvent induire la cytotoxicité des cellules T CD8 ainsi qu'induire la différenciation des cellules T CD4 en cellule Th1 pro-inflammatoire [118, 119]. De plus, en lysant les cellules tumorales, les cellules NK permettent l'activation et la maturation des cellules dendritiques qui à leur tour participent à la réponse antitumorale par la production de cytokines qui potentialisent les cellules (IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18) et par la présentation des antigènes tumoraux (Fig1.5, p. 30) [120, 121].

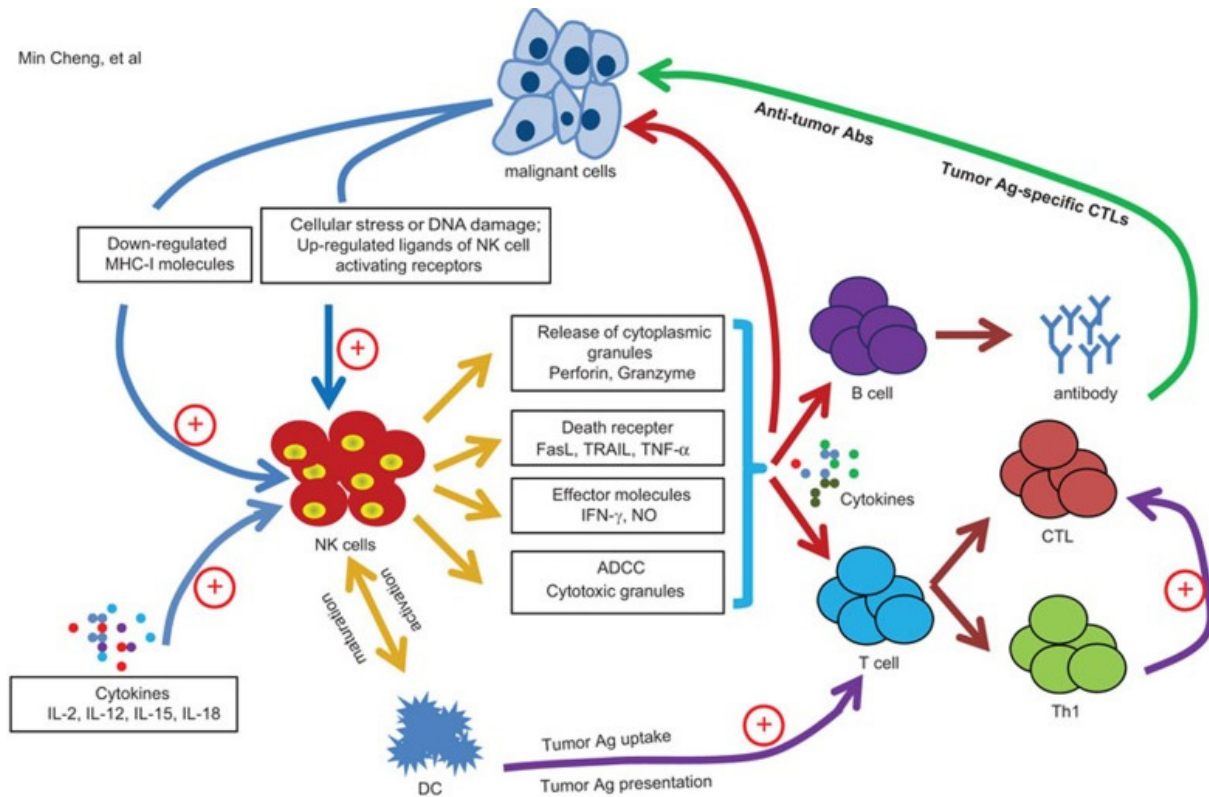


Figure 1.5. Immunosurveillance antitumorale des cellules NK. La cellule NK est activée par les ligands de stress exprimés à la surface de la cellule tumorale. La cellule NK peut induire la lyse directe de la cellule cible de 3 manières différentes : par sa dégranulation de perforines et granzymes, par son expression de ligands de mort ou par ADCC via sa reconnaissance d'Ig. Indirectement, elles induisent aussi, par leur production massive d' IFN γ et TNF α , la différenciation des cellules T en cellules cytotoxiques qui participent aussi à la réponse antitumorale. L'activité des cellules NK peut aussi être modulée par les cytokines IL-2, IL-12, IL-15 et IL-18 produites par les macrophages et cellules dendritiques présentes dans le microenvironnement. (Cheng et al., 2013)

La grande hétérogénéité des récepteurs d'activation retrouvés à la surface des cellules NK leur confère une réactivité à une large variété d'infections virales. Plusieurs études chez l'humain ont fait état de la capacité de ces cellules à reconnaître et détruire plusieurs familles de virus différentes [122]. Une des recherches les plus importantes a été sur la famille des herpèsvirus où il a été montré qu'une adolescente présentant des défauts dans leurs populations

de cellules NK était beaucoup plus susceptible aux infections par le cytomégalo virus, le virus d'Epstein-Barr et le virus de l'herpès simplex [123].

De façon similaire à leur réponse antitumorale, les cellules NK induisent une réponse antivirale contre les cellules infectées par la production massive de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ) importantes pour l'induction d'un environnement nocif à la réplication virale ainsi que pour le recrutement des autres populations cellulaires au site de l'infection. Elles participent aussi directement à la lyse des cellules cibles grâce à la dégranulation des protéases granzymes et par leurs ligands de mort (précédemment abordé en détail) [124].

Contrairement à une cellule transformée, les cellules infectées n'ont pas tendance à induire l'internalisation de leurs molécules de CMH-1. Ainsi, l'activation des cellules NK lors d'une infection se fait majoritairement par l'intégration de signaux activateurs. Dans le cas de l'équivalent murin du cytomégalo virus (MCMV), les cellules infectées expriment à leur surface la protéine virale m157 qui a une structure homologue au CMH-1. Il est supposé que cette structure fût au départ importante pour l'évasion du virus contre les cellules NK en induisant leur inhibition. Cependant ces dernières auraient évolué à reconnaître cette structure comme signal d'activation. Par ailleurs, le récepteur hautement spécifique pour le m157 se trouve à être le Ly49H, qui contrairement à la grande majorité des autres récepteurs de cette famille est activateur et non pas inhibiteur [125]. Malgré sa grande importance, le Ly49H ne semble cependant pas être le seul récepteur nécessaire à une protection contre MCMV. Effectivement, une protection contre le virus a tout de même pu être observée dans des modèles murins déficients en *Ly49h*. Cette protection semble plutôt venir de l'autre récepteur activateur murin de la famille des Ly49, le Ly49P qui reconnaît alors les peptides viraux présentés par l'haplotype du CMH-1 H2-D^k [126]. Un autre des récepteurs d'activation important pour la réponse

antivirale est le récepteur de cytotoxicité naturelle NKp46. Il a été montré que celui-ci, en plus de participer à la réponse antitumorale, peut reconnaître certaines structures virales telles que l'hémagglutinine exprimée à la surface de la cellule cible suite à une infection à l'influenza [127]. Les souris déficientes en NCR1 (homologue murin du NKp46) sont d'ailleurs extrêmement vulnérables à une infection à l'influenza [128]. Une infection virale est généralement caractérisée par un détournement complet de la machinerie métabolique de la cellule au profit de la réplication du virus, induisant ainsi l'expression de ligands de stress (Rae-1, MULT-1), semblable à une cellule tumorale, à sa surface qui peut alors être reconnue par la cellule NK via son NKG2D. Plusieurs virus semblent d'ailleurs être capables d'échapper à cette reconnaissance. Entre autres, il a été démontré que le cytomégalovirus humain arrive à diminuer l'expression de H-60 (ligand du NKG2D humain) [129]. Ensemble, ces études mettent en évidence l'importance des cellules NK dans la reconnaissance et le contrôle des infections virales par une multitude de mécanismes d'activation différents.

1.3 La souris Non-obese diabetic (NOD)

La souris NOD représente un modèle polygénique de diabète auto-immun reprenant le diabète de type 1 (T1D) observé chez l'humain [130]. À l'instar de celui-ci, le modèle NOD est caractérisé par une importante insulite découlant d'une infiltration lymphocytaire massive des îlots pancréatiques [131, 132] puis d'une hyperglycémie causée par la destruction des cellules β du pancréas – responsables de la production d'insuline – par les cellules T autoréactives [133]. Des études de liaisons génétiques ont pu révéler la présence de divers locus impliqués dans la prédisposition au T1D chez la souris NOD et ont ainsi appelées *Idd* (diabète insulino-dépendant) [134]. Malgré le fait que sa prédisposition au T1D soit dépendant de ces locus ainsi que d'une

multitude de facteurs environnementaux , la souris NOD porte l'haplotype du CMH H-2^{g7} (*Idd1*) qui constitue l'un des facteurs génétiques les plus importants du diabète auto-immun. Il a d'ailleurs été montré que cet haplotype était nécessaire, mais pas suffisant au développement de la maladie [135]. En plus de sa prédisposition au diabète auto-immun, la souris NOD exhibe aussi de profonds déficits immunitaires tels que l'absence en circulation du complément, des déficiences des populations lymphocytaires immunorégulatrices des défauts de la maturation des cellules présentatrices d'antigènes ainsi que des défauts fonctionnels des cellules NK [136]. De ce fait, grâce aux outils génétiques déjà mis en place pour l'étude des composantes génétiques du diabète, la souris NOD représente un modèle idéal pour l'étude des facteurs impliqués dans la fonction des cellules NK. Par souci de pertinence, la prochaine section s'intéressera aux études faites sur les cellules NK dans la souris NOD.

1.3.1 Les cellules NK dans la souris NOD

Des études faites chez l'humain il y a près de 40 ans ont pu révéler de profondes perturbations dans la population de cellules NK chez les patients atteints de diabète de type 1. Ces différences se résument en une efficacité fonctionnelle grandement diminuée, mais en une cytotoxicité contre les cellules β du pancréas anormalement élevée [137, 138]. De manière intéressante, la population de cellules NK chez la souris NOD est elle aussi lourdement impactée comparée à celles d'autres lignées murines non prédisposées au diabète auto-immun. Des essais de cytotoxicité *in vitro* effectués sur des cellules de rate de souris C57BL/6 (B6) et NOD ont révélées que ces dernières étaient inefficaces à cibler et détruire les cellules tumorales YAC-1 (cibles spécifiques des cellules NK) [139, 140].

Une dizaine d'années plus tard, Ogasawara et ses collaborateurs ont tenté d'expliquer cette différence fonctionnelle. Leur étude semble démontrer que cette différence fonctionnelle est due à une diminution importante des niveaux de NKG2D exprimé à la surface des cellules NK de la NOD comparé à la B6. Spécifiquement, les auteurs ont suggéré que contrairement aux cellules NK de la B6, celles de la souris NOD expriment certains ligands de NKG2D induisant ainsi sa comodulation, son internalisation et subséquemment l'anergie des cellules NK. Ils ont attribué cette différence d'expression au fait que les lignées B6 et NOD expriment différents haplotypes du gène *Raet1* codant pour un des ligands principaux du NKG2D. [68]. Plus récemment, un autre groupe s'est penché sur cette hypothèse en étudiant la relation entre la cytotoxicité et ces différents haplotypes. Grâce à des croisements F1, ils ont pu générer des souris hétérozygotes exprimant tous les haplotypes du gène *Raet1*. De manière intéressante, les auteurs n'ont vu aucune différence de cytotoxicité entre les cellules NK de la lignée F1 et de la NOD. Ils ont cependant pu observer une différence entre ces F1 et la NOD dans leur production d'ARNm pour la cytokine IL-12p40 en réponse à une stimulation au Poly I:C [141]. Ensemble, ces articles illustrent excessivement bien la complexité des mécanismes impliqués dans les différences fonctionnelles des cellules NK entre les lignées B6 et NOD. Il est également important de mentionner que l'un des locus de prédisposition au diabète présents dans la lignée NOD, le locus *Idd6*, a été identifié comme chevauchant le complexe des gènes tueurs naturels (NKC) regroupant une multitude de gènes régulant l'activation ainsi que l'inhibition des cellules NK [142, 143]. Effectivement, cette région distale du chromosome 6 comprend entre autres le gène du récepteur clé NKG2D [144] ainsi que les gènes *Nkrp1* [145], codant pour le récepteur NK1.1, important pour la fonction des cellules NK immatures dans la moelle osseuse [146]. C'est aussi dans cette région que l'on retrouve les gènes *Ly49*, codant pour les

récepteurs d'inhibition et d'activation Ly49, importants dans l'éducation des cellules NK [145] ainsi que des gènes *CD94* et *CD69* [144]. Ainsi, les cellules NK de la lignée NOD présentent d'importants polymorphismes, dans l'expression de gènes cruciaux dans leur activation, fonctions et éducation, pouvant expliquer en partie les défauts précédemment observés chez celles-ci. De manière intéressante, une lignée NOD congénique pour la région NKC (provenant du fond génétique B6) a pu être générée et fut appelée NOD.NK1.1 [147]. En outre, malgré que les cellules NK de cette lignée murine présentent une expression accrue de leur récepteur NK1.1 (complètement abrogée dans la souris NOD) ainsi que des fonctions lytiques améliorées, celles-ci demeurent tout de même moins fonctionnelles que leurs homologues de la lignée B6 [68, 147]. Par conséquent, ces études démontrent que les variations importantes observées dans le complexe NKC des cellules NK de la lignée NOD, ne sont pas la seule cause du déficit fonctionnel observé chez ces dernières.

1.4 Hypothèses et objectifs de recherche

En raison de leurs fonctions antitumorales, les cellules NK présentent un potentiel immunothérapeutique important. Cependant, outre les variations fonctionnelles observées dans un contexte tumoral, chaque individu présente des variations génétiques qui peuvent influencer l'activité intrinsèque de leurs cellules NK et ainsi grandement modifier leur réponse aux traitements immunothérapeutiques. De plus, il est connu que depuis les 30 dernières années, les cellules NK de la lignée murine NOD présentent de nombreux défauts fonctionnels en comparaison à la lignée B6. Les différences génétiques entre les deux lignées peuvent possiblement récapituler les variations fonctionnelles observées entre deux individus humains. Par conséquent, en exploitant ces modèles murins, ce présent mémoire a but pour de comprendre comment les variations génétiques et biologiques existant entre les lignées B6 et NOD peuvent influencer les fonctions effectrices des cellules NK. À ce sujet, le consensus scientifique actuel veut que les fonctions effectrices des cellules NK soient acquises au cours d'un processus de différenciation périphérique appelé maturation fonctionnelle. De ce fait, nous émettons donc les hypothèses suivantes :

- **Les cellules NK de la souris NOD présentent un défaut dans leur processus de maturation fonctionnelle, empêchant ainsi la génération d'une population hautement cytotoxique.**
- **Les fonctions effectrices des cellules NK de la souris NOD ne sont pas acquises lors de la maturation fonctionnelle.**

Afin de répondre à ces hypothèses, les objectifs principaux de ce mémoire sont :

1. Caractériser les différences de maturation fonctionnelle entre les cellules NK de la NOD et de la B6;
2. Identifier les mécanismes génétiques impliqués dans ce processus;
3. Déterminer les différences qui existent entre les deux lignées en ce qui a trait à l'acquisition du potentiel cytotoxique au cours de la maturation fonctionnelle.

CHAPITRE 2 :

La protéine antitumorale p53 est couplée à la maturation fonctionnelle des cellules NK

[148]

Roxanne Collin*, †, Charles St-Pierre‡, §, Lorie Guilbault*, †, Victor Mullins-Dansereau*, †,
Antonia Policheni¶, ||, Fanny Guimont-Desrochers*, †, Adam-Nicolas Pelletier*, †, Daniel H.
Gray¶, ||, Elliot Drobetsky*, Claude Perreault‡, §, Erin E. Hillhouse*, Sylvie Lesage*, †

* Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal,
Quebec, H1T 2M4, Canada † Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie,
Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada ‡ Institute for Research in
Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada §
Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada ¶
Molecular Genetics of Cancer Division, Immunology Division, The Walter and Eliza Hall
Institute, Parkville, Victoria, 3052, Australia || Department of Medical Biology, Melbourne
University, Parkville, Victoria, 3052, Australia

2.1 Préface

Ce présent chapitre concerne les travaux étudiant l'implication du facteur de transcription p53 dans la maturation fonctionnelle des cellules NK entre les lignées murines B6 et NOD. Bien que je ne sois pas premier auteur sur cet ouvrage, j'ai grandement contribué à sa réalisation ainsi qu'à sa publication dans le *Journal of Immunology* en 2017. Plus précisément, j'ai mis au point, effectué les expériences, généré les figures, écrit les matériels et méthodes ainsi que préparé la réponse aux réviseurs pour les figures 2.1c, 2.8a et 2.9. Voici comment mes travaux s'intègrent dans l'article.

Tout d'abord, nous commençons par démontrer que, comparées aux cellules NK de la B6, les cellules NK de la souris NOD présentent un défaut de maturation fonctionnelle en s'accumulant dans les stades les moins matures ($CD27^{lo}CD11b^{lo}$ et $CD27^{hi}CD11b^{lo}$) au détriment des stades les plus matures ($CD27^{hi}CD11b^{hi}$ et $CD27^{lo}CD11b^{hi}$). Afin de nous assurer que cette différence est bel et bien due à un véritable défaut de maturation fonctionnelle et non pas un défaut d'expression de ces deux marqueurs, j'ai procédé à l'analyse intracellulaire de l'expression de T-bet et d'Eomes par cytométrie en flux. Ces deux facteurs de transcription sont très importants pour la maturation fonctionnelle et il a été précédemment démontré que leur expression varie au fil de ce processus. Au cours de leur maturation fonctionnelle, les cellules NK perdent leur expression d'Eomes, mais gagnent celle de T-bet [40]. Grâce à mes résultats, nous avons pu démontrer que les cellules NK de la NOD exprimaient moins de T-Bet que les cellules NK de la B6 et ainsi appuyé l'idée que celles-ci ont un véritable défaut de maturation fonctionnelle (Fig 2.1c, p. 49).

À la suite d'études de liaisons génétiques et bio-informatiques, notre groupe a pu identifier la potentielle implication du facteur de transcription antitumoral p53 dans ce processus

de maturation fonctionnelle. Afin de valider l'implication de p53 dans ce processus, j'ai dû mettre au point une méthode de comparaison de l'expression intracellulaire de p53 entre les cellules NK provenant des souris B6 et NOD. Par cytométrie en flux, j'ai pu observer une diminution reproductible des niveaux de p53 tout au long de la maturation fonctionnelle des cellules NK de la souris NOD comparé à la B6 (Fig 2.8a, p. 69). Contextualisés avec un défaut de maturation fonctionnelle aussi observé chez les souris déficientes en p53 (*Trp53^{-/-}*), ces résultats ont donc validé l'implication de p53 dans le processus de maturation fonctionnelle.

Finalement, j'ai aussi contribué à l'étude du mécanisme par lequel p53 influence ce processus. Grâce à des essais de cycle cellulaire (Ki-67) et d'apoptose (annexine V) effectués sur les cellules NK de la B6 et de la B6.*Trp53^{-/-}*, j'ai pu démontrer que malgré une propension accrue des cellules NK déficientes en p53 à proliférer, celles-ci sont plus promptes à mourir dans le stade le plus mature (*CD27^{lo}CD11b^{hi}*) (Fig 2.9, p. 70). Ces derniers résultats ont donc pu expliquer, en partie, le défaut de maturation fonctionnelle observé dans les cellules NK de la souris *Trp53^{-/-}*.

Dans le contexte de ce présent mémoire, cet article est hautement pertinent puisqu'il met en lumière les différences profondes existant entre les cellules NK de la B6 et de la NOD au niveau de leur maturation fonctionnelle qui est étroitement liée à l'acquisition de leurs fonctions effectrices.

Ceci est une version acceptée et non éditée du manuscrit. La version définitive fut publiée dans *The Journal of Immunology*. 199(4) : 1490-1504. doi:

10.4049/jimmunol.1600789.

(Version publiée en Annexe 1)

2.2 Abstract

NK cells constitute potent innate lymphoid cells that play a major role in both tumor immunosurveillance and viral clearance via their effector functions. A four-stage model of NK cell functional maturation has been established according to the expression of CD11b and CD27, separating mature NK (mNK) cells into distinct populations that exhibit specific phenotypic and functional properties. To identify the genetic factors involved in the regulation of NK cell functional maturation, we performed a linkage analysis on F2 (B6.Rag1^{-/-} x NOD.Rag1^{-/-} intercross) mice. We identified 6 loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11 and 18, that were linked to one or more mNK cell subsets. Subsequently, we performed an *in silico* analysis exploiting mNK cell subset microarray data highlighting various genes and microRNAs, as potential regulators of the functional maturation of NK cells. Together, the combination of our unbiased genetic linkage study and the *in silico* analysis position genes known to affect NK cell biology along the specific stages of NK cell functional maturation. Moreover, this approach allowed us to uncover a novel candidate gene in the regulation of NK cell maturation, namely *Trp53*. Using mice deficient for *Trp53*, we confirm that this tumor suppressor regulates NK cell functional maturation. Additional candidate genes revealed in this study may eventually serve as targets for the modulation of NK cell functional maturation to potentiate both tumour and viral clearance.

Keywords:

NK cells, functional genomics, linkage analysis, candidate genes, genetic loci.

2.3 Introduction

Natural killer cells are innate lymphoid cells whose potent effector functions are important for both tumor immunosurveillance and viral clearance. Indeed, NK cells exhibit cytotoxic activity and the ability to rapidly produce and secrete vast amounts of chemokines and cytokines. NK cells acquire these properties in a sequential manner involving multiple stages of development. The first stage is defined as the pre-NK cell precursor (NKP) giving rise sequentially to NKP, immature NK (iNK) cells, and finally mature NK (mNK) cells expressing the surface molecule CD49b (1, 2). Subsequently, mNK cells undergo a four stage maturation process defined by the regulated expression of CD11b and CD27. Specifically, the first mNK cell functional maturation subset expresses low levels of both CD11b and CD27 (hereafter denoted as DN, for double negative). DN mNK cells then follow a $CD11b^{low}CD27^{high}$ (named $CD11b^{low}$) $\rightarrow CD11b^{high}CD27^{high}$ (DP, for double positive) $\rightarrow CD11b^{high}CD27^{low}$ ($CD27^{low}$) differentiation process (3). Notably, Chiossone and colleagues found that the least mature (DN and $CD11b^{low}$) and most mature (DP and $CD27^{low}$) mNK cells largely differ by their specialization in proliferation and effector functions, respectively (3).

Various transcription factors and miRNAs impact mNK cell differentiation. Indeed, a deficiency in Gata3, Id2, Nfil3, miR150 or miR-15a/16 leads to a decrease in the proportion of $CD27^{low}$ mNK cells (4-9). Eomes, Tbx21 (T-bet), Myb, Zeb2 and miR155 also influence NK cell differentiation at specific stages of functional maturation (3, 8, 10-13). While Eomes, Myb and Zeb2 play a more prominent role during the later stages (3, 8, 10, 13), Tbx21 is believed to play a role at both the early and later stages of functional maturation (10, 12). In contrast, miR155 inhibits NK cell maturation as miR155-deficient NK cells exhibit a more mature phenotype with an increase in the frequency of the $CD27^{low}$ subset (14). Altogether, these results

suggest that specific transcription factors and miRNAs can influence NK cell functional maturation.

In addition to transcription factors and miRNAs, other genes also influence NK cell differentiation (15). As a follow-up to our study identifying genetic loci linked to the proportion of NK cells (16), we herein aimed to identify the key genetic determinants involved in the functional maturation of mNK cells, more specifically to identify the molecular pathways defining the transition between the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} stages of mNK cell development. To do so, we used an unbiased genetic approach that indiscriminately addresses the contribution of all genetic determinants to variations in the functional maturation of mNK cells. We performed a linkage analysis which allowed for the identification of six significant loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11 and 18, suggesting a multigenic regulation of NK cell functional maturation. In order to restrict the list of candidate genes located within these intervals, we performed an *in silico* analysis based on data available through the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. Our analysis allowed us to highlight various molecular pathways and candidate genes regulating the specific stages of NK cell functional maturation. Lastly, we validated *Trp53* as a gene regulating the functional maturation of NK cells. This study brings not only insight into the biology of NK cell maturation, but also unveils novel candidate genes regulating the functional maturation of NK cells, which is of relevance to both tumour and viral clearance.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Mice

C57BL/6 (B6), NOD, B6.Rag1^{-/-}, NOD.Rag1^{-/-} and B6.Trp53^{-/-} mice were purchased from The Jackson Laboratory. All of these strains were subsequently maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). F1.Rag (B6 Rag1^{-/-} × NOD Rag1^{-/-}) and F2.Rag (F1.Rag × F1.Rag) mice were bred in house from the parental strains. Six to ten week-old mice were used for phenotypic analyses. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved the experimental procedures.

2.4.2 Flow cytometry

Spleens were treated with collagenase (1mg/mL in PBS, Type V from Clostridium histolyticum, Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C and passed through a 70µM cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions prior to staining with antibodies. CD11b (clone M1/70), CD122 (clone TM-B1), CD27 (clone LG.3A10), CD3 (clone 17A2), B220 (clone RA3-6B2), CD19 (clone 6D5), CD45.1 (clone A20), CD45.2 (clone 104), Annexin V and Zombie Aqua Dye Amcyan antibodies were purchased from Biolegend, CD49b (clone DX5), NKp46 (clone 29A1.4), T-bet (clone eBio4B10) from eBioscience Ki-67 (clone B56) from BD Biosciences, LIVE/DEAD Fixable Yellow from Thermo Fisher Scientific and p53 (clone 1C12) from Cell Signaling Technology. The Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set was used for intracellular staining (clone Dan11mag, eBioscience) according to the manufacturer's instructions (eBiosciences). Annexin V staining was performed in buffer containing Hepes 10mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 1.8 mM. All samples

were acquired using FACSCanto I (BD Biosciences), Fortessa 1 (BD Biosciences) or Fortessa x-20 (BD Biosciences) and were analyzed using the FlowJo software (TreeStar, Ashland). After excluding doublets, CD3 ϵ -CD19 $^{-}$ cells were excluded for Rag1-sufficient mice, followed by the application of a strict size exclusion backgate to the FSC/SSC profile corresponding to live CD122 $^{+}$ CD49b $^{+}$ NK cells for both Rag1-sufficient and $^{-}$ -deficient mice. NK subsets were then separated based on their expression of CD11b and CD27.

2.4.3 Linkage Analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2.Rag male and female mice by using the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen. Single nucleotide polymorphisms were then detected from the F2.Rag mice DNA using the Illumina mouse low density linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, Ontario, Canada. Marker location (in Mb) was determined using the National Center for Biotechnology Information Build m37. The logarithm of odds (LOD) scores were obtained through a single- or two-dimensional quantitative trait locus model using the R/qtl package (18) for the R software (version 2.11.1) with the Haley-Knott algorithm to increase SNP resolution. LOD scores higher than 3.54 were significant for single-dimensional analysis according to permutation tests ($n=10\,000$, $p=0.05$), and LOD scores between 2.14 and 3.54 were considered suggestive. A Pearson's Chi-Square for allele frequencies confirmed that all the significant and suggestive loci did not differ from the Hardy-Weinberg equilibrium. For the *Nkfm2* locus, the distal part of chromosome 7 starting at 100.84Mb was excluded from the Bayes interval analysis because of the bimodal LOD score distribution.

2.4.4 Statistical analysis

Data for the various experiments were tested for significance using a non-parametric Mann-Whitney test with a minimal threshold of 0.05. Estimation of the interval coordinates was obtained using a 95% Bayes interval test. Significance for the genotype distribution differences was tested with an ANOVA and Games-Howell post-hoc test. Normality of distributions was determined using a Shapiro-Wilk test. All statistical analyses and the F2 distribution were obtained using the SPSS 19.0 software.

2.4.5 Ingenuity pathway analysis

Fold changes (>1.5) in microarray datasets for B6.Rag2^{-/-} mNK cell subsets from Chiossone et al. (3) were tabulated and uploaded into the IPA software (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>). To predict the activation state of transcription factors and other regulators based on their effect on expression of downstream target genes, we performed a URA. The IPA regulation z-score algorithm was used to predict the direction of change for a given function (increase or decrease). A z-score > 2 or < -2 means that a function is significantly increased or decreased, respectively, for all significantly enriched groups of genes (p-value < 0.05).

2.5 Results

2.5.1 Identification of a block in the functional maturation of NK cells from the NOD background

NOD mice are known to possess NK cells that exhibit multiple functional defects (16, 19-24). Consequently, we first set out to determine whether NOD NK cells displayed any disparities in the four-stage model of functional maturation relative to those from C57BL/6 (B6) mice. To select for NK cells in both B6 and NOD mice, we performed flow cytometry and gated on CD3 ϵ ⁻CD19⁻B220⁻CD122⁺CD49b⁺ cells (Fig 2.1a, p. 49). Addition of NKp46 to this gating strategy did not improve our ability to select for NK cells and was thus not included in our subsequent analyses (Supplementary Figure 1, p. 92). To assess the functional maturation of NK cells we subsequently verified the expression of CD27 and CD11b on the CD3 ϵ -CD19-B220-CD122⁺CD49b⁺ NK cells (Fig 2.1a, p. 49). When comparing B6 and NOD mice, in addition to total mNK cell proportions (16), we observed conspicuous differences in the maturation profiles of the mNK cells. Relative to B6 mNK cells, NOD mNK cells exhibited an increased proportion of the least mature DN and CD11b^{low} subsets and a reduced proportion of the most mature CD27^{low} subset (Fig 2.1b, p. 49). The impaired mNK cell functional maturation in NOD mice relative to B6 is also reflected in the absolute numbers of the CD11b^{low} and CD27^{low} NK cell subsets, denoting a block in the functional maturation process for NOD mNK cells. To confirm that this block is not secondary to a defect in the regulation of CD11b or CD27 expression in mNK cells from NOD mice, we also determined the level of expression of T-bet and Eomes. T-bet expression is enhanced with mNK cell functional maturation, while Eomes is more highly expressed in the least mature mNK cell subsets (25). Accordingly, we find that mNK cells from NOD mice express lower levels of T-bet and higher levels of Eomes than mNK cells from B6

mice (Fig 2.1c, p. 49). This is further evidenced by defining the ratio of Eomes/T-bet expression, quantified by the mean fluorescence intensity (MFI), which is highest in NOD relative to B6 mice (Fig 2.1c, p. 49). Together, these data support the view that mNK cell functional maturation is impaired in NOD mice.

As the NOD mouse is a well-established model of spontaneous autoimmune diabetes, we wished to determine if the inflammation associated with the underlying pathology was causal to the observed block in NK cell functional maturation. To do so, we took advantage of mice deficient for the Rag1, where Rag1-deficient NOD mice do not develop autoimmune diabetes (26), eliminating any potential underlying inflammation which might bias our observed phenotype. Moreover, the deletion of Rag leads to a complete ablation of peripheral T cells and B cells while still allowing NK cell development (3, 27, 28). Due to the absence of T and B cells, we gated directly on live cells expressing CD49b and CD122 to select for mNK cells (Fig 2.2a, p. 50). Using Rag1-deficient mice of the B6 and NOD backgrounds, we found that, similarly to the wild-type counterparts (Fig 2.1b, p. 49), mNK cells from NOD.Rag1^{-/-} mice display an increase in the proportion and absolute number of the CD11b^{low} subset as well as a decrease in the proportion and absolute number of the most mature CD27^{low} subset (Fig 2.2b, p. 50). Therefore, in comparison to the B6 genetic background, mNK cells from the NOD genetic background display a distinct block in their functional maturation process, which cannot be attributed to the ongoing autoimmune process or the presence of B and T cells. As a result, the differences observed in the functional maturation of NK cells are most likely to be caused by genetic differences between the two inbred strains.

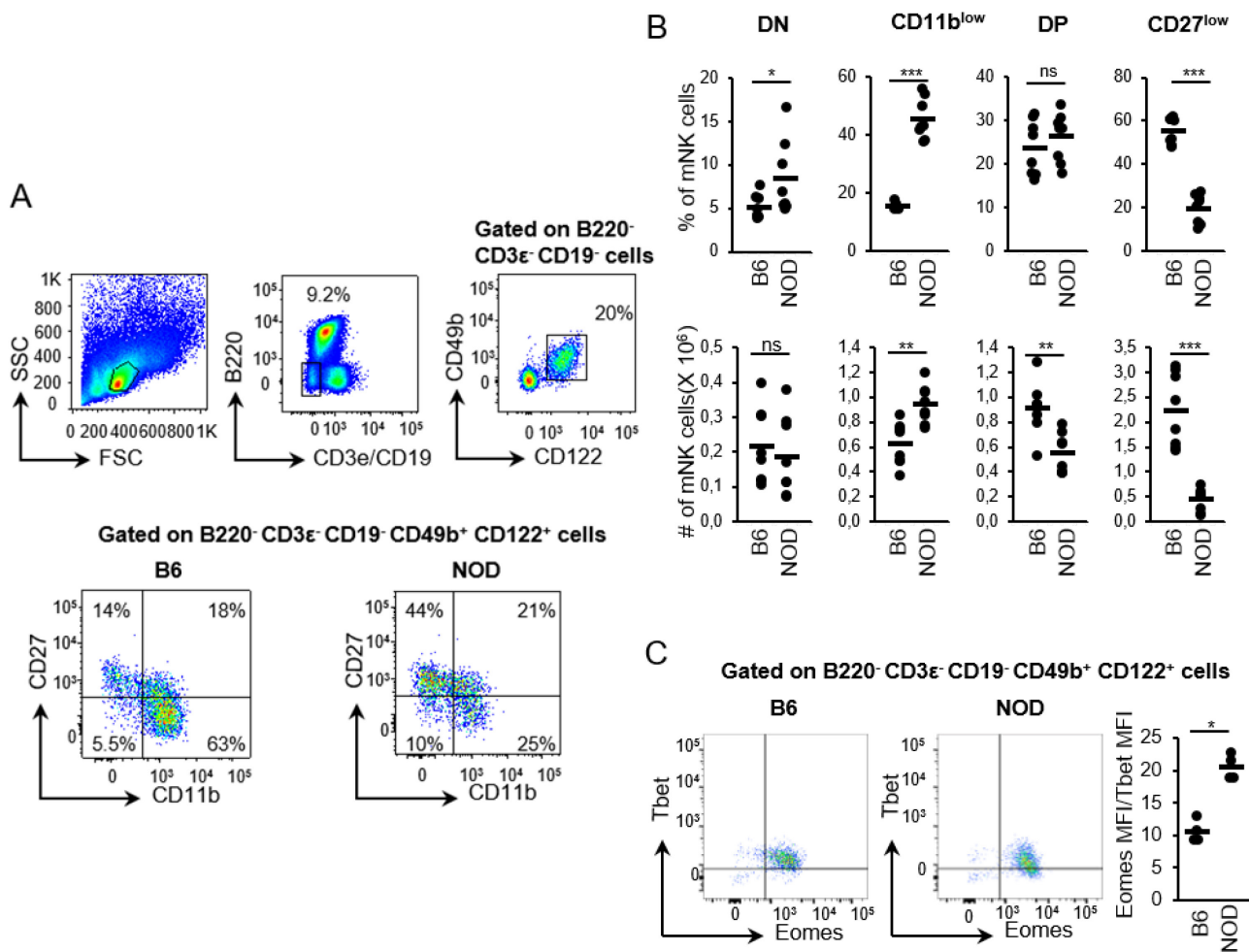


Figure 2.1. NOD mice exhibit a block in mNK cell functional maturation. A) mNK cells are selected based on the lack of T and B cell markers, namely CD3⁻CD19⁻B220⁻ expression and positive expression of both CD122 and CD49b (top panels). The flow cytometry profiles of CD11b vs CD27 expression for mNK cells are illustrated for both B6 (bottom left) and NOD (bottom right) strains. B) The proportion (top) and absolute numbers (bottom) of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets amongst total mNK cells is shown for B6 and NOD mice. Each dot represents data for an individual mouse (bottom). Dash represents the mean. C. T-Bet and Eomes expression on total mNK cells from the spleen B6 and NOD mice is shown. The right panel represent the ratio of Eomes MFI over T-Bet MFI. Each dot represents data for an individual mouse. p value, * < 0.05 ; ** < 0.001, *** < 0.001; ns= non-significant.

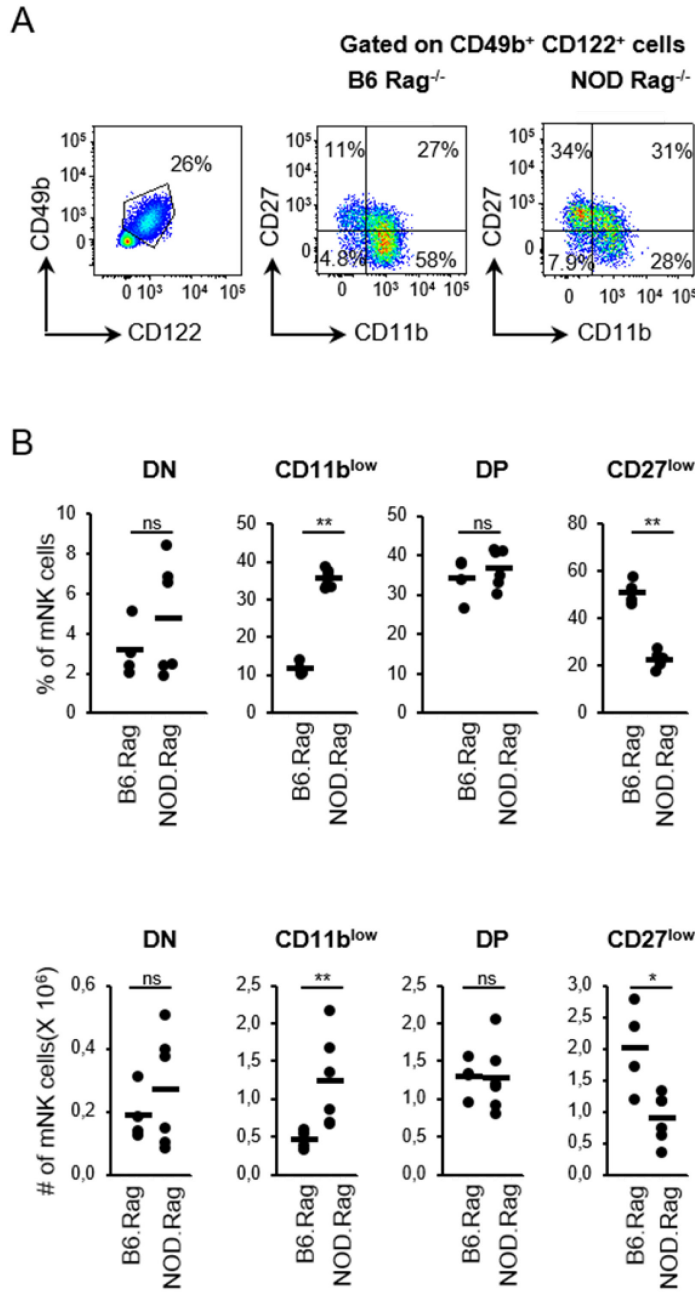


Figure 2.2. The block in mNK cell functional maturation is conserved in Rag1-deficient NOD mice. A) mNK cells in Rag1-deficient mice are selected based on the positive expression of both CD122 and CD49b. The flow cytometry profiles of CD11b vs CD27 expression for mNK cells is illustrated for both B6.Rag1^{-/-} (middle) and NOD.Rag1^{-/-} (right) strains. B) The proportion (top) and absolute numbers (bottom) of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets amongst total mNK cells is shown for B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, * < 0.05 ; ** < 0.01 ; ns= non-significant.

2.5.2 Linkage analysis for NK cell functional maturation

To identify genetic factors contributing to the regulation of NK cell functional maturation, we performed a genetic linkage analysis. Recent publications from our team (16, 29, 30) have demonstrated that Rag1-deficiency increases the sensitivity for identifying significant loci linked to an observed phenotype for rare lympho-myeloid cell populations. As a result, we generated a cohort of 181 F2 (B6.Rag1^{-/-} × NOD.Rag1^{-/-}) mice, which are hereafter termed F2.Rag mice, and quantified the proportions of mNK cells comprising the four stages of functional maturation, namely the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets. The proportion of the four mNK cell subsets each followed a Gaussian distribution (Fig 2.3a, p. 54), which is suggestive of a multigenic regulation of the phenotypes. We then undertook linkage analyses for these traits, where we subjected the DNA from each F2.Rag mouse to the Illumina Golden Gate low-density platform and executed a genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping. Using this approach, we were able to identify six major loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11 and 18 (Fig 2.3b and 2.4, pp. 54-55), underlining the multigenic regulation of NK cell functional maturation. Accordingly, we have named the loci *Nkfm*.

We then generated a high resolution map of the significant loci. Specifically for the DN mNK cell subset, we identified a single significant linkage on distal chromosome 18 with a LOD score of 5.76 (Fig 2.4a, p. 55), where we named this interval *Nkfm1.1*. The 95% Bayes confidence interval analysis, depicted by the grey shaded area, delimits the *Nkfm1.1* locus between 47.48-67.48 Mb (Fig 2.4a, top right, p. 55). For the CD11b^{low} mNK cell subset, we identified three loci significantly linked to the trait. Notably, an overlapping segment of *Nkfm1* was also significantly linked to the proportion of the CD11b^{low} mNK subset and was consequently named *Nkfm1.2* (Fig 2.3b, p. 54). *Nkfm1.2*, which is positioned at 59.48 -71.48Mb

on chromosome 18, presented with a LOD score of 8.02 (Fig 4b, p. 49). The two additional loci, on chromosomes 7 and 11, significantly linked to the CD11b^{low} mNK subset, showed respective LOD scores of 4.70 and 9.06 (Fig 2.4b, p. 49). We termed these loci *Nkfm2* (chromosome 7, Bayes interval 43.46-83.46Mb) and *Nkfm3.1* (chromosome 11, Bayes interval 57.68 -89.93Mb). These results portray a differential genetic regulation of the two least mature mNK subsets, namely the DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, where one and three loci are respectively linked to each subset. However, these data also suggest a potential common regulation of both DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, as *Nkfm1* is linked to both of these subsets (Fig 2.3b, p. 54).

The size of the DP mNK subset was independent of the *Nkfm1*, -2 or -3 loci. Instead, we identified a locus on proximal chromosome 10, which we termed *Nkfm4*, with a significant linkage for the DP mNK cells (Fig 2.4c, p. 55) as well as the CD27^{low} mNK cells (Fig 2.4d, p. 55). Consequently, we subdivided this locus into 2 separate loci, which we termed *Nkfm4.1* and *Nkfm4.2* (Fig 2.3b, p. 54). *Nkfm4.1*, which is positioned at 20.15-36.27Mb, is the sole locus linked to the regulation of the DP mNK cell subset and presented with a LOD score of 7.67, while *Nkfm4.2*, which is positioned at 24.15-44.15Mb, is linked to the regulation of the CD27^{low} mNK cell subset and presented with a LOD score of 8.02 (Fig 2.4c, p. 55). Along with *Nkfm4.2*, three additional significant loci were identified for the regulation of the most mature CD27^{low} mNK cell subset. These loci are located on chromosomes 2, 4 and 11 with LOD scores of 5.51, 5.41, and 3.90, respectively (Fig 2.4d, p. 55). These loci, which we named *Nkfm5* (chromosome 2), *Nkfm6* (chromosome 4) and *Nkfm3.2* (chromosome 11), are located at 31.21-64.17Mb, 23.03-47.63 Mb, and 73.68 -110.98 Mb, respectively. Interestingly, as for DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, although the DP and CD27^{low} mNK cell subsets are linked to one and four

loci respectively, potential common regulation of both DP and CD27^{low} mNK cell subsets is suggested by a common linkage to the *Nkfm4* locus (Fig 2.3b, p. 54).

To determine the impact of the specific genotype on the each mNK cell subset, we subsequently segregated F2.Rag mice based on their haplotype at the SNP corresponding with the highest LOD score within each locus. This segregation of F2.Rag mice is, at times, in agreement with the parental NOD and B6 phenotypes, where NK cells from the NOD genetic background depict a more immature phenotype relative to the B6 background (Fig 2.1 and 2.2, pp. 49-50). Notably, F2.Rag mice bearing the NOD genotype within *Nkfm1.1* and *Nkfm1.2* exhibit a higher proportion of DN and CD11b^{low} mNK cells (Fig 2.4a and b, lower right, p. 55), and F2.Rag mice with NOD alleles at the *Nkfm4.2* locus present with a lower proportion of CD27^{low} mNK cells (Fig 2.4d, lower right, p. 55). Conversely, mice homozygous for the NOD alleles within *Nkfm3.1* presented with a decreased proportion of the CD11b^{low} mNK subset (Fig 4b, lower right), and those with NOD alleles within the *Nkfm3.2*, *Nkfm5* and *Nkfm6* loci an increased proportion of CD27^{low} mNK cells (Fig 4d, lower right, p. 49), both of which contrasts with the mNK cell phenotype found in the NOD.Rag1^{-/-} parental strain (Fig. 2.2b, p. 50). These results reveal complex interactions between loci suggesting some degree genetic epistasis in the regulation of NK cell functional maturation (31), and where the *Nkfm4.2* locus likely plays a dominant contribution over the aforementioned loci in defining the proportion of CD27^{low} mNK cells.

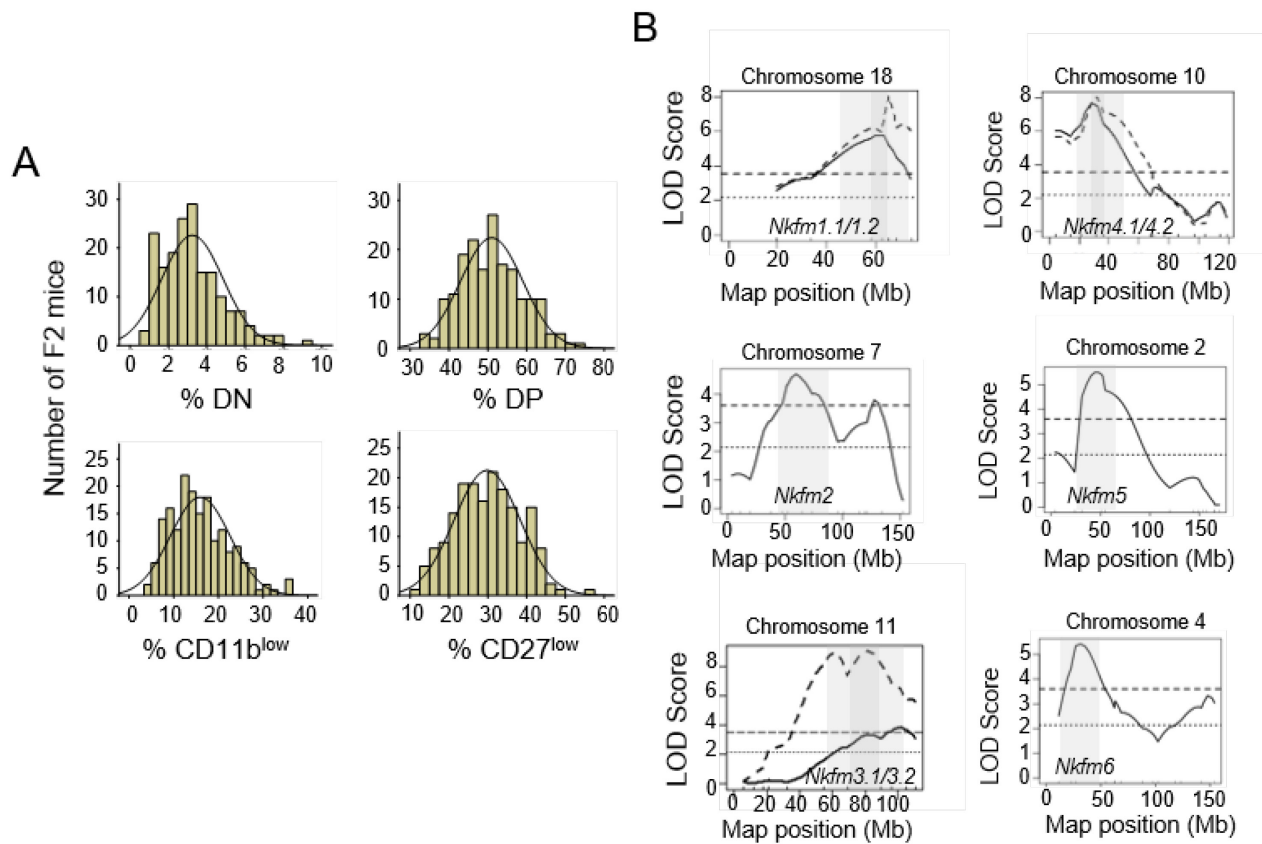


Figure 2.3. mNK cell maturation is a multigenic trait. A) The distribution of the F2.Rag cohort relative to the proportion of DN, CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cells is shown. B) The location of each *Nkfm* locus (light grey shaded area), including overlapping loci (dark grey shaded area), on the associated chromosome is shown.

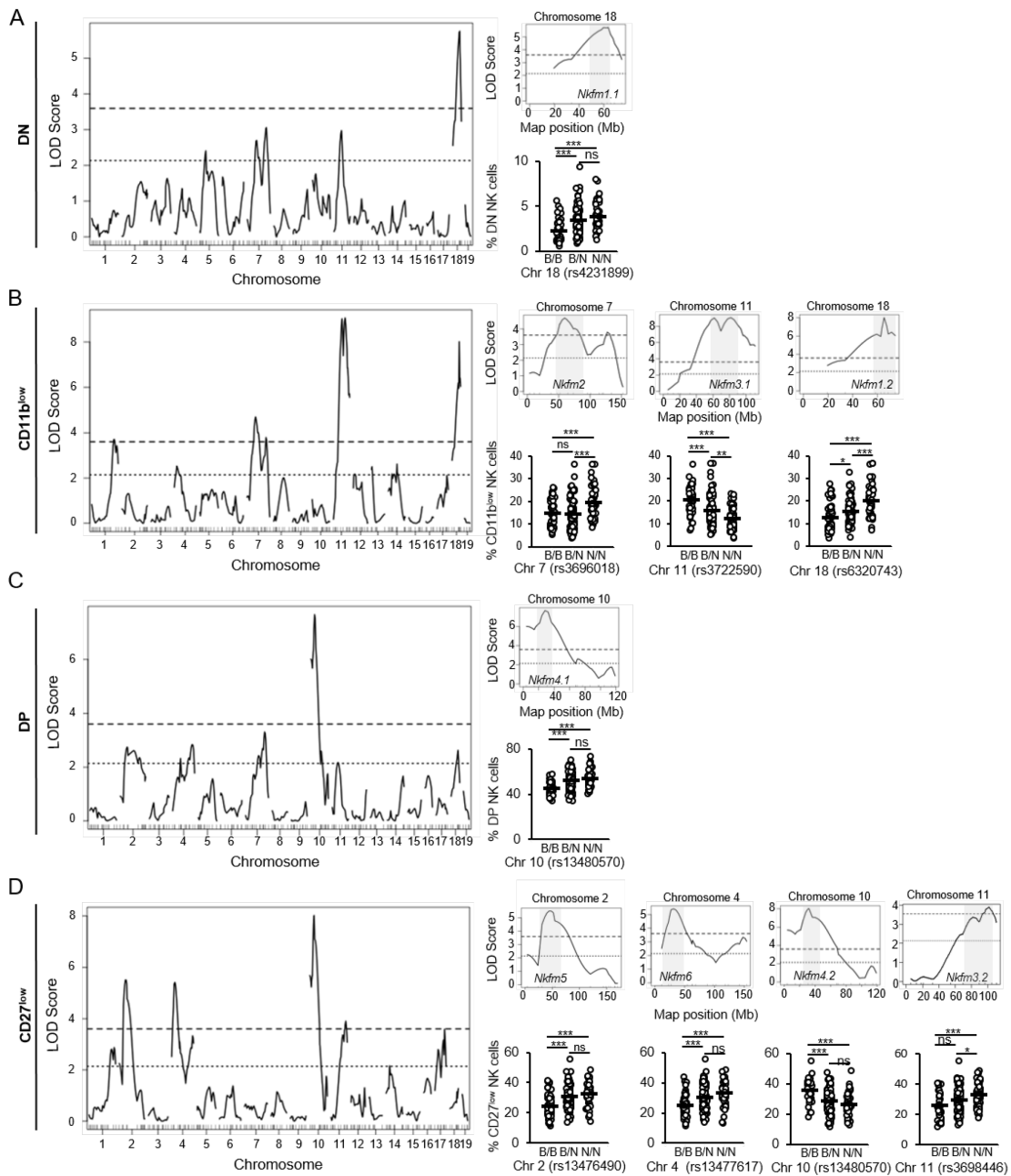


Figure 2.4. Linkage analysis of mNK cell functional maturation in F2.Rag1-deficient mice. The genome-wide LOD score plots (R/Qtl) (left), the high resolution map of the linkage to the chromosome (top right), and the representation of the proportion of the mNK cell subsets segregated in relation to the genotype at the identified SNP (bottom right) is depicted for the (A) DN, (B) CD11b^{low}, (C) DP, and (D) CD27^{low} mNK cell subsets in the F2.Rag cohort. The dashed and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold for LOD score plots. For the high resolution map, the grey shaded region depicts the 95% Bayes interval for the specified Nkfm locus. Each dot represents an individual mouse on haplotype distributions, and a dash represents the mean. p value, * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 ; ns= non-significant. B/B mice, Homozygous for B6 alleles; B/N, heterozygous for B6 and NOD alleles; N/N, homozygous for NOD alleles.

2.5.3 Candidate genes found within *Nkfm* loci

We next generated a complete list of all genes encoded within the six identified *Nkfm* loci (Supplementary Table 2.1, p. 93). Several genes located in the *Nkfm* intervals caught our attention as they have previously been associated with NK cell development (Supplementary Table 2.1, p. 93). Indeed, *Tbx21*-deficient mice present with a deficit in $CD27^{low}$ mNK cells (10), in line with our finding that *Tbx21* is encoded within the *Nkfm3.2* locus linked to the regulation of the $CD27^{low}$ mNK cell subset. The *Myb* transcription factor encoded within the *Nkfm4.1* locus linked to the DP subset also plays a role in mNK cell functional maturation (8, 10). Moreover, the *Nkfm6* locus linked the $CD27^{low}$ mNK cell subset contains *Tgfb1*, which is involved in the signal transduction pathway for TGF- β (32, 33), known to influence the final stage of mNK cell maturation (34). The *Nkfm3* locus also reveals *Stat3*, *Stat5a* and *Stat5b* as interesting potential candidate genes for NK cell functional maturation, where various cytokines, hormones and growth factors activate *Stat3* and *Stat5* via their signaling pathway, including IL-2, IL-7, IL-15 and *Flt3* (35, 36), which influence NK cell development (37-39). Interestingly, *Flt3l* is a candidate gene located within *Nkfm2*, where *Flt3L* is involved in the generation of common lymphoid progenitors (CLP) from which NK cells originate (39). Altogether, the loci linked to NK cell functional maturation encode genes that have been previously associated to this trait. This supports the validity of the linkage analysis for identifying candidate genes and pathways regulating each differentiation step during the course of NK cell functional maturation.

2.5.4 Candidate genes based on differential expression

In order to delimit the list of candidate genes encoded within the *Nkfm* loci, we aimed to identify differentially expressed genes (DEGs) between the CD11b^{low} versus DP and DP versus CD27^{low} mNK cell maturation stages that were also located within the loci of interest. Correspondingly, in 2009, Chiossone and colleagues published their findings that validated the 4-stage developmental pathway of mNK cells during functional maturation for which they also performed microarray analyses on the CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cell subsets from a B6.Rag2^{-/-} mouse (3). Importantly, these microarray data were submitted to, and thus accessible from, the GEO repository. Therefore, we took advantage of this microarray data and listed the DEGs that were found within *Nkfm1.2*, -2, -3.1, -3.2, -4.1, -4.2, -5, and -6 (Supplementary Table 2.2, pp. 94-95). Of the DEGs listed, 7 genes, namely *Arg1*, *Cdc6*, *1110036O03Rik*, *Myb*, *Pkp4*, *Ptgs1* and *Zeb2* exhibited at least a two-fold difference in their expression between maturation stages. Interestingly, the gene expression of *Arg1*, *Cdc6*, *Myb* and *Pkp4* decreases, whereas that of *1110036O03Rik*, *Ptgs1* and *Zeb2* increases, during mNK cell functional maturation, where the role of *Zeb2* in functional maturation of mNK cells has recently been validated (13). Note that although the majority of the DEGs listed exhibited less than a twofold change in expression, small variations in expression in a set of genes may have a compound effect on a given biological phenotype and should not be readily dismissed. Altogether, this analysis highlighted multiple candidate genes from our linkage analysis that are also differentially expressed between the functional maturation stages of mNK cells.

To provide additional insight into the relevant genes affecting the specific steps of NK cell functional maturation, we next aimed to identify the genes located within *Nkfm* loci whose differential gene expression between mNK cell subsets correlated with a change in the activity

of their associated upstream regulators. To do so, an unrestricted Ingenuity-based upstream regulator analysis (URA) was performed. This analysis predicts the activation state of upstream regulators based on their effect on the expression of all downstream target genes, where upstream regulators are not limited to transcription factors but can be any gene or small molecule that has been observed experimentally to affect gene expression. We applied a URA that was not restricted to genes within the *Nkfm* loci, but took into account all genes which are differentially expressed between the mNK cell subsets. We used two metrics to identify the most important upstream regulators: activation z-score and p-value (dotted lines and red dots, respectively, in Fig 2.5, p. 62). The p-value, calculated with the Fischer's exact test, provides the statistical significance of the difference whereas the activation z-score depicts the amplitude of the difference between NK cell subsets. The URA predicted that various pathways were differentially activated between the CD11b^{low} vs DP and DP vs CD27^{low} mNK cell subsets (Fig 2.5, p. 63). This approach positions the relative importance of specific genes in discrete functional maturation subsets. For instance, *Il7* is an upstream regulator of the CD11b^{low} subset, whereas *Il21* is an upstream regulator of the CD27^{low} subset, with respective p values of 3.83e-14 and 1.18e-08. The URA also suggests that mNK cells undergo major transcriptional changes as they transition from one functional maturation stage to the next, where almost twice the number of upstream regulators are listed during the transition between the DP to CD27^{low} stage relative to the CD11b^{low} to DP stage (compare Fig 2.5a and 2.5b, p. 62). Interestingly, some genes were common to both the CD11b^{low} to DP and the DP to CD27^{low} maturation stages (Fig 2.6, p. 65). Moreover, the activity of all but one of these common genes, namely *Tlr3*, followed a CD11b^{low} → DP → CD27^{low} mNK cell development program as they either followed a CD11b^{low}>DP>CD27^{low} or CD11b^{low}<DP<CD27^{low} hierarchy (Fig 2.6, p. 64). Importantly,

some of the genes predicted to be differentially activated in this analysis are also upstream regulators for DEGs located within the *Nkfm* loci (Tables 1 and 2). For instance, our analysis revealed that Trp53 is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Fig 2.5a, p. 62, 2.6, p.58 and Table 1, p. 59) as well as between the DP and CD27^{low} mNK cell subsets (Fig 2.5b, p. 62, 2.6, p. 58 and Table 2, p. 60). In addition, our analysis revealed that *Ifng* is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Fig 2.5a, p. 63), based on the differential gene expression of many genes, yet is not differentially activated between the DP and CD27^{low} mNK cell subsets (Fig 2.5b, p. 63). This suggests that *Ifng* may affect early stages of NK cell functional maturation. On the contrary, *Tnf* may regulate later steps as it is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the DP and CD27^{low} mNK cell subsets, but not the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Fig 2.5, p. 63 and Table 2.2, p. 61). Altogether, this analysis revealed upstream regulators of DEGs that are encoded within *Nkfm* loci, thereby highlighting these downstream targets as interesting candidate genes for specific stages of NK cell functional maturation.

Table 1. Upstream regulators of DEGs encoded within Nkfm loci (CD11b^{low} vs DP)

| Chr | <i>Nkfm</i> | gene | Upstream regulators |
|-----|--------------------|-----------------|---|
| 18 | <i>Nkfm1.1/1.2</i> | <i>Pmaip1</i> | Trp53 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Flt3l</i> | Tlr3, Il7 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Ppp1r15a</i> | Trp53, Nupr1, Csf2 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Emp3</i> | Twist1 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Tjp1</i> | Vip, Trp53, Ifng, Hgf, Foxm1, Egf |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Aurkb</i> | Trp53, Tbx2, Rb1, Myc, Irgm1, Hgf, Foxm1, Egf, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Cd68</i> | Nupr1, Insig1 |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Tnfsf13</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Chrne</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Pfn1</i> | Trp53 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Hic1</i> | Trp53 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Fam101b</i> | Wnt3a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Lgals9</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl3</i> | Wnt3a, Vip, Trp53, Tlr3, Stat6, Ifng, Egr1, Cyp27b1, Csf2, Cort, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl4</i> | Vip, Trp53, Tlr3, Il7, Ifng, Hgf, Egr1, Cyp27b1, Csf2, Cort, Cdkn2a |
| 10 | <i>Nkfm4.1/4.2</i> | <i>Arg1</i> | Stat6, Myc, Ifng, Csf2 |

Table 2 Upstream regulators of DEGs encoded within *Nkfm* loci (DP vs CD27^{low})

| Chr | locus | gene | Upstream regulators |
|-----|--------------------|----------|--|
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Spag5 | Ptger2, Irgm1, Erbb2, Csf2, Cdkn1a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Ccl9 | Trp73, Tnf, Nfkbia, Ifnar1, Chuk, Cebpe, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Ccl3 | Trp53, Tnf, Tlr9, Tlr3, Ticam1, Ptger4, Nr3c1, Nfkbia, Myd88, Irf3, Ifnar1, Csf2, Chuk, Cebpd, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Ccl4 | Trp53, Tnf, Tlr9, Tlr3, Ticam1, Ptger4, Nr3c1, Myd88, Irf3, Il17a, Ifnar1, Hgf, Foxo1, Erbb2, Csf2, Chuk, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Ppm1d | Trp53, Anxa2 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | Mpo | Tnf, Il3, Il17a, Csf2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | Cdc6 | Trp53, Tbx2, Rbl2, Rbl1, Rb1, Ntrk2, Nfkbia, Hgf, Ep400, E2f6, Cdkn1a, Ccnd1 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | Top2a | Trp53, Tcf3, Map3k1, Foxm1, Fgf2, Erbb2, Csf2, Cdkn1a |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | Slc4a1 | Hipk2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | Kif18b | Ptger2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | Map3k3 | Mgea5 |
| 10 | <i>Nkfm4.1</i> | Myb | Rb1, Myb, Csf2 |
| 10 | <i>Nkfm4.1</i> | Sgk1 | Trp53, Tnf, Nr3c1, Nfkbia, Myc, Hgf, Foxo1, Csf2, Chuk |
| 10 | <i>Nkfm4.1/4.2</i> | Dse | Cdkn1a |
| 10 | <i>Nkfm4.2</i> | Traf3ip2 | Nr3c1 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | Pbx3 | Rb1, Cdkn2a |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | Traf1 | Tnf, Rpsa, Nr3c1, Nfkbia, Irf7, Foxo1, F2, Erbb2 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | Ptgs1 | Trp53, Tnf, Tcf3, Hgf, Erbb2, Egf |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | Zeb2 | Twist1, Rb1, Foxm1 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | Wdsub1 | Kmt2d |
| 4 | <i>Nkfm6</i> | Reck | Erbb2 |
| 4 | <i>Nkfm6</i> | Melk | Trp53, Rb1, Ptger2, Hgf, Cdkn2a, Ccnd1 |

Although our understanding of the role for miRNAs in the regulation of NK cell development is still limited (40), they nevertheless remain important potential candidates for the regulation of mNK cell functional maturation. Based on associations with their putative target genes, miRNAs can be predicted to be activated or repressed during distinct biological conditions by using microarray data (41). Therefore, we executed an additional Ingenuity-based URA that would predict the activation state of upstream miRNAs based on their effect on the expression of downstream target genes. The analysis predicted that several miRNAs were differentially activated between the CD11b^{low} vs DP and DP vs CD27^{low} mNK cell subsets (Fig 2.7, p. 65). Indeed, the URA revealed a general increase in predicted miRNA activity during the transition from the CD11b^{low} to the DP stage (Fig 2.7a, p. 66), followed by a general decrease in predicted miRNA activity during the transition to the final CD27^{low} stage of mNK cell functional maturation (Fig 2.7b, p. 65). Altogether, this analysis predicts miRNAs as upstream regulators of DEGs between the functional maturation stages of mNK cells, with the DP subset presenting the most active miRNA activity.

A

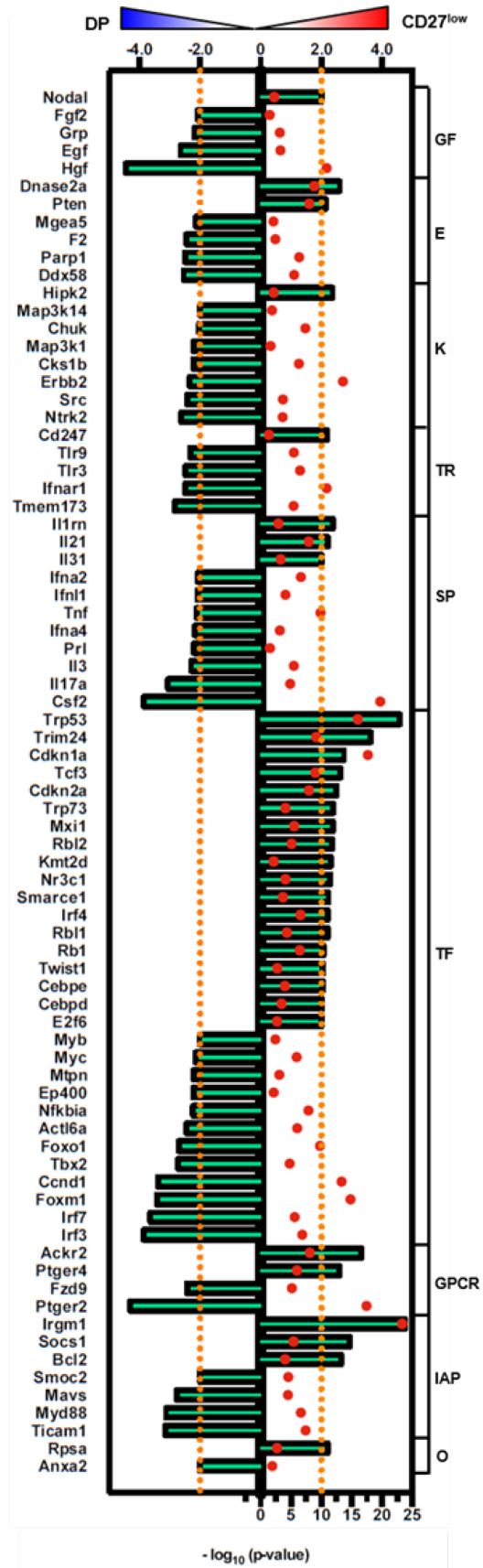
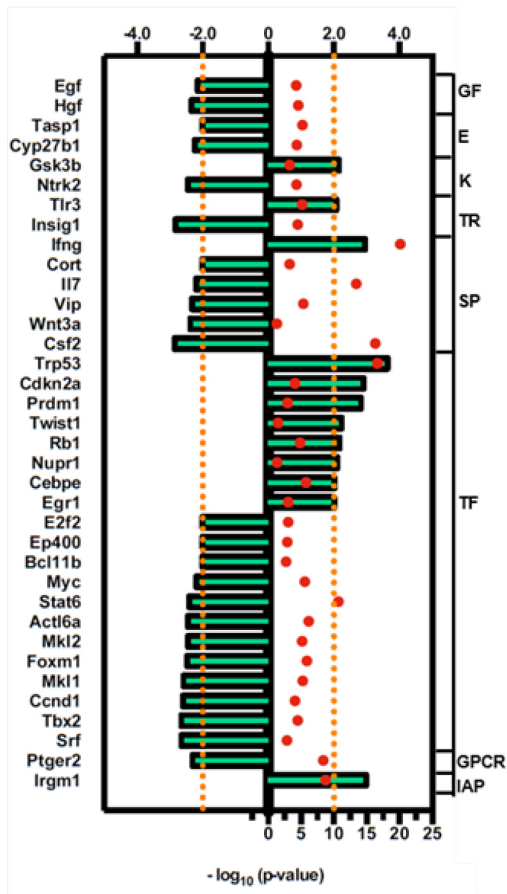


Figure 2.5. Upstream regulator analysis of differentially expressed genes between CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cells. An Ingenuity-based pathway analysis (IPA) was applied to predict upstream regulators which are differentially activated between the mNK cell subsets. The analysis was based on two metrics: z-score and p-value. The upstream regulators that are expected to be increased or decreased in (A) CD11b^{low} vs DP or (B) DP vs CD27^{low} NK cells based on the gene expression changes in the dataset were identified using the IPA regulation z-score algorithm. A positive or negative z-score value indicates that an upstream regulator is predicted to be respectively activated or repressed in the distinct mNK cell subsets. Only functions and pathways with a z-score > 2 or < -2 (represented by orange dotted lines) were considered. Upstream regulators were grouped based on their biological function: Growth Factors (GF), Enzymes (E), Kinases (K), Transmembrane Receptors (TR), Secreted Proteins (SP), Transcription Factors (TF), G-Protein Coupled Receptors (GPCR), Intracellular Adaptor Proteins (IAP) and Other (O). The p-value (red dots), calculated with the Fischer's exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related biological pathway is significant (p-value < 0.05 for $-\log_{10} > (1.3)$).

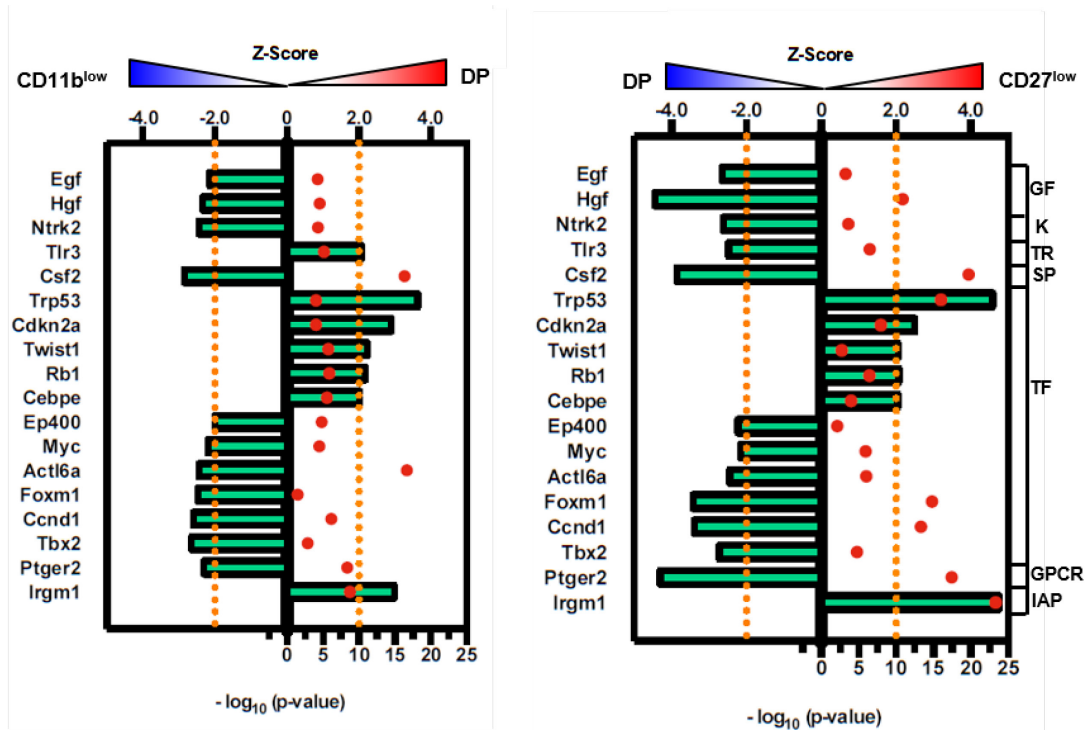


Figure 2.6. Upstream regulators common to both CD11b^{low} to DP and DP to CD27^{low} NK cell functional maturation stages. All upstream regulators identified in Figure 5 that are common to both CD11b^{low} to DP and DP to CD27^{low} NK cell functional maturation stages are shown. A positive or negative z-score value indicates that the activity of the upstream regulator is predicted to be respectively increased or decreased in the distinct mNK cell subsets. Only upstream regulators with a z-score > 2 or < -2 (represented by orange dotted lines) were considered. Upstream regulators were grouped based on their biological function: Growth Factors (GF), Kinases (K), Transmembrane receptors (TR), Secreted Proteins (SP), Transcription Factors (TF), G-Protein Coupled Receptors (GPCR) and Intracellular Adaptor Proteins (IAP). The p-value (red dots), calculated with the Fischer's exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related upstream regulator is significant (p-value < 0.05 for $-\log_{10} > (1.3)$).

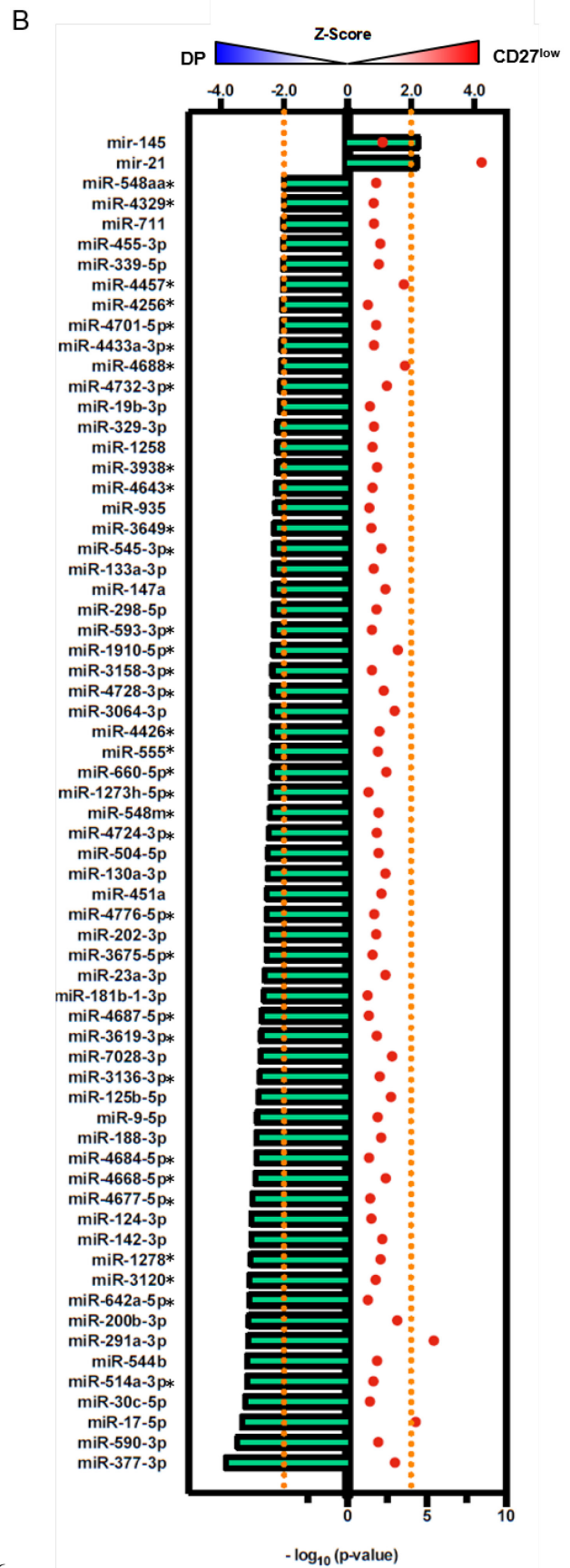
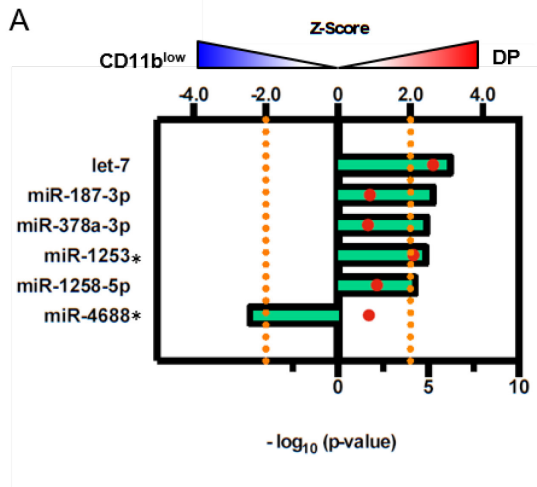


Figure 2.7. Upstream miRNA analysis between CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cells. An Ingenuity-based pathway analysis (IPA) was applied to predict upstream miRNAs which are differentially expressed between the mNK cell subsets. The analysis is based on two metrics: z-score and p-value. The upstream miRNA that are expected to be increased or decreased in (A) CD11b^{low} vs DP, or (B) DP vs CD27^{low} NK cells according to the gene expression changes in our dataset were identified using the IPA regulation z-score algorithm. A positive or negative z-score value indicates that the activity of the miRNA is predicted to be increased or decreased in the distinct NK subsets. Only miRNA with a z-score of > 2 or < -2 (represented by orange lines) were considered. The p-value (red dots), calculated with the Fischer's exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related miRNA is significant (p-value < 0.05 for $-\log_{10} > (1.3)$). The * symbol next to a miRNA indicates miRNA that have yet to be confirmed in mice according to miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

2.5.5 Validation of *Trp53* as a causal gene regulating NK cell functional maturation

Our analysis positioned the function of many genes and miRNA along the NK cell functional maturation process. It also revealed genes that had not previously been associated with NK cell functional maturation. For instance, *Trp53* is a candidate gene located within *Nkfm3.1*, associated with the CD11b^{low} mNK cell subset (Supplementary Table I). In addition, *Trp53* is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between mNK cell subsets based on the global gene expression changes (Fig 2.5 and 2.6, pp. 62 and 64). It is also highlighted as an upstream regulator for various candidate genes encoded within the specific *Nkfm* loci (Tables 1 and 2, pp. 60-61). Together, these results point to *Trp53* as a highly interesting candidate gene. As a result, we aimed to further characterize how *Trp53* and its gene product, p53, influence mNK cell functional maturation. We first comparatively assessed the expression of p53 in mNK cell functional maturation stages from B6 and NOD mice. We reproducibly observed a lower level of p53 expression in DN, CD11b^{low} and DP mNK cells from NOD mice relative to B6 mice (Fig 2.8a, p. 69). We next evaluated the impact of *Trp53* deletion on NK cell functional maturation by comparing the proportion of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets between B6 and B6.*Trp53*^{-/-} mice. As for NOD mice, we

observed a significant increase in the proportion of the immature CD11b^{low} mNK cell subset, and a respective significant decrease in the most mature CD27^{low} mNK cell subset in B6.Trp53^{-/-} mice relative to B6 mice, indicative of a defect in functional maturation of NK cells in Trp53-deficient mice (Fig 2.8b, p. 69). Therefore, these results demonstrate that Trp53, a candidate gene linked to the regulation of the CD11b^{low} mNK cell subset, is indeed relevant to NK cell functional maturation.

Trp53, although mostly investigated for its role as guardian of the genome and its implication in cancer, is also involved in the regulation of many cellular processes (42). To determine how Trp53-deletion influenced NK cell functional maturation, we examined the proliferation of NK cells using the Ki-67 proliferation marker. Interestingly, a higher proportion of B6.Trp53^{-/-} NK cells expressed Ki-67 than those from B6 mice (Fig 2.9a, top panels, p. 69). Expectedly, within the different NK cell functional maturation stages, we confirm that the CD11b^{low} subset represent the stage with the highest proliferative rate, with an average of 24% of Ki-67⁺ cells in B6 mice (Fig 2.9a, p. 69). Trp53-deficiency substantially increased the proportion of Ki-67⁺ CD11b^{low} mNK cells to an average of 37%. The proportion of Ki-67⁺ cells was also considerably enhanced in Trp53^{-/-} DP NK cells relative to those from B6 mice (Fig 2.9a, p. 69). The high level of proliferation of both CD11b^{low} and DP NK cell functional maturation stages may contribute, at least in part, to the apparent defect in NK cell functional maturation in Trp53^{-/-} mice. In addition to cell cycle, we quantified the proportion of apoptotic NK cells. We found that, in addition to enhanced cell cycle, total NK cells from Trp53^{-/-} exhibited a higher level of apoptosis (Fig 2.9b, top panel, p. 69). This was mostly attributed to the later stage of NK cell functional maturation, namely the CD27^{low} mNK cell subset. Together, the enhanced cell cycle at the early and the enhanced apoptosis at the late NK cell functional

maturation stages agree with the global phenotype observed in $Trp53^{-/-}$ mice, wherein we find an increase in the $CD11b^{low}$ and a decrease in the $CD27^{low}$ mNK cell subsets.

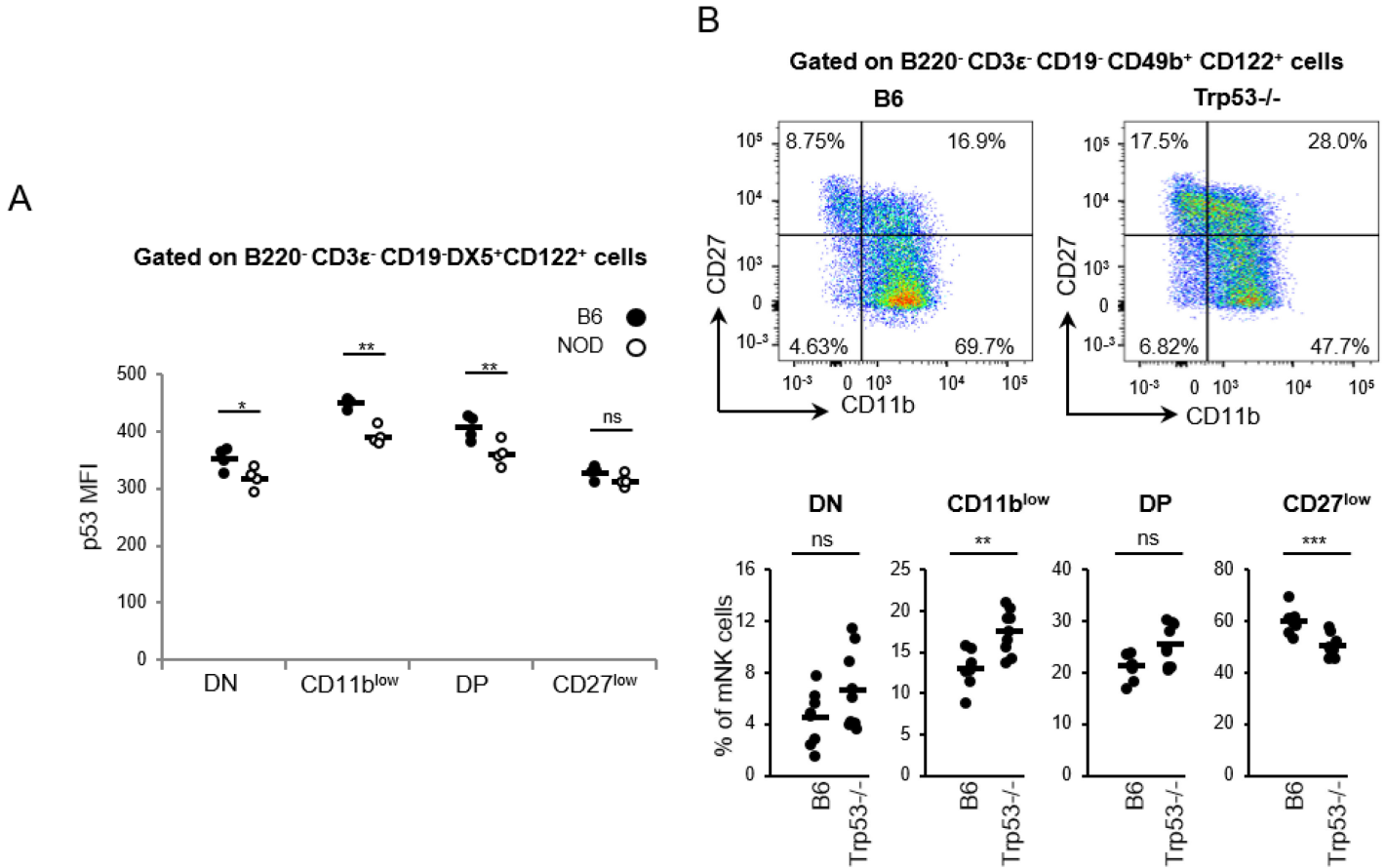
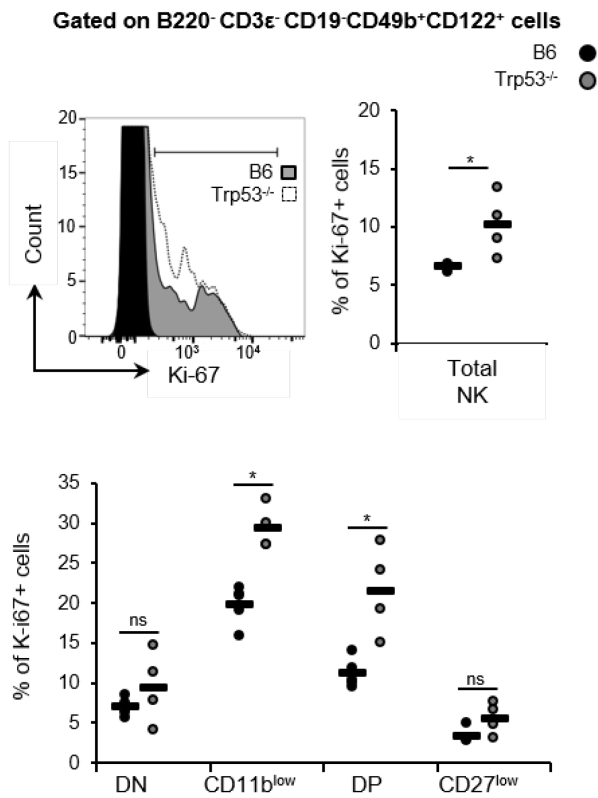


Figure 2.8. $Trp53$ impacts mNK cell functional maturation. A) The MFI of p53 expression is shown for B6 and NOD NK cell functional maturation stages. To compare the p53 MFI, B6 and NOD mice were mixed in a 1:1 ratio prior to staining. CD45.1 was used to resolve NOD from B6 cells. Similar results were obtained when CD45.2 was used to positively gate on B6 cells (not shown). Each dot represents data for an individual mouse. B) Representation of CD11b vs CD27 expression for mNK cells is illustrated for both B6 (top left) and B6. $Trp53^{-/-}$ (top right) strains. The proportion of the DN, $CD11b^{low}$, DP, and $CD27^{low}$ mNK cell subsets amongst total mNK cells is shown for B6 and B6. $Trp53^{-/-}$ mice (bottom). Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, * < 0.05 ; ** < 0.01; ns= non-significant.

A



B

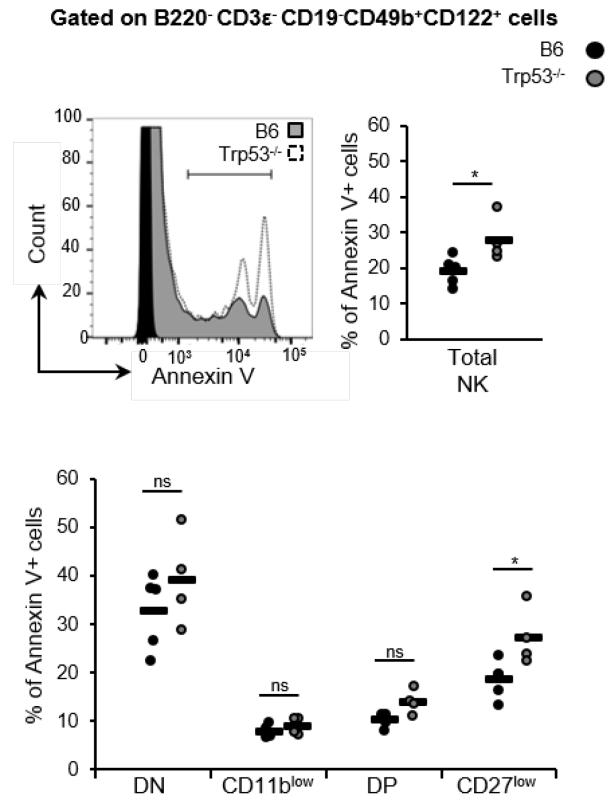


Figure 2.9. Trp53 enhances proliferation and apoptosis of specific mNK cell subsets. A) Left, Overlaid histogram representation of Ki-67 expression in mNK cells from B6 (shaded) vs Trp53^{-/-} (dotted) strains. Right, Compilation of the percentage of Ki-67⁺ mNK cells in B6 (black) and Trp53^{-/-} (grey) mice. Bottom, Compilation of the percentage of Ki-67⁺ cells in DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets is shown for B6 (black) and Trp53^{-/-} (grey) mice. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. B) Left, Overlaid histogram representation of Annexin V expression levels in mNK cells from B6 (shaded) vs Trp53^{-/-} (dotted) strains. Right, Compilation of the percentage of Annexin V⁺ mNK cells in B6 (black) and Trp53^{-/-} (grey) mice. Bottom, Compilation of the percentage of Annexin V⁺ cells in DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets is shown for B6 (black) and Trp53^{-/-} (grey) mice. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. p value, * < 0.05 ; ** < 0.01 ; ns= non-significant.

2.6 Discussion

A 4-stage model of NK cell functional maturation has been established based on the expression of CD11b and CD27, separating mNK cells into four distinct subsets that follow a $DN \rightarrow CD11b^{low} \rightarrow DP \rightarrow CD27^{low}$ differentiation process (3). Although various genes have been demonstrated to play a role in the regulation of NK cell maturation, the precise stage at which these genes play a role remains to be fully elucidated. Here, by exploiting the B6 and NOD inbred strains, we identified genetic determinants that regulate the transition of mNK cells between the DN, $CD11b^{low}$, DP and $CD27^{low}$ stages of functional maturation. Indeed, we demonstrate that NOD mice exhibit a block in NK cell functional maturation in comparison to B6 mice in both a Rag1-sufficient and –deficient setting. Subsequently, we used an unbiased linkage analysis to reveal six novel loci, which we named *Nkfm1* to *Nkfm6*, associated with variations in the proportion of the four distinct mNK subsets. Notably, none of these loci coincide with those linked to the proportion of mNK cells from our recent study, suggesting that mNK cell functional maturation and size of the mNK cell pool are regulated by distinct molecular pathways (16). More specifically, we found that the six loci were independently associated with distinct subsets, suggesting that the block in mNK cell maturation occurs at multiple stages during the four-stage maturation process, where each transition is regulated by different factors. In order to delimit the list of candidate genes encoded within each of the *Nkfm* loci, we took advantage of Affymetrix microarray data submitted to the GEO repository by Chiossone and colleagues (3), for which the $CD11b^{low}$, DP and $CD27^{low}$ mNK cell subsets from B6.Rag2^{-/-} mice were analyzed. We performed various in silico analyses that allowed us to uncover candidate genes that are not only linked to a block in NK cell functional maturation but are also differentially expressed between the functional maturation stages themselves.

Altogether, the combination of our linkage analysis and the in silico analyses using data submitted to the GEO repository allowed us to highlight various genes, including transcription factors, receptors, proteins, enzymes and kinases, as well as miRNAs as candidate genes regulating the specific stages of NK cell functional maturation.

Our analysis not only uncovered novel candidate genes, but also highlighted genes that are known to directly or indirectly influence NK cell maturation and positioned their role across the specific NK cell functional maturation steps. For instance, *Flt3l* located within *Nkfm2*, which is linked to the CD11b^{low} mNK cell subset, is crucial for the development and homeostasis of dendritic cells (DCs), which are known to have a close connection to NK cells through a process termed NK-DC crosstalk (38). Castillo and colleagues have shown that, during this interaction, DCs can trans-present IL-15 to NK cells, where DC-mediated IL-15 trans-presentation plays a role in the development of mNK cells during the early stages of the maturation process, in particular the development of CD11b^{low} mNK cells (45). Therefore, the administration of recombinant Flt3L, which leads to the drastic expansion of DC, consequentially gives rise to an NK cell expansion in an IL-15-dependent fashion (46). Importantly, our linkage analysis not only supports the role for *Flt3l* in the maturation of NK cells, but also identifies at which stage it plays its role. Indeed, our analysis reveals *Flt3l* to be a candidate gene located within the *Nkfm2* locus linked to the proportion of the CD11b^{low} mNK cell subset, in accordance with findings by Castillo and colleagues (45). By taking advantage of the GEO repository data, our analysis revealed that the *Flt3l* gene is in fact differentially expressed between CD11b^{low} and DP mNK cells while IL-7 and Tlr3, which are both upstream regulators of *Flt3l*, are also predicted to be differentially activated between CD11b^{low} and DP

mNK cells. Altogether, these results suggest that Flt3l may regulate mNK cell functional maturation specifically at the CD11b^{low} stage.

Myb is a transcription factor which has been shown to negatively regulate the terminal stages of functional maturation (3, 8). Our linkage analysis uncovers Myb as a candidate gene located within Nkfm4.1 linked to the DP mNK cells. Moreover, by taking advantage of the GEO repository, we uncovered a predicted decrease in the activity of Myb, as well as a 5.602-fold decrease in expression of the Myb gene, between the DP and CD27^{low} functional maturation stages of mNK cells in the Rag2-deficient B6 mouse. Our analysis correlates with previous findings demonstrating that the expression of Myb is lowest in the CD27^{low} subset of mNK cells (3, 8), in agreement with a role for Myb in the later stages of mNK cell functional maturation. Tgfbr1, which encodes for a TGF- β receptor, is a candidate gene located within the Nkfm6 locus linked to the most mature CD27^{low} mNK cell subset. Indeed, in the absence of TGF- β receptor signaling, the mNK cell population is comprised of a higher proportion of CD27^{low} mNK cells, which is thought to be a result of the effect of TGF- β on T-bet and GATA-3 expression (34), both of which are involved in NK cell maturation (3, 4, 10, 12). Interestingly, our linkage analysis also revealed Tbx21, which encodes for T-bet, as a candidate gene located within the Nkfm3.2 locus on chromosome 11 that, like Nkfm6, is linked to the CD27^{low} mNK cell subset. These findings correlate with those of Chiossone and colleagues (3) who found Tbx21 expression to be highest in the CD27^{low} mNK cell subset. T-bet is a transcription factor crucial for multiple stages of NK cell development including the developmental stability of iNK cells as well as the functional maturation of mNK cells, where T-bet-deficient mNK cells do not mature to the final CD27^{low} stage (10, 12). In addition to Tgfbr1, Mbd2, which is located within Nkfm1.2 linked to the CD11b^{low} mNK cell subset, is yet another candidate gene revealed by our

linkage analysis that is known to regulate T-bet expression (47). Altogether, these findings support an important role for the TGF- β signaling pathway and Tbx21 in the regulation of the CD27^{low} mNK cell subset during functional maturation.

Additionally, our analysis provides compelling evidence that *Trp53* is an important regulator of NK cell maturation. *Trp53*, also known as tumour suppressor p53, is crucial in preserving genomic stability following cellular damage or stress, including DNA damage, hypoxia, and oncogene activation, such that p53 provides protection from tumour development (48). More specifically, p53 functions as a transcription factor to modulate the expression of various genes that regulate the major defences against tumour growth, including cell cycle arrest, apoptosis, maintenance of genetic integrity, inhibition of angiogenesis and cellular senescence (48). Our analysis revealed *Trp53* as a candidate gene located within *Nkfm3.1*, which is also associated with the CD11b^{low} mNK cell subset. Here, we find that p53 expression is lower in NOD than in B6 mice. Moreover, we demonstrate that *Trp53* is indeed associated with the regulation of NK cell functional maturation, where *Trp53*-deficient mice exhibit a decrease in functional maturation of NK cells. The decrease in NK cell functional maturation is associated with heightened proliferation of CD11b^{low} mNK cells and increased apoptosis of CD27^{low} mNK cells. Interestingly, *Trp53* is the most frequently mutated gene in human cancer, with greater than half of all tumors exhibiting mutation at this locus (48). Indeed, there is growing evidence that these *Trp53* mutations can result in a loss of tumor suppressor activity as well as the acquisition of functions that contribute to the malignant progression (49). Given the role of *Trp53* as a tumour suppressor gene and its associated mutations' causative role in cancer, it is possible that patients harboring specific polymorphisms in *Trp53* may also have alterations in NK cell functional maturation and subsequent defects in tumor immunosurveillance. Hence,

investigation of the proportion of mNK cell subsets in patients harboring Trp53 polymorphisms would be of great interest. To that effect, various polymorphisms in both validated and putative Trp53 response elements, which would alter p53 binding and consequently the transcription of the given gene, have been identified in humans (50).

MicroRNAs (miRNAs) are also emerging as regulators of NK cell functional maturation. Indeed, recent work in animals lacking either global miRNAs (51, 52) or specific miRNAs, namely miR-150, miR-155 and miR-15a/16 (8, 9, 14), has highlighted miRNAs as regulators of NK cell functional maturation. During our *in silico* analysis, we uncovered multiple miRNAs as upstream regulators of differentially expressed downstream target candidate genes, where four of these miRNAs are also expressed by NK cells, namely let-7, mir-21, miR-339-5p and miR-142-3p (53). Accordingly, members of the let-7 family, namely let-7f, let-7g, and let-7a, were found to be the top three most abundant miRNAs in human NK cells (54) while the expression of miR-339-5p increases by almost threefold following IL-15 stimulation of murine NK cells (53). Furthermore, mir-21 which is the immature form of miR-21, is the most abundant miRNA expressed in both resting and activated murine NK cells (53). Based on our analysis, let-7 exhibits a predicted increase in activity during the transition from CD11b^{low} to DP mNK cells, while miR-339-5p and miR-142-3p exhibit a predicted decrease during the transition from the DP to CD27^{low} mNK cell stage. Moreover, miR-21 exhibits a predicted increase in activity during the transition from the DP to the most mature CD27^{low} mNK cell stage. Interestingly, mice deficient for either Dicer or Dcgr8, which are miRNA processing enzymes, display a reduction in both the relative expression of miR-21 in NK cells as well as the frequency of the most mature CD27^{low} mNK cell subset (51, 52). Together, these results suggest that miR-21

regulates the functional maturation of mNK cells to the final CD27^{low} stage. It will therefore be relevant to verify exactly how these miRNAs influence the functional maturation of NK cells. Interestingly, many of the candidate genes highlighted by our linkage approach are associated with cellular apoptosis. For instance, *Myb* oncogenic variants suppress apoptosis, predominantly by enhancing the expression of its direct target, the anti-apoptotic gene *Bcl2* (55, 56), while TGF β signaling induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase (57). *Trp53*, which is associated with regulating apoptosis following stress signals (48), also modulates the expression of downstream target genes that can also be linked to apoptosis. Accordingly, *Pmaip1* has been previously demonstrated to act together with *Bim* to induce apoptosis of NK cells following IL-15 withdrawal in vitro (58), suggesting that *Pmaip1* influences NK cell survival. Another candidate gene, *Flt3l*, is crucial for the development and homeostasis of DCs whose IL-15 trans-presentation plays a role in the development of CD11b^{low} mNK cells (45). As IL-15 is known to support the survival of NK cells in the peripheral lymphoid organs (59), this suggests that *Flt3l* may regulate NK cell functional maturation by promoting IL-15 trans-presentation. Lastly, Yamanaka et al. (60) recently showed that inhibition of miR-21 in a human NK cell line led to increased apoptosis associated with the upregulation of pro-apoptotic downstream targets, suggesting that miR-21 is a key regulator of NK cell survival. Altogether, these results suggest that several candidate genes may influence NK cell functional maturation via the regulation of apoptosis. Interestingly, this may be in part due to the model system exploited. Indeed, Rag-deficiency influences NK cell functional maturation and increases their rate of apoptosis (61, 62). A linkage analysis in Rag-sufficient mice would likely yield additional loci and biological pathways linked to the regulation of NK cell functional maturation. Nevertheless, we show that *Trp53*, even if revealed in a Rag-deficient setting,

clearly influences NK cell functional maturation in a Rag-sufficient setting. This suggests that, as for other traits (16, 63, 64), Rag^{-/-} mice are useful in linkage analyses to identify trait-relevant loci, biological pathways or even genes.

There are several additional genes located within the *Nkfm* loci that exhibit a known association with NK cells and thus remain likely candidate genes for the regulation of NK cell functional maturation. For instance, *Arrb2* (*Nkfm3.1*)(65), *Lgals9* (*Nkfm3.1/3.2*) (66), *Ccl3* (*Nkfm3.1/3.2*) (67) *Ccl4* (*Nkfm3.1/3.2*) (68), *Ccl5* (*Nkfm3.1/3.2*)(69), *Mpo* (*Nkfm3.1/3.2*) (70) and *Cd72* (*Nkfm6*) (71) play a role in NK cell function, while *CD74* (*Nkfm1.1/1.2*) (72) has been associated with NK cell numbers. Moreover, *Arg1* (*Nkfm4.1/4.2*), has been associated with both NK cell function and number (73). Nevertheless, the role of other candidate genes that do not yet have any known association to NK cells will need to be further explored.

In conclusion, maintenance of a pool of mNK cells with optimal effector function is essential for host defense against both pathogens and cancerous tumor formation, where each mNK cell subset, namely DN, CD11b^{low}, DP and CD27^{low} mNK cells, exhibits a unique combination of phenotype and effector function. This study brings to light six novel loci associated with a multi-checkpoint block in the functional maturation of mNK cells, where in silico analyses further delimit the list of potential candidate genes associated with this phenotype. Importantly, our analysis not only uncovered novel candidate genes, but also highlighted genes that are known to influence NK cell maturation and positioned their role across the specific NK cell functional maturation steps. In the future, it will be relevant to verify the impact of the candidate genes in additional mouse strains. Here, we also validate *Trp53* as a gene regulating the mNK cell functional maturation as *Trp53*^{-/-} mice fail to maintain normal mNK cell subset proportions. Given the causative role of *Trp53* mutations in cancer as well as

the identification of polymorphisms within the p53 response elements, it will be of great interest to verify whether these patients exhibit any alterations in NK cell functional maturation, which may lead to subsequent defects in tumor immunosurveillance. We speculate that two populations would be particularly informative in this regard: i) elephants, which have 20 copies of *TRP53* and a low incidence of cancer (74), and ii) patients with Li-Fraumeni syndrome, most of which have a germline *TRP53* mutation and a highly penetrant familial cancer syndrome (75). Genes identified herein may eventually serve as molecular targets to permit the modulation of mNK cell functional maturation, more specifically the alteration of the frequency of a given mNK cell subset, to potentiate both tumour and viral clearance.

Acknowledgements

The authors would like to thank Marie-Josée Guyon, Fany De Wilde and the animal house staff for curating the mouse colonies and the center of Applied Genomics at Sick Kids Hospital in Toronto for SNP genotyping. We also wish to thank Dr. Tarik Moröy for providing us with some Trp53-deficient mice, Martine Dupuis at the core flow cytometry facility at Maisonneuve-Rosemont Hospital for her assistance as well as Drs Nathalie Labrecque and Heather Melichar for critical review of the manuscript. This work benefited from data assembled by the Walzer Lab (3).

Correspondance address:

Sylvie Lesage
Research Center
Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 l'Assomption Blvd
Montréal, Québec
Canada, H1T 2M4

Authors' contributions

RC, CSP, FGD, ANP, DG, ED, CP and SL designed the research; RC, AP, LG, VMD, ANP and FGD performed the research; RC, CSP, VMD, DG, EEH and SL analyzed the data; RC, CSP, VMD and EEH prepared the figures; EEH and SL wrote the paper; all authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Huntington, N. D., C. A. J. Vosshenrich, and J. P. Di Santo. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology* 7: 703-714.
2. Fathman, J. W., D. Bhattacharya, M. A. Inlay, J. Seita, H. Karsunky, and I. L. Weissman. 2011. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* 118: 5439-5447.
3. Chiossone, L., J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, and T. Walzer. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113: 5488-5496.
4. Samson, S. I., O. Richard, M. Tavian, T. Ranson, C. A. J. Vosshenrich, F. Colucci, J. Buer, F. Grosveld, I. Godin, and J. P. Di Santo. 2003. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19: 701-711.
5. Boos, M. D., Y. Yokota, G. Eberl, and B. L. Kee. 2007. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med* 204: 1119-1130.
6. Gascoyne, D. M., E. Long, H. Veiga-Fernandes, J. de Boer, O. Williams, B. Seddon, M. Coles, D. Kioussis, and H. J. Brady. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol* 10: 1118-1124.
7. Kamizono, S., G. S. Duncan, M. G. Seidel, A. Morimoto, K. Hamada, G. Grosveld, K. Akashi, E. F. Lind, J. P. Haight, P. S. Ohashi, A. T. Look, and T. W. Mak. 2009. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med* 206: 2977-2986.

8. Bezman, N. A., T. Chakraborty, T. Bender, and L. L. Lanier. 2011. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *Journal of Experimental Medicine* 208: 2717-2731.
9. Sullivan, R. P., J. W. Leong, S. E. Schneider, A. R. Ireland, M. M. Berrien-Elliott, A. Singh, T. Schappe, B. A. Jewell, V. Sexl, and T. A. Fehniger. 2015. MicroRNA-15/16 Antagonizes Myb To Control NK Cell Maturation. *J Immunol* 195: 2806-2817.
10. Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2012. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 36: 55-67.
11. Narni-Mancinelli, E., B. N. Jaeger, C. Bernat, A. Fenis, S. Kung, A. De Gassart, S. Mahmood, M. Gut, S. C. Heath, J. Estellé, E. Bertosio, F. Vely, L. N. Gastinel, B. Beutler, B. Malissen, M. Malissen, I. G. Gut, E. Vivier, and S. Ugolini. 2012. Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* 335: 344-348.
12. Robbins, S. H., M. S. Tessmer, L. Van Kaer, and L. Brossay. 2005. Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation. *European journal of immunology* 35: 757-765.
13. van Helden, M. J., S. Goossens, C. Daussy, A. L. Mathieu, F. Faure, A. Marcais, N. Vandamme, N. Farla, K. Mayol, S. Viel, S. Degouve, E. Debien, E. Seuntjens, A. Conidi, J. Chaix, P. Mangeot, S. de Bernard, L. Buffat, J. J. Haigh, D. Huylebroeck, B. N. Lambrecht, G. Berx, and T. Walzer. 2015. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J Exp Med* 212: 2015-2025.

14. Zawislak, C. L., A. M. Beaulieu, G. B. Loeb, J. Karo, D. Canner, N. A. Bezman, L. L. Lanier, A. Y. Rudensky, and J. C. Sun. 2013. Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 6967-6972.
15. Luevano, M., A. Madrigal, and A. Saudemont. 2012. Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Frontiers in immunology* 3: 319.
16. Pelletier, A. N., L. Guilbault, F. Guimont-Desrochers, E. E. Hillhouse, and S. Lesage. 2016. NK Cell Proportion and Number Are Influenced by Genetic Loci on Chromosomes 8, 9, and 17. *J Immunol* 196: 2627-2636.
17. Villunger, A., E. M. Michalak, L. Coultas, F. Mullauer, G. Bock, M. J. Ausserlechner, J. M. Adams, and A. Strasser. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302: 1036-1038.
18. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889-890.
19. Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, T. Toyota, R. Suzuki, K. Itoh, and K. Kumagai. 1983. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32: 247-253.
20. Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, and D. L. Greiner. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 154: 180-191.

21. Poulton, L. D., M. J. Smyth, C. G. Hawke, P. Silveira, D. Shepherd, O. V. Naidenko, D. I. Godfrey, and A. G. Baxter. 2001. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *International immunology* 13: 887-896.
22. Carnaud, C., J. Gombert, O. Donnars, H. Garchon, and A. Herbelin. 2001. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 166: 2404-2411.
23. Johansson, S. E., H. Hall, J. Björklund, and P. Höglund. 2004. Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-18 in vitro. *International immunology* 16: 1-11.
24. Suwanai, H., M. A. Wilcox, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 9305-9310.
25. Simonetta, F., A. Pradier, and E. Roosnek. 2016. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Frontiers in immunology* 7: 241.
26. Shultz, L. D., P. A. Lang, S. W. Christianson, B. Gott, B. Lyons, S. Umeda, E. Leiter, R. Hesselton, E. J. Wagar, J. H. Leif, O. Kollet, T. Lapidot, and D. L. Greiner. 2000. NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J Immunol* 164: 2496-2507.
27. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68: 869-877.

28. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855-867.
29. Pelletier, A.-N., F. Guimont-Desrochers, M. P. Ashton, T. C. Brodnicki, and S. Lesage. 2012. The Size of the Plasmacytoid Dendritic Cell Compartment Is a Multigenic Trait Dominated by a Locus on Mouse Chromosome 7. *The Journal of Immunology*.
30. Pelletier, A.-N., and S. Lesage. 2013. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *Journal of autoimmunity*.
31. Carlborg, O., and C. S. Haley. 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat Rev Genet* 5: 618-625.
32. Lagna, G., A. Hata, A. Hemmati-Brivanlou, and J. Massague. 1996. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832-836.
33. Kavsak, P., R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen, and J. L. Wrana. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Molecular cell* 6: 1365-1375.
34. Marcoe, J. P., J. R. Lim, K. L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A. L. McCubbrey, A. R. Farr, S. M. Vidal, and Y. Laouar. 2012. TGF- β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nature immunology* 13: 843-850.
35. Kornfeld, J. W., F. Grebien, M. A. Kerényi, K. Friedbichler, B. Kovacic, B. Zankl, A. Hoelbl, H. Nivarti, H. Beug, V. Sexl, M. Muller, L. Kenner, E. W. Mullner, F. Gouilleux,

- and R. Moriggl. 2008. The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13: 6237-6254.
36. Sallmyr, A., J. Fan, K. Datta, K. T. Kim, D. Grosu, P. Shapiro, D. Small, and F. Rassool. 2008. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 111: 3173-3182.
 37. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503-510.
 38. Walzer, T., M. Dalod, E. Vivier, and L. Zitvogel. 2005. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert opinion on biological therapy* 5 Suppl 1: S49-59.
 39. Sitnicka, E., D. Bryder, K. Theilgaard-Mönch, N. Buza-Vidas, J. Adolfsson, and S. E. W. Jacobsen. 2002. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 17: 463-472.
 40. Sullivan, R. P., J. W. Leong, and T. A. Fehniger. 2013. MicroRNA regulation of natural killer cells. *Frontiers in immunology* 4: 44.
 41. Nazarov, P. V., S. E. Reinsbach, A. Muller, N. Nicot, D. Philippidou, L. Vallar, and S. Kreis. 2013. Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function. *Nucleic Acids Research* 41: 2817-2831.
 42. Brady, C. A., and L. D. Attardi. 2010. p53 at a glance. *J Cell Sci* 123: 2527-2532.
 43. Riley, T., E. Sontag, P. Chen, and A. Levine. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9: 402-412.

44. Bandele, O. J., X. Wang, M. R. Campbell, G. S. Pittman, and D. A. Bell. 2011. Human single-nucleotide polymorphisms alter p53 sequence-specific binding at gene regulatory elements. *Nucleic Acids Res* 39: 178-189.
45. Castillo, E. F., S. W. Stonier, L. Frasca, and K. S. Schluns. 2009. Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *The Journal of Immunology* 183: 4948-4956.
46. Guimond, M., A. G. Freud, H. C. Mao, J. Yu, B. W. Blaser, J. W. Leong, J. B. Vandeusen, A. Dorrance, J. Zhang, C. L. Mackall, and M. A. Caligiuri. 2010. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *The Journal of Immunology* 184: 2769-2775.
47. Zhong, J., Q. Yu, P. Yang, X. Rao, L. He, J. Fang, Y. Tu, Z. Zhang, Q. Lai, S. Zhang, M. Kuczma, P. Kraj, J. F. Xu, F. Gong, J. Zhou, L. Wen, D. L. Eizirik, J. Du, W. Wang, and C. Y. Wang. 2014. MBD2 regulates TH17 differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the homeostasis of T-bet/Hlx axis. *Journal of autoimmunity* 53: 95-104.
48. Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310.
49. Muller, P. A., and K. H. Vousden. 2014. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer cell* 25: 304-317.
50. Tomso, D. J., A. Inga, D. Menendez, G. S. Pittman, M. R. Campbell, F. Storici, D. A. Bell, and M. A. Resnick. 2005. Functionally distinct polymorphic sequences in the human genome that are targets for p53 transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 6431-6436.

51. Bezman, N. A., E. Cedars, D. F. Steiner, R. Blelloch, D. G. T. Hesslein, and L. L. Lanier. 2010. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *The Journal of Immunology* 185: 3835-3846.
52. Sullivan, R. P., J. W. Leong, S. E. Schneider, C. R. Keppel, E. Germino, A. R. French, and T. A. Fehniger. 2012. MicroRNA-deficient NK cells exhibit decreased survival but enhanced function. *The Journal of Immunology* 188: 3019-3030.
53. Fehniger, T. A., T. Wylie, E. Germino, J. W. Leong, V. J. Magrini, S. Koul, C. R. Keppel, S. E. Schneider, D. C. Koboldt, R. P. Sullivan, M. E. Heinz, S. D. Crosby, R. Nagarajan, G. Ramsingh, D. C. Link, T. J. Ley, and E. R. Mardis. 2010. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res* 20: 1590-1604.
54. Liu, X., Y. Wang, Q. Sun, J. Yan, J. Huang, S. Zhu, and J. Yu. 2012. Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunology letters* 143: 208-217.
55. Taylor, D., P. Badiani, and K. Weston. 1996. A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. *Genes & development* 10: 2732-2744.
56. Salomoni, P., D. Perrotti, R. Martinez, C. Franceschi, and B. Calabretta. 1997. Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-Myb is associated with induction of BCL-2 expression and Myb-dependent regulation of bcl-2 promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3296-3301.
57. Jang, C. W., C. H. Chen, C. C. Chen, J. Y. Chen, Y. H. Su, and R. H. Chen. 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature cell biology* 4: 51-58.

58. Huntington, N. D., H. Puthalakath, P. Gunn, E. Naik, E. M. Michalak, M. J. Smyth, H. Tabarias, M. A. Degli-Esposti, G. Dewson, S. N. Willis, N. Motoyama, D. C. Huang, S. L. Nutt, D. M. Tarlinton, and A. Strasser. 2007. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nature immunology* 8: 856-863.
59. Ranson, T., C. A. Vosshenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Muller, and J. P. Di Santo. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 101: 4887-4893.
60. Yamanaka, Y., H. Tagawa, N. Takahashi, A. Watanabe, Y. M. Guo, K. Iwamoto, J. Yamashita, H. Saitoh, Y. Kameoka, N. Shimizu, R. Ichinohasama, and K. Sawada. 2009. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114: 3265-3275.
61. Karo, J. M., D. G. Schatz, and J. C. Sun. 2014. The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells. *Cell* 159: 94-107.
62. Pilbeam, K., P. Basse, L. Brossay, N. Vujanovic, R. Gerstein, A. N. Vallejo, and L. Borghesi. 2008. The ontogeny and fate of NK cells marked by permanent DNA rearrangements. *J Immunol* 180: 1432-1441.
63. Pelletier, A. N., and S. Lesage. 2013. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J Autoimmun* 43: 70-77.
64. Pelletier, A. N., F. Guimont-Desrochers, M. P. Ashton, T. C. Brodnicki, and S. Lesage. 2012. The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7. *J Immunol* 188: 5561-5570.

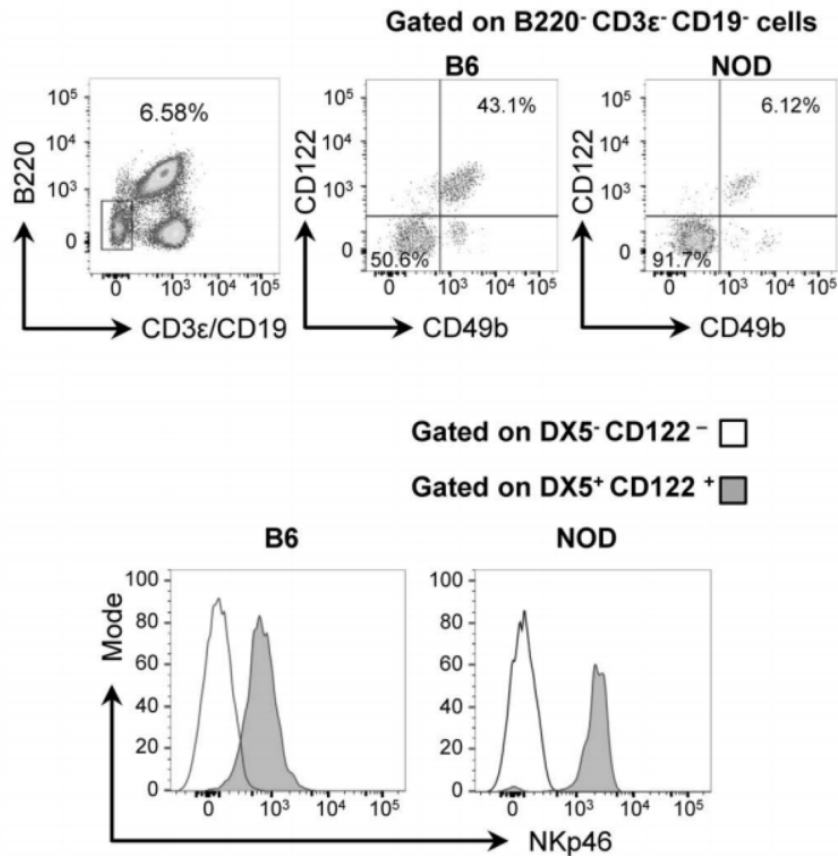
65. Yu, M. C., L. L. Su, L. Zou, Y. Liu, N. Wu, L. Kong, Z. H. Zhuang, L. Sun, H. P. Liu, J. H. Hu, D. Li, J. L. Strominger, J. W. Zang, G. Pei, and B. X. Ge. 2008. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nature immunology* 9: 898-907.
66. Golden-Mason, L., R. H. McMahan, M. Strong, R. Reisdorph, S. Mahaffey, B. E. Palmer, L. Cheng, C. Kulesza, M. Hirashima, T. Niki, and H. R. Rosen. 2013. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice. *Journal of virology* 87: 4835-4845.
67. Bernardini, G., G. Sciume, D. Bosisio, S. Morrone, S. Sozzani, and A. Santoni. 2008. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood* 111: 3626-3634.
68. Maghazachi, A. A. 2010. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Current topics in microbiology and immunology* 341: 37-58.
69. Maghazachi, A. A., A. Al-Aoukaty, and T. J. Schall. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56⁺ cells. *European journal of immunology* 26: 315-319.
70. Betten, A., C. Dahlgren, U. H. Mellqvist, S. Hermodsson, and K. Hellstrand. 2004. Oxygen radical-induced natural killer cell dysfunction: role of myeloperoxidase and regulation by serotonin. *Journal of leukocyte biology* 75: 1111-1115.
71. Alcón, V. L., C. Luther, D. Balce, and F. Takei. 2009. B-cell co-receptor CD72 is expressed on NK cells and inhibits IFN-gamma production but not cytotoxicity. *European journal of immunology* 39: 826-832.

72. Herrero, L. J., K. C. Sheng, P. Jian, A. Taylor, Z. Her, B. L. Herring, A. Chow, Y. S. Leo, M. J. Hickey, E. F. Morand, L. F. Ng, R. Bucala, and S. Mahalingam. 2013. Macrophage migration inhibitory factor receptor CD74 mediates alphavirus-induced arthritis and myositis in murine models of alphavirus infection. *Arthritis and rheumatism* 65: 2724-2736.
73. Oberlies, J., C. Watzl, T. Giese, C. Luckner, P. Kropf, I. Muller, A. D. Ho, and M. Munder. 2009. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *Journal of immunology* 182: 5259-5267.
74. Abegglen, L. M., A. F. Caulin, A. Chan, K. Lee, R. Robinson, M. S. Campbell, W. K. Kiso, D. L. Schmitt, P. J. Waddell, S. Bhaskara, S. T. Jensen, C. C. Maley, and J. D. Schiffman. 2015. Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA : the journal of the American Medical Association*: 1-11.
75. Merino, D., and D. Malkin. 2014. p53 and hereditary cancer. *Sub-cellular biochemistry* 85: 1-16.

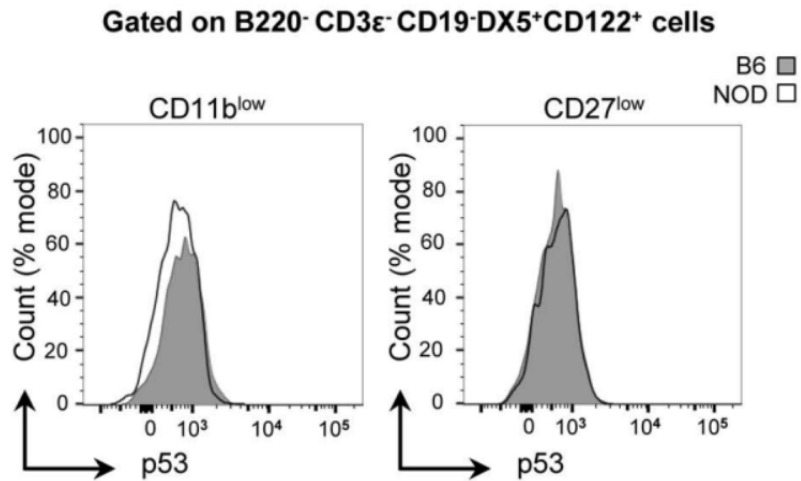
Footnotes

This work was supported by research funds from the Cancer Research Society to SL (#20379) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#06531). S.L., holds a Senior scholarship from the Fonds de recherche-Santé Québec, RC holds an studentship from the Fonds de recherche-Santé Québec and L.G. and V.M.D. both holds a scholarship from Diabète Québec and from l'Université de Montréal.

Abbreviations: mature NK, mNK; immature NK, iNK; NK cell precursor, NKP; double negative, DN; double positive, DP; microRNAs, miRNAs; C57BL/6, B6; single nucleotide polymorphism, SNP; gene ontology, GO; NK functional maturation, Nkfm; common lymphoid progenitors, CLP; differentially expressed genes, DEGs; upstream regulator analysis, UPA; dendritic cells, DCs; logarithm of odds, LOD; Ingenuity-based pathway analysis, IPA; mean fluorescence intensity, MFI.



Supplementary figure 2.1. Gating strategy for mNK cells. Top, mNK cells are selected based on the lack of T and B cell markers, namely CD3-CD19-B220⁻ expression, and positive expression of both CD122 and CD49b. Bottom, NKp46 expression is shown for B6 and NOD mice on DX5⁺CD122⁺ cells (filled histogram) compared to DX5⁻CD122⁻ cells (full line).



Supplementary figure 2.2. p53 expression in B6 and NOD cell subsets. To compare the p53 MFI, single cell suspension from the spleens of B6 and NOD mice were mixed a 1:1 ratio prior to staining. CD45.1 was used to resolve NOD from B6 cells. Similar results were obtained when CD45.2 was used to positively gate on B6 cells (not shown). mNK cells are selected based on the lack of T and B cell markers, namely CD3-CD19-B220- expression and positive expression of both CD122 and CD49b. Expression of p53 on CD11b^{low} and CD27^{low} mNK cells subsets amongst total mNK cells is shown for B6 (filled) and NOD (open) mice. Note that p53 is only differentially expressed in the early stages of NK cell functional maturation, as shown in Figure 2.8a.

Supplementary Table 2.1. Genes found within the *Nkfm* loci. (Excel file hyperlink):
http://www.jimmunol.org/highwire/filestream/345667/field_highwire_adjunct_files/1/JI_1600789_Supplemental_Table_1.xlsx

Supplementary Table 2.2. Differentially expressed genes found within the loci of interest (CD11b^{lo} → DP and DP → CD11b^{hi})

| | Chr | Position (bp) | Gene name | Gene symbol | Fold change CD11b-low/DP | Fold change DP/CD27-low |
|---------|-----|---------------|---|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| Nkfm1.2 | 18 | 66618258 | phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | Pmaip1 | 0.521843595 | |
| Nkfm2 | 7 | 52778286 | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A | Ppp1r15a | 0.557356096 | |
| Nkfm2 | 7 | 52380928 | ribosomal protein L13A | Rpl3l /// Rpl13a | 0.572984222 | |
| Nkfm2 | 7 | 53173393 | epithelial membrane protein 3 | Emp3 | 0.57607458 | |
| Nkfm2 | 7 | 52713314 | ferritin light chain 1 | Ftl1 | 0.650423215 | |
| Nkfm2 | 7 | 72441051 | tight junction protein 1 | Tjp1 | 0.652148191 | |
| Nkfm2 | 7 | 81420305 | solute carrier organic anion transporter family, member 3a1 | Slc3a1 | 1.572195478 | |
| Nkfm2 | 7 | 51052947 | kallikrein related-peptidase 8 | Klk8 | 1.662871888 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 83476086 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | Ccl4 | 0.571087914 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 83461346 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | Ccl3 | 0.57750424 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 70428385 | cholinergic receptor, nicotinic, epsilon polypeptide | Chrne | 0.598328859 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 69496079 | CDNA sequence BC096441 | BC096441 /// Tnfrf13 | 0.603897809 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 74196858 | RAP1 GTPase activating protein 2 | Rap1gap2 | 0.611756205 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 70465352 | profilin 1 | Pfn1 | 0.632030127 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 69477715 | CD68 antigen | Cd68 | 0.647561116 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 78776476 | lectin, galactose binding, soluble 9 | Lgals9 | 0.657953337 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 74978067 | hypermethylated in cancer 1 | Hic1 | 1.534884198 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 68859149 | aurora kinase B | Aurkb | 1.551483168 | |
| Nkfm3.1 | 11 | 75832696 | family with sequence similarity 101, member B | Fam101b | 1.61387011 | |
| Nkfm4.1 | 10 | 24635014 | arginase, liver | Arg1 | 3.319015327 | |
| Nkfm3.2 | 11 | 100269770 | leprecan-like 4 | 1110036003RIK | | 0.406502597 |
| Nkfm3.2 | 11 | 87574043 | benzodiazepine receptor associated protein 1 | Bzrap1 | | 0.508675103 |
| Nkfm3.2 | 11 | 83476086 | chemokine (C-C motif) ligand 4 | Ccl4 | | 0.522856972 |
| Nkfm3.2 | 11 | 100277011 | FK506 binding protein 10 | Fkbp10 | | 0.525500166 |
| Nkfm3.2 | 11 | 83386421 | chemokine (C-C motif) ligand 9 | Ccl9 | | 0.542926155 |
| Nkfm3.2 | 11 | 86298159 | ring finger protein, transmembrane 1 | Rnf11 | | 0.59272114 |
| Nkfm3.2 | 11 | 83461346 | chemokine (C-C motif) ligand 3 | Ccl3 | | 0.596274882 |
| Nkfm3.2 | 11 | 74196858 | RAP1 GTPase activating protein 2 | Rap1gap2 | | 0.638465088 |
| Nkfm3.2 | 11 | 78320557 | transmembrane protein 199 | Tmem199 | | 0.655084122 |
| Nkfm3.2 | 11 | 85124746 | protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform | Ppm1d | | 0.659813551 |

| | | | | | |
|---------|----|-----------|--|---------------|--------------|
| Nkfm3.2 | 11 | 102013860 | transmembrane protein 101 | Tmem101 | 0.660865293 |
| Nkfm3.2 | 11 | 102210138 | solute carrier family 4 (anion exchanger), member 1 | Slc4a1 | 0.662563632 |
| Nkfm3.2 | 11 | 105945927 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase3 | Map3k3 | 0.663132229 |
| Nkfm3.2 | 11 | 82988688 | schlafen 4 | Slfm4 | 1.536800331 |
| Nkfm3.2 | 11 | 93857405 | sperm associated antigen 9 | Spag9 | 1.5501718 |
| Nkfm3.2 | 11 | 74711573 | TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (yeast) | Tsr1 | 1.614154112 |
| Nkfm3.2 | 11 | 98854257 | topoisomerase (DNA) II alpha | Top2a | 1.618176081 |
| Nkfm3.2 | 11 | 87607083 | myeloperoxidase | Mpo | 1.630989215 |
| Nkfm3.2 | 11 | 78115031 | sperm associated antigen 5 | Spag5 | 1.667034438 |
| Nkfm3.2 | 11 | 102766843 | kinesin family member 18B | Kif18b | 1.929704001 |
| Nkfm3.2 | 11 | 98769115 | cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae) | Cdc6 | 2.022008856 |
| Nkfm4.2 | 10 | 43298975 | CD24a antigen | Cd24a | 0.598029737 |
| Nkfm4.2 | 10 | 40907978 | FIG4 homolog (S. cerevisiae) | Fig4 | 0.608060894 |
| Nkfm4.2 | 10 | 33871200 | dermatan sulfate epimerase | Dse | 0.617085201 |
| Nkfm4.2 | 10 | 21601990 | serum/glucocorticoid regulated kinase 1 | Sgk1 | 0.632801724 |
| Nkfm4.2 | 10 | 43244927 | RIKEN cDNA 1700021F05 gene | 1700021F05RIK | 0.643977994 |
| Nkfm4.2 | 10 | 25994274 | [(3)mbt-like 3 (Drosophila) | L3mbt3 | 0.65940999 |
| Nkfm4.2 | 10 | 39332740 | TRAF3 interacting protein 2 | Traf3ip2 | 1.740914811 |
| Nkfm4.2 | 10 | 20844736 | myeloblastosis oncogene | Mvb | 5.601811055 |
| Nkfm5 | 2 | 44839154 | zinc finger E-box binding homeobox 2 | Zeb2 | 0.343668396 |
| Nkfm5 | 2 | 36085946 | prostaglandin-endoperoxide synthase 1 | Pgts1 | 0.47279393 |
| Nkfm5 | 2 | 34026977 | pre B cell leukemia homeobox 3 | Pbx3 | 0.617666601 |
| Nkfm5 | 2 | 37205594 | phosducin-like | Pdcl | 0.639626748 |
| Nkfm5 | 2 | 37281020 | zinc finger and BTB domain containing 6 | Zbtb6 | 0.66532855 |
| Nkfm5 | 2 | 59690421 | WD repeat, SAM and U-box domain containing 1 | Wdsusb1 | 0.666608365 |
| Nkfm5 | 2 | 34797270 | TNF receptor-associated factor 1 | Traf1 | 1.596772303 |
| Nkfm5 | 2 | 58998907 | plakophilin 4 | Pkpf4 | 2.472663494 |
| Nkfm6 | 4 | 43045286 | RIKEN cDNA B230312A22 gene | B230312A22RIK | 0.564303352 |
| Nkfm6 | 4 | 46406861 | hemogen | Hemgn | 1.583561237 |
| Nkfm6 | 4 | 43888402 | reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs | Reck | 1.6012221915 |
| Nkfm6 | 4 | 44313748 | maternal embryonic leucine zipper kinase | Melk | 1.70770687 |
| Nkfm6 | 4 | 32330708 | RIKEN cDNA D130062I21 gene | D130062I21RIK | 1.819814957 |

CHAPITRE 3 :

Les cellules NK de la souris NOD exhibent un défaut fonctionnel tout au long de leur processus de maturation.

Victor Mullins-Dansereau^{1,2}, Geneviève Chabot-Roy, Sylvie Lesage^{1,2}

¹Departement de Microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal

²Departement d'Immunologie-Oncologie, Hôpital Maisonneuve-Rosemont

3.1 Préface

Ce chapitre présente les expériences et les résultats que j'ai générés et analysés durant une partie de ma maîtrise pour faire suite à l'article publié dans *Journal of Immunology* où nous avons montré un défaut de maturation fonctionnelle chez les cellules NK de la souris NOD [148]. Les données ci-dessous seront incluses dans un article en préparation dans lequel j'y figurerai à titre de premier auteur.

3.2 Résumé

Les cellules NK constituent une population de cellules lymphoïdes innées jouant un rôle important dans l'immunosurveillance antitumorale et la clairance virale. Grâce à leurs fonctions effectrices caractérisées par la sécrétion de granules cytotoxiques, de cytokines et de ligands de mort, ces cellules induisent rapidement la lyse des cellules cibles. Il est maintenant bien établi que les cellules NK provenant de la lignée murine NOD prédisposée au diabète auto-immun exhibent de nombreux défauts fonctionnels. Récemment, il a été montré que les cellules NK acquièrent leurs fonctions de manière séquentielles au travers d'un processus de maturation fonctionnelle en 4 étapes identifiées par l'expression de CD27 et de CD11b. Des travaux précédemment effectués dans le laboratoire ont démontré que les cellules NK de la lignée NOD ont ce processus grandement impacté et sont fonctionnellement moins matures que leurs homologues de la lignée WT B6. Dans ce présent projet, nous essayons d'élucider l'impact de ce défaut de maturation observé chez les cellules NK de la NOD sur leurs fonctions. Avec des analyses de cytométrie en flux, nous avons tout d'abord comparé le motif d'expression d'effecteurs clés des cellules NK ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ et granzyme B) au cours des 4 étapes de maturation. Les résultats obtenus révèlent un dysfonctionnement clair des cellules NK de la

lignée NOD comparées à celles de la lignée B6. D'autres analyses effectuées sur le récepteur d'activation NKG2D ont aussi révélé que, malgré le fait que son expression ne varie pas au cours de la maturation fonctionnelle, les cellules NK de la lignée NOD sont incapables de l'induire en contexte pro-inflammatoire (Poly I:C). Ultimement, cette étude est la première à élucider de manière exhaustive les différences fonctionnelles qui existent entre les cellules NK des lignées B6 et NOD et comment ces 4 étapes de maturation influencent la production de leurs effecteurs cytotoxiques.

Mots clés : cellules NK, souris B6, souris NOD, maturation fonctionnelle, effecteurs cytotoxiques.

3.3 Introduction

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes innées qui, grâce à leur haut potentiel cytotoxique, participent activement à l'immunosurveillance antivirale [149] et antitumorale [120]. À l'activation, les cellules NK produisent rapidement de grandes quantités de cytokines inflammatoires telles que l'IFN γ et le TNF α qui induisent le recrutement d'autres populations immunitaires au site ciblé. De plus, celles-ci peuvent induire directement la lyse des cellules cibles par leur expression et l'exocytose de granules cytotoxiques (granzymes), par l'expression à leur surface de ligands de mort ou par ADCC via la reconnaissance d'immunoglobulines [82].

Les cellules NK sont générées à partir des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) de la moelle osseuse. Une fois différenciées en pré-précurseurs (pré-NKP) [22], puis précurseurs (NKP) [150] et finalement en cellules iNK, celles-ci émigrent hors de la moelle osseuse pour terminer leur maturation en cellules mNK dans les tissus périphériques comme la rate ou les ganglions [59, 151]. Les cellules mNK entreprennent alors un dernier processus de maturation – la maturation fonctionnelle – au cours duquel elles acquièrent de manière séquentielle les fonctions décrites précédemment [59, 60, 62]. Cette maturation fonctionnelle a été scindée par le groupe de Chiossone et al. en quatre étapes caractérisées par l'expression de la molécule de costimulation CD27 et de l'intégrine CD11b : DN (CD27^{lo}CD11b^{lo}) \rightarrow CD27 (CD27^{hi}CD11b^{lo}) \rightarrow DP (CD27^{hi}CD11b^{hi}) \rightarrow CD11b (CD27^{lo}CD11b^{hi}). Le groupe a aussi décrit que les cellules NK présentes dans chacun des stades ont des fonctions différentes. Ainsi, celles comprises dans les stades les moins fonctionnellement matures (DN et CD27) sont très peu cytotoxiques, mais présentent un haut potentiel de production de cytokines et prolifératif. À contrario, les cellules NK des derniers stades (DP et CD11b), qui présentent la majorité de la population des cellules

NK en périphérie, sont quant à elle hautement cytotoxiques, mais produisent peu de cytokines et sont peu prolifératives [61].

En plus de sa prédisposition au T1D [131, 132], il est connu depuis les 30 dernières années que la souris NOD présente de profonds défauts fonctionnels dans sa population de cellules NK [68, 137-139, 147]. Une étude précédemment effectuée dans le laboratoire s'est d'ailleurs intéressée aux causes de ce défaut de maturation (voir chapitre 2). Dans cette étude nous avons pu observer que les cellules NK de la NOD présentent un défaut de maturation fonctionnelle caractérisé par une accumulation des cellules NK dans les stades les moins matures au détriment des stades les plus fonctionnels et donc plus cytotoxiques. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans ce défaut de maturation, nous avons réalisé des études de liaisons génétiques qui ont révélé l'implication de la protéine antitumorale p53, par ailleurs diminuée dans les cellules NK de la NOD. Au final, ce bloc de maturation fonctionnelle observé chez la NOD a pu être en partie récapitulé dans un modèle de souris déficiente en p53, validant ainsi son implication dans le processus [152]. Ultiment, nous avons suggéré que ce défaut de maturation fonctionnelle chez la NOD empêche la génération de cellules NK adéquatement cytotoxiques, expliquant ainsi les défauts fonctionnels observés dans la population de cellules NK totale de cette lignée.

Pour faire suite à cet article, nous avons émis l'hypothèse qu'en plus de ce défaut de maturation fonctionnelle, les cellules NK de la NOD présentent aussi un défaut d'acquisition de leur fonction effectrice. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons étudié par cytométrie en flux le potentiel des cellules NK des lignées B6 et NOD à produire les effecteurs cytotoxiques clés IFN γ , TNF α et Granzyme B tout au long du processus de maturation fonctionnelle. Nous avons aussi comparé leur potentiel d'activation en quantifiant leur induction des récepteurs

d'activation NKG2D et DNAM-1. Finalement, nous avons tenté de comprendre par quels mécanismes sont régulées la maturation et l'acquisition fonctionnelle par la génération de chimères hématopoïétiques.

3.4 Matériels et méthodes

3.4.1 Lignées murines

Les souris de souche C57BL/6 (B6), NOD, B6.Trp53^{-/-} et B6.NOD-(D17Mit21-D17Mit10)/LtJ (B6.NODIdd1) ont été acquises chez *The Jackson Laboratory*. Elles ont par la suite été maintenues en accouplement à l'animalerie du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont. Tous les travaux présentés dans ce mémoire, à l'exception des expériences faites sur les chimères hématopoïétiques, ont été réalisés sur des souris âgées entre 8 et 12 semaines. Les modèles expérimentaux, les euthanasies et la récolte d'organe ont été effectués en accord avec les procédures établies par le comité d'éthique animalier du centre de recherche de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont.

3.4.2 Anticorps

Les anticorps couplés aux fluorochromes utilisés dans les études de cytométrie en flux ont été tous achetés de Biolegend, sauf si indiqué autrement. Dans les marquages d'effecteurs cytotoxiques, les cellules T ont été exclues par leur expression de CD3ε-BV711 (clone 17A2). Les cellules NK et leurs sous-types de maturation fonctionnelle ont été identifiés à l'aide des anticorps couplés aux fluorochromes suivants : NKp46(CD335)-BV421 (clone 29a1.4), CD11b-APC-Cy7 (clone M1/70) et CD27-PerCP-Cy5.5 (clone LG.3A10). La caractérisation

fonctionnelle des cellules NK a été effectuée avec les anticorps CD69-PE (clone H1.2F3), CD107a-FITC (clone 1D4B), Granzyme B-PE (Invitrogen, clone MGZB), TNF α -PE (clone MP6-XT22) et IFN γ -APC (clone XMG1.2). Dans les études effectuées sur les chimères hématopoïétiques, les cellules NK ont été discriminées avec les marqueurs alléliques CD45.1-PE-Cy7 (clone A20) et CD45.2-Alexa Fluor 700 (clone 104). Pour les études des récepteurs d'activation, les marqueurs NKG2D(CD314)-PE (clone CX5) et DNAM-1(CD226)-APC (clone 10E5) ont été ajoutés. Finalement, les cellules mortes ont été exclues par leur expression du colorant *fixable LIVE/DEAD Yellow* (ThermoFischer). Brièvement, alors que le colorant ne peut se fixer qu'aux groupements amines présents à la surface des cellules saines, celui-ci émettra un signal faible. À l'inverse, dans les cellules mortes ou apoptotiques qui présentent une membrane extrêmement perméable, le colorant peut aussi entrer dans le cytoplasme et ainsi interagir avec les groupes amines qui s'y trouvent, en plus de ceux présents à la surface. Ainsi, seulement les cellules mortes seront fortement positives pour ce signal LIVE/DEAD, permettant l'exclusion de celles-ci. Cette étape d'exclusion est cruciale, puisque la stimulation *ex vivo* (décrite plus bas) est hautement cytotoxique et il importe de conduire les analyses fonctionnelles de cytométrie en flux uniquement sur les cellules vivantes.

3.4.3 Sélection positive des cellules NK par billes magnétiques

Les rates ont été prélevées et préparées dans un tampon isotonique : 10% *phosphate-buffered saline (PBS)*, 2% sérum de veau foetal (SVF) désactivé et 0,05M d'EDTA. Suite à la mise en suspension cellulaire, les rates ont été comptées par hématimètre et mises à une concentration de 2×10^7 cellules/ml. Les suspensions ont par la suite été incubées pendant 30 minutes à 4 °C avec l'anticorps panspécifique des NK CD49b couplé à de la biotine (Biolegend,

clone DX5). Après un lavage, les suspensions cellulaires ont été ajustées à 1×10^8 cellules/ml et ont été incubées pendant 15 minutes à température pièce (25 °C) avec le cocktail de sélection pour biotine à raison de 100 μ l/ml (EasySep, StemCell). Tout de suite après l'incubation, les suspensions cellulaires ont été incubées pendant 10 minutes à température pièce avec des nanobilles magnétiques à raison de 50 μ l/ml (EasySep, Stemcell). Encore une fois sans lavage, les tubes contenant les suspensions cellulaires ont été amenés à un volume de 2.5 ml par ajout de tampon isotonique et ont été mis dans des aimants, bouchon ouvert pour 5 minutes à température pièce. Après cette période, les tubes, toujours placés dans les aimants, ont été vidés par inversion en un mouvement continu. Les tubes ont été retirés des aimants et 2.5 ml de tampon isotonique a été rajouté avant de remettre les tubes dans les aimants pour une autre période de 5 minutes à température pièce. Après un deuxième lavage, les tubes ont été remis pour une dernière fois dans les aimants et vidés par inversion. À l'aboutissement de cette manœuvre, seules les cellules CD49b⁺ sont restantes dans les tubes et ont été resuspendues dans 1 ml de tampon isotonique pour être ensuite mises en plaque et comptées.

3.4.4 Stimulation *ex vivo*

Pour procéder à la quantification par cytométrie en flux des effecteurs cytotoxiques Granzyme B, TNF α et IFN γ et du marqueur de dégranulation CD107a, les cellules NK enrichies par séparation magnétique ont d'abord été stimulées en plaque avec du phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et de l'ionomycine pendant 6h. Toutes les cellules NK obtenues de l'enrichissement ont été séparées puis mises en plaque 96 puits dans le nombre de puits nécessaires, en s'assurant que le nombre de cellules NK mises en plaque était similaire entre les différentes lignées. Après avoir complété le volume de chaque puits à 150 μ l avec du tampon

isotonique *et* centrifugé la plaque, le surnageant a été retiré par inversion et les cellules enrichies ont été resuspendues dans 100 μ l de RPMI (ATCC) complet (10% SVF, 1% pénicilline/streptomycine, 1% de β -mercaptoéthanol et 0.1 % d'HEPES) complétement avec 500 ng/ml d'ionomycine et 10 μ g/ml de PMA. Dans les puits utilisés pour la caractérisation de la dégranulation, 2 μ l de CD107a-FITC ont aussi été ajoutés. Les cellules ont par la suite été préincubées à 37 °C pendant 1h. Après cette période, sans lavage, 100 μ l de bréfeldine A ont été ajoutés à tous les puits pour une concentration finale de 5 μ g/ml et les cellules ont été remises en incubation à 37 °C pendant 5h. Suite à l'incubation, les cellules ont été centrifugées et lavées à 2 reprises avec du tampon isotonique contenant en plus 0,05% d'azoture de sodium (NaN_3). Puisque nous avons voulu caractériser les défauts fonctionnels des cellules NK de la lignée murine NOD, nous avons privilégié la méthode de stimulation *ex vivo* par PM/ionomycine qui contourne le besoin d'un signal via les récepteurs extracellulaires. Cette méthode nous permet donc de retirer les biais fonctionnels qui pourraient être causés par un défaut de reconnaissance d'une cible telle que la lignée cancéreuse YAC-1 qui est par ailleurs très mal reconnue et lysée par les cellules NK de la NOD.

3.4.5 Marquage extracellulaire

Les suspensions cellulaires sont préparées et marquées, puis comptées par hématimètre. Pour les marquages extracellulaires, 1 X 10⁶ cellules ou moins est déposé dans chaque puits. Les anticorps anti-souris énumérés plus haut sont déposés dans les puits contrôles et d'expériences respectifs à une concentration déterminée précédemment par titration. Les cellules sont alors mises en incubation à 4 °C pendant 30 minutes. Si nécessaire, d'autres incubations de 30 minutes peuvent être réalisées pour incuber les anticorps restants. Une fois toutes les incubations réalisées, les cellules sont lavées avec le tampon isotonique + NaN_3 deux

autres fois avant d'être resuspendues dans 100 – 150 µl de tampon isotonique + NaN₃ pour l'acquisition des données au cytomètre. Tous les échantillons furent acquis par un LSRII ou un Fortessa x-20 (BD Biosciences) puis analysés grâce au logiciel FlowJo (Tree Star).

3.4.6 Marquage intracellulaire des effecteurs cytotoxiques

Suite au marquage extracellulaire, les cellules sont resuspendues dans 100 µl de la solution de fixation/perméabilisation (Kit *Cytofix/Cytoperm*, BD Biosciences) et sont incubées à 4 °C pendant 30 minutes. Les cellules sont par la suite lavées en ajoutant aux puits 100 µl de tampon de perméabilisation (dilué 1/10 dans de l'eau distillée) (Kit *Cytofix/Cytoperm*, BD Biosciences). Les cellules sont ainsi rincées avec le tampon une autre fois. Les anticorps voulus, dilués à la bonne concentration dans le tampon de perméabilisation, sont ensuite ajoutés aux puits correspondants. Les cellules sont une nouvelle fois incubées pendant 30 minutes à 4°C. Suite à cette dernière incubation, les cellules seront rincées deux fois avec le tampon de perméabilisation puis resuspendues et mises en tubes dans 100 à 150 µl de tampon isotonique + NaN₃, prêtes à être passées en cytométrie en flux.

3.4.7 Simulation *in vivo* d'infection virale

Pour les expériences de caractérisation des récepteurs d'activation, les cellules NK sont tout d'abord activées *in vivo* par de l'acide polyinosinique-polycytidilique (Poly I:C), un agoniste du TLR-3. Le poly I:C est préalablement aliquoté et dilué dans du PBS stérile à une concentration de 200 µg/µl et entreposé à -80 °C jusqu'à utilisation. 18h avant la quantification des récepteurs d'activation par cytométrie en flux, les souris qui seront utilisées sont injectées de manière intrapéritonéale avec 200 µl de Poly I:C (200 µg) ou de PBS (pour les souris

contrôles). Suite au traitement, les souris sont sacrifiées et les rates prélevées puis marquées tel qu'indiqué plus haut.

3.4.8 Génération de chimères hématopoïétiques compétitives et non compétitives

Tout d'abord, les souris donneuses sont sacrifiées et leur moelle osseuse est extraite des tibias et fémurs par injection de RPMI complet dans l'os grâce à une seringue 27G ^{1/2}. Suite à l'extraction, la suspension est passée au travers d'un filtre 70 µm afin de retirer les débris et sera centrifugée. Une fois le surnageant retiré de manière stérile, les cellules sont resuspendues dans 5 ml de NH₄Cl afin de lyser les érythrocytes. Suite à une autre centrifugation, les cellules sont resuspendues dans 5 ml de RPMI complet et sont comptées par hématimètre. En parallèle, les souris receveuses sont préalablement injectées de manière intrapéritonéale avec 1 ml de PBS stérile avant d'être irradiées. Ces dernières sont par la suite irradiées à raison de 11Gy. Les souris irradiées sont finalement injectées par voies intraveineuses avec 2 x 10⁶ cellules. Dans le cadre de chimères hématopoïétiques compétitives, les souris receveuses seront injectées par voie intraveineuse avec 2 X 10⁶ cellules provenant de mixtes cellulaires au lieu de suspensions cellulaires uniques.

3.5 Résultats

3.5.1 L'acquisition de la fonction des cellules NK au cours de leur maturation fonctionnelle.

Chiossone et al. ont pu observer, grâce à des micropuces à ARN effectués sur la souris B6, une augmentation des ARN messager (ARNm) associés aux fonctions cytotoxiques comme

Gzmb (granzyme B) [61]. Cependant, cette caractérisation n'a jamais été validée au niveau protéique. De plus, les fonctions effectrices des cellules NK des souris B6 et NOD n'ont jamais été étudiées ni comparées entre elles au cours des quatre stades de maturation fonctionnelle. Il est établi que suite à leur activation, les cellules NK produisent rapidement d'importantes quantités de cytokines pro-inflammatoires et de granules cytotoxiques afin d'induire l'apoptose des cellules affectées telles que l'IFN γ , le TNF α et le granzyme B (GrzB). Vu l'importance que revêtent ces trois effecteurs principaux dans la fonction des cellules NK, nous avons donc tout d'abord cherché à comparer leur expression intracellulaire par cytométrie en flux entre les souris B6 et NOD. Par souci d'étudier la réponse fonctionnelle des cellules NK le plus spécifiquement possible, nous avons eu recours à un enrichissement par billes magnétiques des cellules NK de la rate de souris B6 et NOD précédant la stimulation *ex vivo* pendant 6h avec l'ionomycine et le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA).

Tel que mentionné dans l'introduction, l'incapacité des cellules NK de la NOD à cibler et lyser adéquatement des cellules cibles contrairement aux cellules de la B6 et très bien documentée depuis les trente dernières années. Puisque le GrzB est le principal effecteur cytotoxique des cellules NK, nous nous attendions donc à voir davantage de GrzB exprimée par la population totale de cellules NK provenant de la B6 comparées à celles de la NOD. Tel qu'attendu, nous avons pu observer une diminution drastique des niveaux d'expression de ce granule dans la souris NOD où seulement 10% des cellules NK l'expriment contrairement à 50% chez les cellules NK de la souris B6. Afin d'affiner cette observation, nous avons aussi étudié son expression au fil du processus de maturation. Plusieurs études s'accordent pour dire que les cellules NK les plus fonctionnellement matures sont aussi les plus cytotoxiques. Nous nous attendions donc à voir une expression accrue de GrzB dans les derniers stades du processus

de maturation fonctionnelle. Tel qu'attendu, nous avons pu voir une augmentation constante de l'expression intracellulaire de GrzB au fil de la maturation culminant au dernier stade (CD27^{lo}CD11b^{hi}). Ce profil d'expression a cependant uniquement pu être observé chez les cellules NK de la souris B6. Chez les cellules NK de la NOD, l'expression de GrzB est quant à elle restée au niveau basal (des stades les moins matures) tout au long de la maturation fonctionnelle (Fig 3.1a, p. 111) (Annexe 1 , fig supp 1 pour la stratégie de gating). Puisque la majorité de la population de cellules NK totale est composée de cellules fonctionnellement matures, il n'est pas surprenant de constater que les niveaux d'expression de GrzB dans les deux derniers stades reflètent les niveaux généraux de la population totale. Ensemble, ces résultats montrent que les défauts de cytotoxicité observés chez les cellules NK de la NOD ne sont pas simplement dus à un bloc dans leur processus de maturation fonctionnelle.

Contrairement à leur capacité cytotoxique, le potentiel de production de cytokines des cellules NK est principalement attribué aux cellules les moins fonctionnellement matures. Nous nous attendions donc à une expression de la cytokine TNF α exclusive à ces stades. Tel qu'attendu, nous avons pu observer que les cellules NK exprimant le TNF α étaient largement concentrées dans les stades les moins matures (CD27^{lo}CD11b^{lo} et CD27^{hi}CD11b^{lo}) à 10% et 20%, respectivement, contrairement à moins de 5% d'expression des cellules NK des derniers stades de la maturation fonctionnelle. Similaire à ce que nous avons observé pour l'expression de GrzB, les cellules NK totales de la NOD expriment aussi significativement moins de TNF α que la population de cellules NK de la souris B6. Cette diminution d'expression est aussi observée au cours du processus de maturation fonctionnelle où le pourcentage de cellules NK exprimant la cytokine chez la souris NOD demeure au même niveau tout au long de la maturation fonctionnelle que celui observé dans les stades les plus matures de la souris B6

(moins de 5% de cellules positives) (Fig 3.1b, p. 111). Quant à lui, le profil d'expression de l'IFN γ que nous avons obtenu est en accord avec la littérature. Effectivement, il a été montré que, contrairement à d'autres cytokines telles que le TNF α , l'expression d'IFN γ chez la souris B6 est caractéristique des stades CD11b^{hi} (les plus fonctionnellement matures) [59]. Nous avons aussi pu observer que son expression semble même être acquise au cours du processus de maturation, se rapprochant donc ainsi plus du Granzyme B que du TNF α . Cependant, en comparant son expression entre les cellules NK de la B6 et de la NOD, nous pouvons toujours apprécier un niveau moindre de la cytokine chez la souris NOD. Encore une fois, alors que le pourcentage de cellules NK positives pour l'IFN γ augmente chez la B6 au cours du processus, ce pourcentage demeure au même niveau dans la souris NOD que celui observé dans le stade le moins mature (CD27^{lo}CD11b^{lo} – 25%) et ce, dans les trois autres stades de la maturation fonctionnelle (Fig 3.1c, p. 111). Ces résultats semblent suggérer que tout comme le GrzB, les cellules NK de la NOD n'arrivent pas à induire une expression adéquate de leurs cytokines principales TNF α et IFN γ .

Finalement, nous avons aussi cherché à étudier le potentiel de dégranulation des cellules NK en caractérisant leur expression à la surface de la protéine vésiculaire CD107a. Contrairement aux résultats précédents suggérant une capacité fonctionnelle diminuée chez les NK de la souris NOD, celles-ci semblent dégranuler autant, sinon même plus que leurs homologues chez la souris B6 et ce, autant dans leur population totale que parmi les différents stades du processus de maturation fonctionnelle (Fig 3.1d, p. 111). Tous ensemble, les résultats présentés dans cette section démontrent donc que les défauts de fonctions observés dans l'ensemble de la population de cellules NK de la souris NOD ne sont pas simplement causés par

un défaut de maturation fonctionnelle, mais aussi par un défaut d'acquisition de fonctions effectrices au cours de celle-ci.

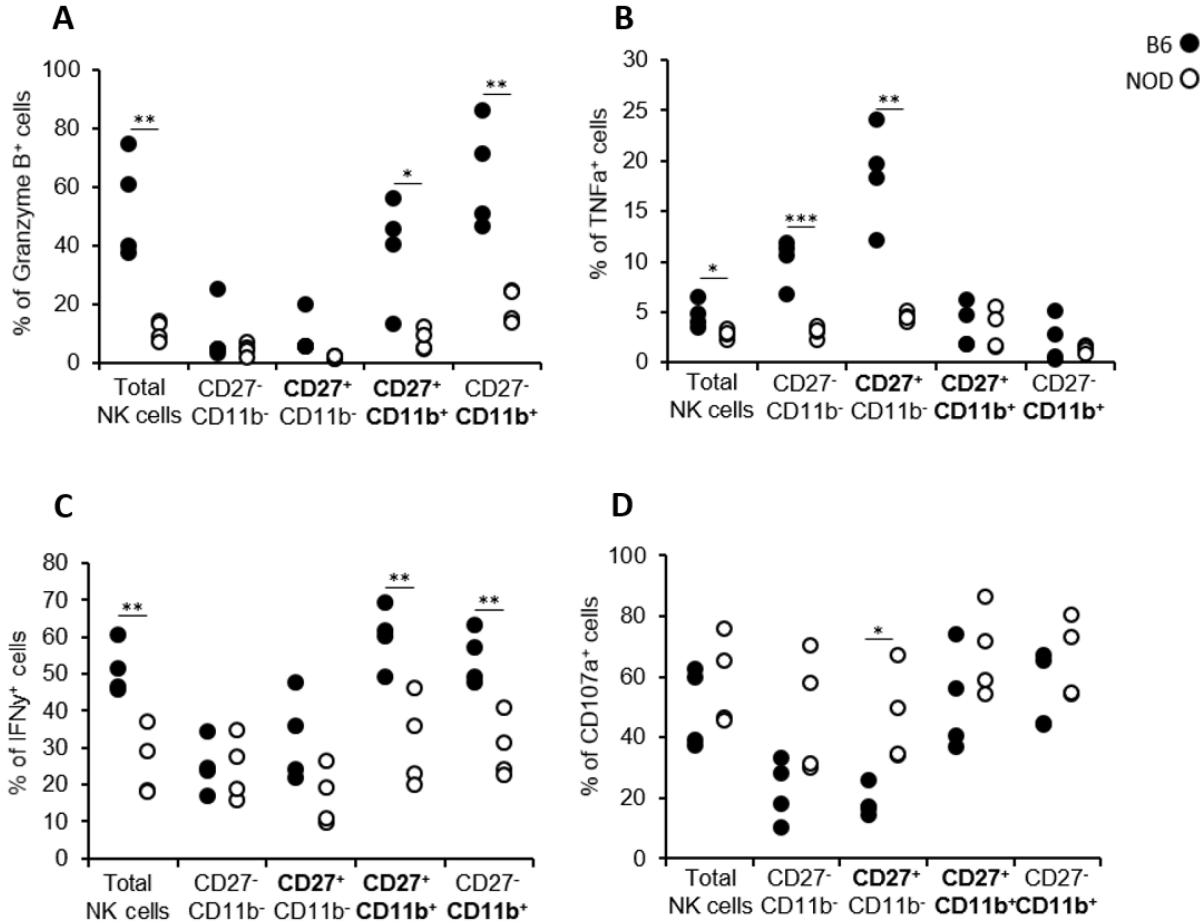


Figure 3.1. Les cellules NK de la NOD présentent des défauts dans l'expression des effecteurs GrzB, TNF α et IFN γ . Les cellules NK des rates de souris B6 et NOD furent enrichies par séparation magnétique puis stimulées avec de la PMA/ ionomycine et BFA pendant 6h. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules NK (CD3⁻NKp46⁺) positives pour A) GrzB, B) TNF α , C) IFN γ et D) CD107a dans la population de cellules NK totales et dans chacun des stades de la maturation fonctionnelle. Les statistiques ont été réalisées par un test T non-pairé (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

Tel que mentionné plus haut, la souris NOD est un modèle très bien établi de diabète auto-immun spontané. Cette maladie est hautement inflammatoire et nous avons cherché à déterminer si la forte inflammation causée par la maladie était en cause dans les défauts fonctionnels des cellules NK de la lignée NOD présentés plus haut. Nous avons donc exploité le modèle de NOD.Rag qui ne développe pas le T1D à cause d'une absence en cellules T et cellules B. En comparant l'expression des effecteurs entre les cellules NK de la NOD.Rag avec celles de la B6.Rag, nous avons pu observer ce même défaut d'expression. En effet, il a été possible de constater que le pourcentage de cellules NK totales et dans chaque stade de la maturation fonctionnelle exprimant l'IFN γ est moindre dans la lignée NOD.Rag (50%) comparée à celles de la lignée B6.Rag (80%) (Fig 3.2a, p. 113) (Annexe 1 , fig supp 1 pour la stratégie de gating). L'expression de Granzyme B est restée au niveau basal tout au long de la maturation fonctionnelle chez les cellules NK de la souris NOD.Rag alors que celles de la souris B6.Rag ont démontré le même profil d'expression que la lignée B6 (Fig 3.2b, p. 113). Pour ce qui est de l'expression de TNF α , nous avons pu observer un défaut d'expression chez les NK de la lignée NOD.Rag dans les stades DN, CD27 et DP (Fig3.2c, p. 101). Finalement, nous avons pu constater une expression accrue de CD107a dans les cellules NK de la souris NOD.Rag et ce, tous stades confondus (Fig 3.2d, p. 113). Ce profil d'expression est semblable à celui retrouvé chez la souris NOD (Fig 3.1d, p. 111). Ces résultats démontrent donc que le défaut fonctionnel observé chez la souris NOD n'est pas causé par de l'inflammation résultant de sa prédisposition au diabète de type 1.

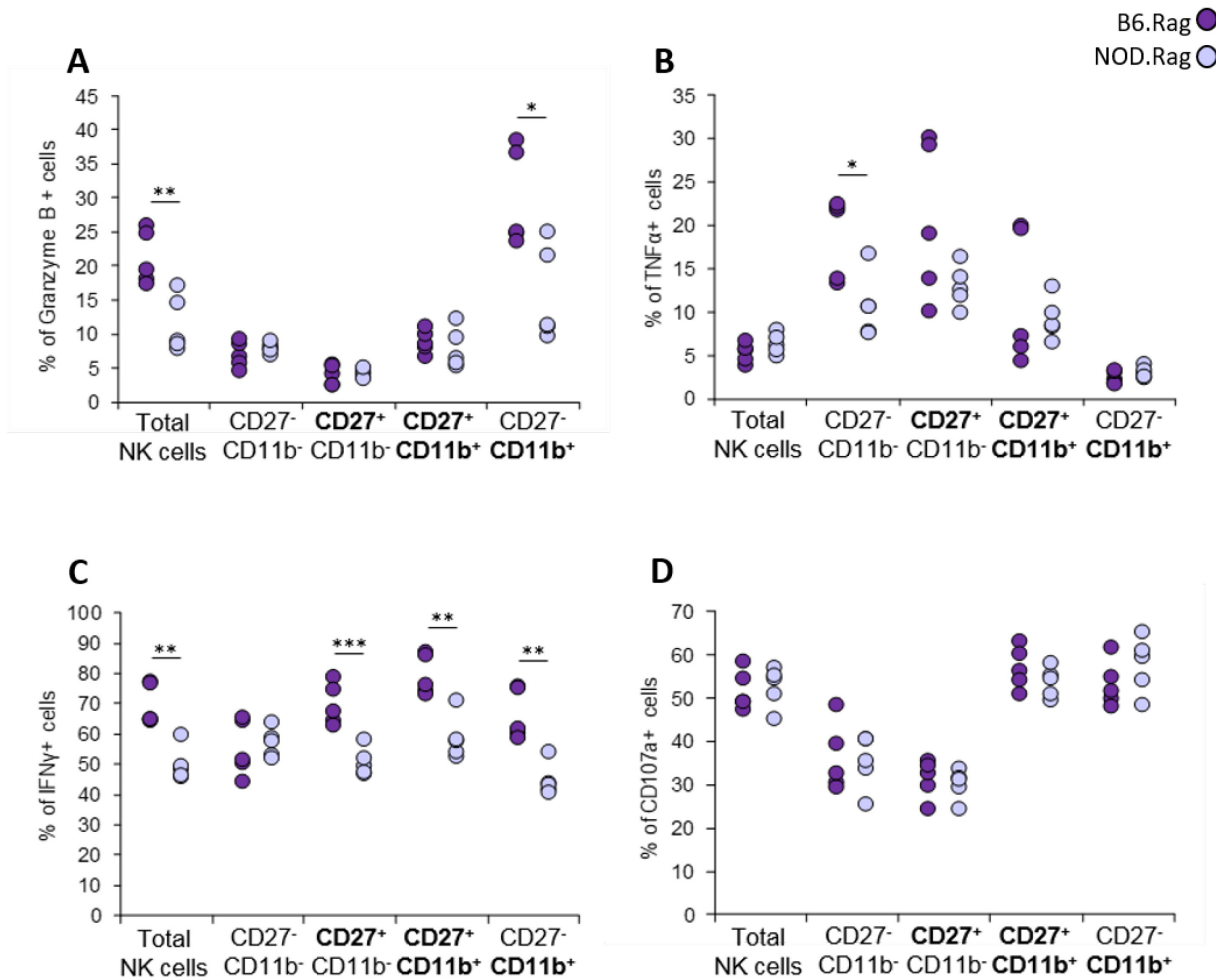


Figure 3.2. Le défaut fonctionnel est conservé dans les souris NOD déficientes pour Rag. Les cellules NK des rates de souris B6.Rag et NOD.Rag furent enrichies par séparation magnétique puis stimulées avec de la PMA/ ionomycine et BFA pendant 6h. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules NK (CD3⁺NKp46⁺) positives pour, A) GrzB, B) TNFα, C) IFNγ et D) CD107a dans la population de cellules NK totales et dans chacun des stades de la maturation fonctionnelle. Les statistiques ont été générées par un test T non-pairé (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$).

3.5.2 Le potentiel d'activation des stades de maturation entre les lignées B6 et NOD

Afin de caractériser davantage les variations fonctionnelles entre les cellules NK des lignées B6 et NOD, nous avons cherché à étudier et comparer leur potentiel d'activation via leur expression de récepteurs membranaires d'activation par cytométrie en flux. L'activation des cellules NK dépend de l'intégration de signaux par une multitude de récepteurs d'activation différents, leur conférant ainsi une certaine plasticité quant à la reconnaissance antigénique. À cause de son importance dans l'activation cytotoxique des cellules NK, le NKG2D est considéré comme l'un de leurs principaux récepteurs d'activation. Ogasawara et son groupe ont déjà précédemment établi qu'à l'état de base, les niveaux d'expression de NKG2D étaient similaires entre les cellules NK de la B6 et de la NOD, mais que suite à une stimulation *ex vivo* à l'IL-2, ces dernières en expriment significativement moins que leurs homologues chez la B6. Afin de recréer une condition plus physiologique d'activation, nous avons injecté de manière intrapéritonéale (i.p.) 18h précédant les études cytométriques un agoniste du TLR-3 (Poly I:C) afin de mimer une infection virale. Il est connu que le Poly I:C agit indirectement sur les cellules NK via la production d'IL-15 par les cellules dendritiques que celui-ci active. Puisque les récepteurs de l'IL-2 et de l'IL-15 sont structurellement similaires, nous nous attendions donc à observer les mêmes résultats présentés par Ogasawara et son groupe. Tout comme eux, nous n'avons pas vu de différence d'expression de NKG2D entre les cellules NK des souris B6 et NOD en condition neutre (i.p. PBS). Dans les souris B6 et NOD injectées avec le Poly I:C, nous n'avons pas pu déterminer de différence dans le pourcentage de cellules NK exprimant le récepteur d'activation. Ces résultats ne sont pas très surprenants puisque le NKG2D est exprimé de manière ubiquitaire sur toutes les cellules NK matures. Par contre, lorsque nous avons

quantifié l'expression du récepteur par la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de son signal, nous avons effectivement pu apprécier une différence significative de l'expression de NKG2D. Alors que les cellules NK de la souris B6 augmentent leur expression du récepteur de 2,5 fois plus suite à une réponse activatrice (Poly I:C), les cellules NK de la NOD sont incapables d'induire son expression qui reste au même niveau qu'en condition neutre (PBS). Cette déficience est présente autant dans la population de cellules NK totales que parmi les 4 sous-types de maturation fonctionnelle. De plus, pour les cellules NK de la B6, il est à noter que plus celles-ci sont fonctionnellement matures, plus elles semblent répondre à la stimulation au PolyI :C en augmentant leur niveau d'expression de NKG2D (Figure 3.3, haut, p. 116). Ceci suggère donc que les cellules NK de la NOD n'arrivent pas à répondre de façon adéquate à un signal d'activation viral.

Un autre récepteur d'activation important des cellules NK est DNAM-1 qui joue un rôle dans leur réponse cytotoxique face à plusieurs tumeurs telles que les mélanomes et les fibrosarcomes induits chimiquement, mais aussi dans la survie de cellules NK suite à une infection au MCMV. Contrairement au NKG2D, nous avons pu observer une expression similaire de DNAM-1 entre les cellules NK des lignées B6 et NOD à la fois en condition neutre, mais aussi suite à l'activation au Poly I:C. Son expression est aussi constante tout au long du processus de maturation fonctionnelle (Figure 3.3, bas, p. 116). Cette absence de différence suggère ainsi que l'expression de DNAM-1 ne dépend pas d'un signal du TLR-3 et de l'IL-15 et que les cellules NK de la NOD l'expriment de façon similaire à la souris B6.

De manière générale, ces résultats révèlent donc que suite à une infection virale simulée par le polyI :C, les cellules NK de la NOD n'arrivent pas à induire l'expression de récepteurs d'activation qui dépendent du signal par le récepteur de l'IL-15 comme le NKG2D.

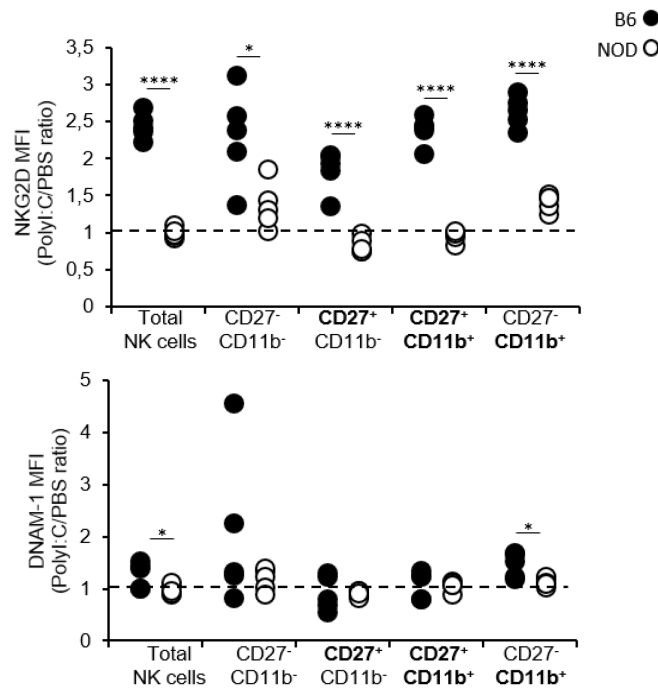


Figure 3.3. Les cellules NK de la NOD ont un défaut dans l'induction de NKG2D. Les souris B6 et NOD furent injectées avec du Poly I:C ou PBS pendant 18h. Les rates furent récoltées, préparées et marquées pour NKG2D ou DNAM-1. L'induction dans les cellules NK (CD3⁻CD19⁻CD49b⁺CD122⁺) dans la population totale et dans chacun des stades de la maturation fonctionnelle est représentée en termes de ratio de l'intensité de fluorescence moyenne (MFI) suite à l'induction au Poly I:C par rapport au MFI en condition contrôle (PBS). Les lignes pointillées représentent une absence de réponse (ratio d'expression de 1). Les statistiques ont été générées par un test T non-pairé (* : $p < 0.05$, **** : $p < 0.0001$).

3.5.3 Études des mécanismes régissant la maturation et l'acquisition fonctionnelle

Nous avons précédemment pu établir que les cellules NK de la souris déficiente en p53 (B6.Trp53^{-/-}) présentent un défaut de maturation fonctionnelle semblable, bien que moindre, aux cellules NK de la lignée NOD. De plus, en quantifiant les niveaux d'expression protéique par cytométrie en flux entre les cellules NK des lignées B6 et NOD, nous avons pu constater que ces dernières ont un niveau moindre de p53 (Figure 2.8, p. 69) [148]. Ensemble, ces résultats suggèrent donc que cette protéine antitumorale est impliquée en partie dans le processus de maturation fonctionnelle.

Par conséquent, nous avons donc jugé important de comprendre si les variations dans le processus de maturation fonctionnelle et dans l'acquisition des fonctions effectrices entre les cellules NK de la B6 et B6.Trp53^{-/-} étaient dépendantes ou non de leur fond génétique. Afin de répondre à cette question, nous avons généré des chimères hématopoïétiques compétitives et non compétitives. Tel que décrit dans le chapitre 2, nous avons étudié la maturation fonctionnelle grâce aux marqueurs CD11d et CD27 sur la population de cellules NK (CD3^ε⁻CD19⁻CD49b⁺CD122⁺). Nous avons aussi exploité les différences alléliques du marqueur hématopoïétique CD45 entre la B6.SJL (CD45.1) et la B6.Trp53^{-/-} (CD45.2) afin d'identifier la provenance de chacune des cellules à l'étude. En comparant les profils d'expression des cellules NK CD45.1⁺ et CD45.2⁺, nous avons pu constater que les pourcentages de cellules NK présentes dans chacun des stades du processus étaient les mêmes. Plus spécifiquement, environ 5 % pour les cellules NK CD27^{lo}CD11b^{lo}, environ 12% pour les CD27^{hi}CD11b^{lo}, environ 15% pour les CD27^{hi}CD11^{hi} et environ 66% pour les CD27^{lo}CD11b^{hi} (Fig 3.3, p. 116). Il est important de mentionner que ces pourcentages rappellent le profil de maturation des cellules NK provenant

de la souris B6. Ces observations suggèrent alors que le profil de maturation fonctionnelle des cellules NK ne dépend pas du fond génétique d'origine des cellules NK, mais dépend plutôt de celui de la souris receveuse qui est dans ce contexte une souris semblable à la B6 (B6.1.2).

Pour finir, nous avons aussi caractérisé les fonctions effectrices des cellules NK de ces chimères tel que décrit plus haut. De manière similaire à leurs profils de maturation fonctionnelle, nous n'avons pu observer de différences significative dans l'expression de l'IFN γ , TNF α , et CD107a entre les cellules NK provenant de la moelle de la lignée B6.SJL et celles provenant de la lignée B6.Trp53^{-/-}, et ce, tout au long du processus de maturation fonctionnelle. Les seules différences fonctionnelles que nous avons pu percevoir se trouvent dans l'expression de granzyme B où les cellules NK de la B6.Trp53^{-/-} y présentent un faible défaut d'expression aux stades DN (CD27^{lo}CD11b^{lo}) et CD27 (CD27^{hi}CD11b^{lo}) (Fig 3.4, p. 119) (Annexe 1, fig supp 2 pour la stratégie de gating. Ultimement, cette absence de différence était attendue puisque le défaut de maturation fonctionnelle observé chez les cellules NK de la B6.Trp53^{-/-}, bien que robuste, est assez subtil comparé au défaut observé chez leurs homologues de la souris NOD.

Ensemble, ces résultats suggèrent que l'implication de p53 sur la maturation fonctionnelle et la production des effecteurs clés IFN γ , TNF α et granzyme B peut être compensé par le fond génétique de la souris hôte B6.1.2.

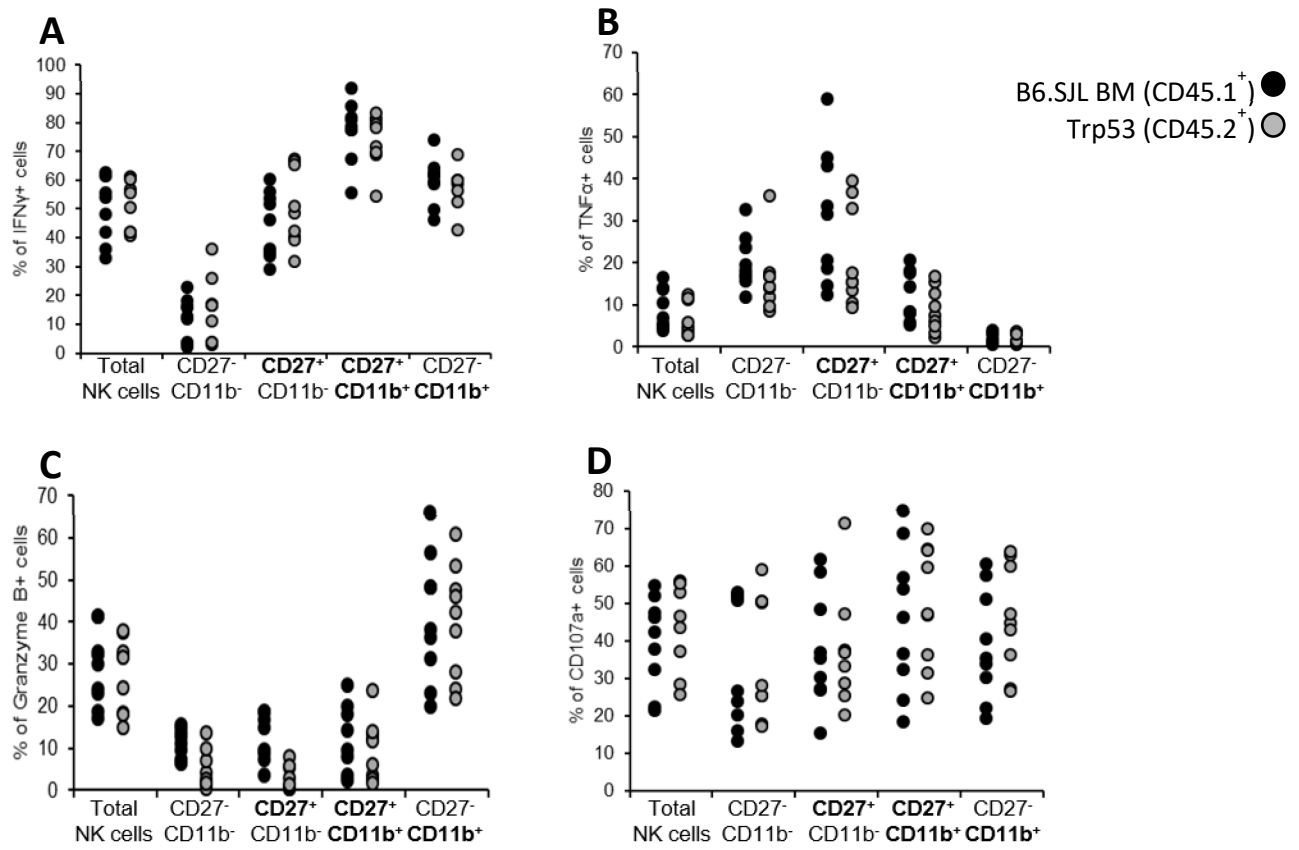


Figure 3.4. Le fond génétique B6.1.2 restaure le défaut fonctionnel des cellules NK provenant de souris déficientes en p53. Les cellules NK des rates de chimères compétitives B6/Trp53 dans B6.1.2 furent enrichies par séparation magnétique puis stimulées avec de la PMA/ ionomycine et BFA pendant 6h. L'origine des cellules NK a été discriminée avec le marqueur allélique CD45 (B6.SJL : CD45.1⁺, Trp53 : CD45.2⁺). Les graphiques représentent le pourcentage de cellules NK (CD3⁻ NKp46⁺) positives pour A) IFN γ , B) GrzB, C) TNF α , et D) CD107a dans la population de cellules NK totales et dans chacun des stades de la maturation fonctionnelle.

3.6 Discussion

Les cellules NK de la NOD présentent des défauts fonctionnels importants que nous avons précédemment attribués à un défaut de leur processus de maturation fonctionnelle les empêchant d'atteindre un phénotype cytotoxique optimal [148]. L'analyse exhaustive de la production des effecteurs cytotoxiques clés IFN γ , TNF α et granzyme B que nous avons présentée dans ce chapitre suggère qu'en plus de ce défaut de maturation, les cellules NK de la souris NOD exhibent un défaut dans l'acquisition de ces fonctions comparées aux cellules de la souris B6. Cependant, grâce à l'expression de la protéine CD107a, nous avons pu observer un potentiel de dégranulation similaire entre les cellules NK des deux lignées. Nous avons aussi pu montrer que les cellules NK de la lignée NOD sont incapables d'induire l'expression du récepteur d'activation NKG2D en réponse à un environnement inflammatoire induit par le Poly I:C, corrélant ainsi avec les défauts d'expression des effecteurs cytotoxiques. Cette observation est en accord avec la littérature où il avait déjà été montré que les cellules NK de la lignée NOD ne peuvent induire NKG2D qu'après une stimulation à l'IL-2 [68]. De plus, l'exploitation de chimères hématopoïétiques B6.SJL / B6.Trp53^{-/-} a permis de mettre en lumière l'implication minimale que p53 exerce sur le processus de maturation fonctionnelle ainsi que sur l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK.

Les phénotypes observés dans ces travaux ont été principalement générés suite à une stimulation artificielle à la PMA/ionomycine. Afin de confirmer ces différences fonctionnelles dans un environnement physiologiquement pertinent, nous cherchons maintenant à mettre au point des modèles tumoraux pouvant accommoder les cellules NK des deux lignées B6 et NOD. Un des modèles pertinents pour l'étude des fonctions effectrices des cellules NK est la lignée tumorale B6F10, dérivée d'un mélanome murin de souris B6 (haplotype H-2^b)[153].

L'haplotype de CMH différent de la souris NOD (H-2^{g7}) induirait rapidement le rejet des cellules B16F10, rendant ainsi ce modèle inadéquat. Pour contourner cette disparité, nous avons généré une lignée F1 (H-2^b X H-2^{g7}) qui, avec l'expression des deux haplotypes, permet la greffe des cellules B16 (données non montrées).

Nous avons déjà démontré avec l'utilisation de la lignée B6.Trp53^{-/-} que la protéine antitumorale p53 semble en partie jouer un rôle dans le processus de maturation fonctionnelle des cellules NK. Cependant, ce phénotype est minime comparé au profond déficit observé chez les cellules NK de la lignée NOD [148]. L'exploitation des chimères hématopoïétiques B6 / B6.Trp53^{-/-} a pu révéler que le défaut associé à l'absence de p53 peut être compensé par le fond génétique de la souris receveuse (B6.1.2) (Fig. 3.4, p. 119). Par conséquent, il est donc essentiel que nous générions des chimères hématopoïétiques exploitant les moelles B6 et NOD afin de voir si les défauts de maturations et de fonctions observés chez la NOD, beaucoup plus robustes, peuvent aussi être compensés par le fond génétique d'une souris B6. Encore une fois, la disparité des CMH entre les lignées B6 et NOD empêche la génération de telles chimères. C'est pourquoi nous allons exploiter la moelle de souris B6.NOD-(D17Mit21-D17Mit10)/LtJ (B6.NODIdd1), une lignée B6 avec le CMH H-2^{g7} de la souris NOD. Nous avons d'ailleurs pu démontrer que les cellules NK de la souris B6.NODIdd1 présentaient les mêmes fonctions que celles de la souris B6 (Annexe 1, fig supp 3).

Ensemble, ces travaux démontrent qu'en plus du défaut de maturation fonctionnelle observé précédemment chez les cellules NK de la souris NOD, celles-ci sont aussi incapables d'acquérir leurs fonctions effectrices au cours du processus. Ces résultats suggèrent donc l'implication de plusieurs mécanismes contrôlant de manières différentes leur maturation et l'acquisition de leur cytotoxicité. Ultiment, une meilleure compréhension de ces mécanismes

pourrait mener à la manipulation des fonctions des cellules NK d'un patient y présentant des déficiences et ainsi permettre le développement de thérapies cellulaires personnalisées.

CHAPITRE 4 :

Discussion

L'objectif principal de ce mémoire était de mieux comprendre et caractériser les mécanismes impliqués dans les défauts cytotoxiques connus depuis plus de 30 ans dans les cellules NK de la lignée murine NOD. Des travaux réalisés par les groupes d'Hayakawa en 2006 et de Walzer en 2009 ont attribué aux cellules NK matures un processus dit de maturation fonctionnelle au cours duquel les cellules NK acquièrent leurs fonctions cytotoxiques et cytolytiques. Puisque ce processus est responsable de la génération de la population effectrice parmi les cellules NK totales, nous avons tout d'abord cherché à déterminer si les cellules NK de la lignée NOD présentaient des défauts au cours de celui-ci. Des études de cytométrie en flux caractérisant la proportion de cellules NK dans chacune des étapes de la maturation fonctionnelle parmi les lignées murines B6 et NOD ont pu révéler que les cellules NK provenant de cette dernière étaient principalement concentrées dans les premières étapes de la maturation fonctionnelle. En comparaison avec les cellules NK de la lignée B6, qui ont un pourcentage plus élevé dans les stades les plus matures du processus, cette différence a donc bel et bien révélé un bloc de maturation fonctionnelle chez les cellules NK de la lignée NOD. Des études bio-informatiques, puis de cytométrie en flux ont par la suite révélé l'implication du gène *Trp53*, codant pour la protéine antitumorale p53, dans ce processus.

En deuxième temps, afin de déterminer si ce bloc de maturation fonctionnelle pouvait à lui seul expliquer le défaut effecteur observé dans la population de cellules NK totales provenant de la lignée NOD, nous avons caractérisé et comparé l'acquisition de fonctions effectrices clés au cours du processus de maturation fonctionnelle entre B6 et NOD. Des essais de stimulation *ex vivo* caractérisés par cytométrie en flux ont pu révéler un véritable défaut d'expression des effecteurs cytotoxiques IFN γ , TNF α et Granzyme B au cours du processus de maturation fonctionnelle chez les cellules NK de la lignée NOD.

Ensemble, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que les défauts fonctionnels connus chez les cellules NK de la NOD sont dus à de profonds déficits à la fois au niveau de la génération d'une population fonctionnellement mature, mais aussi au niveau de l'acquisition de leurs fonctions effectrices. Bien que découlant directement de la recherche fondamentale, ces résultats ont un important potentiel pour la recherche clinique chez l'humain.

La chimiothérapie et radiothérapie demeurent les avenues par excellence d'un programme de traitement antitumoral. En revanche, par leurs actions hautement invasives et peu spécifiques, ces traitements apportent leurs lots de problèmes et d'effets secondaires importants et nous forcent donc à repenser les méthodes thérapeutiques utilisées. L'une des avenues les plus prometteuses est l'immunothérapie, qui consiste à moduler le système immunitaire du patient pour le rendre à nouveau efficace et capable de cibler et tuer spécifiquement les cellules cancéreuses. À l'instar des lymphocytes T, de plus en plus d'études semblent aussi vouer aux cellules NK un fort potentiel thérapeutique. Dans plusieurs types de cancers, les cellules NK exhibent un nombre diminué ou des fonctions cytotoxiques lourdement impactées les rendant alors inefficaces à une clairance adéquate des cellules tumorales. L'immunothérapie basée sur les cellules NK consiste donc à réguler ces paramètres. Par exemple, l'extraction de cellules NK d'un patient puis leur incubation *in vitro* avec des cytokines activatrices comme l'IL-2, IL-12 ou l'IL-15 permet une expansion robuste ainsi qu'une réactivation de ces cellules. Une réinjection autologue de ces cellules permet alors la restauration d'une réponse cytotoxique forte des cellules NK. Une autre méthode consiste à modifier génétiquement des cellules NK extraites pour leur faire exprimer un récepteur chimérique composé à la fois d'un récepteur extracellulaire et d'une région intracellulaire permettant la transduction d'un signal robuste et subséquemment l'activation des cellules NK. Ces cellules NK, appelée CAR-NK (*Chimeric antigen receptor*

NK) peuvent ainsi reconnaître spécifiquement certains antigènes tumoraux. À l'inverse des cellules CAR-T, les CAR-NK n'induisent pas de greffe contre l'hôte (GvH) [154].

Tel que mentionné plus haut, ces thérapies présentent des avenues prometteuses, cependant leur personnalisation peut s'avérer difficile puisque les cellules NK présentent des variations majeures dans leur nombre et dans leur répertoire des récepteurs d'inhibition et d'activation entre chaque individu, ce qui peut grandement influencer leurs fonctions intrinsèques [155, 156]. Une meilleure compréhension de l'influence des variations génétiques de chaque individu sur le nombre, l'expression des récepteurs ainsi que l'activation des cellules NK est donc essentielle. De manière intéressante, les différences de maturation et de fonctions des cellules NK observées dans la souris NOD comparé à la souris B6 récapitulent en partie les phénotypes observés chez certains individus présentant des défauts fonctionnels dans cette population cellulaire.

L'utilisation de ces deux lignées murines nous a donc permis de comprendre davantage la contribution des facteurs génétiques sur les variations biologiques des cellules NK. Avec ces travaux, nous ont pu identifier un défaut de maturation fonctionnelle des cellules NK de la souris NOD ainsi que lier un gène candidat potentiel pour ce processus : *Trp53*. De plus, nous avons aussi démontré que l'acquisition de propriétés fonctionnelles des cellules NK observée dans la souris B6 était quasiment absente chez la souris NOD. De manière générale, nous avons donc pu apporter une meilleure compréhension du phénotype fonctionnellement déficient de la population de cellules NK totales connu depuis les 30 dernières années chez la souris NOD. Cependant, cette étude comporte des limitations. La quantification par cytométrie en flux de ces effecteurs fut effectuée après une stimulation *in vitro* à la PMA/Ionomycine qui active fortement les cellules en contournant leurs récepteurs d'activation. Ce modèle, bien que largement utilisé

pour ce genre d'étude est peu physiologique et une mise en contexte des différences fonctionnelles entre les cellules NK des lignées NOD et B6 dans des conditions réelles de présence tumorale ou d'infection virale est donc nécessaire. De plus, même s'il paraît évident qu'une meilleure expression d'effecteurs cytotoxiques se traduit par un meilleur contrôle antitumoral ou antiviral, ce n'est pas nécessairement le cas. Effectivement, certains cancers semblent être particulièrement sensibles à une lyse induite par le ligand de mort TRAIL exprimé par les cellules NK. De manière intéressante, son expression est surtout réservée aux cellules NK les moins fonctionnellement matures ($CD27^{lo}CD11b^{lo}$ et $CD27^{hi}CD11b^{lo}$). Autrement dit, une population de cellules NK peu fonctionnellement matures ou produisant peu de granules cytotoxiques - tel qu'observé chez la souris NOD – pourrait tout de même être efficace à induire la clairance tumorale [46].

Afin d'induire un environnement tumoral, nous prévoyons avoir recours à la lignée cellulaire de mélanome murin B16F10. Cette lignée cellulaire offre plusieurs avantages puisqu'elle permet l'induction soit de tumeurs solides ou de tumeurs reproduisant des conditions métastatiques, dépendamment de la voie d'injection sous-cutanée ou intraveineuse, respectivement. De plus, cette lignée cellulaire est adéquate pour étudier la biologie des cellules NK puisque celles-ci sont importantes pour le contrôle de la progression tumorale [97, 157, 158]. Par contre, son utilisation sur la lignée NOD peut s'avérer ardue puisque la lignée B16F10 provient à l'origine de la souris B6 et porte donc l'haplotype H-2^b du CMH-1 et serait par conséquent immédiatement rejeté par la souris NOD qui porte l'haplotype H-2^{g7}. Afin de faciliter la greffe tumorale, nous avons généré des souris F1 (H-2^b/H-2^{g7}) en croisant une souris B6.Rag $yc^{-/-}$ avec une souris NOD.Rag $yc^{-/-}$. Des tests récents ont démontré que la greffe de B16F10 était efficace dans ces souris F1, prouvant ainsi la pertinence de ce modèle pour les

prochaines expériences de clairance tumorale. Il sera important de garder en tête la disparité du CMH entre la tumeur B16F10 ainsi que les cellules NK de la souris NOD puisqu'il se pourrait que celle-ci induise le rejet rapide de la tumeur par ces cellules et par le fait même « camoufler » les défauts de leurs fonctions effectrices.

Ensemble, les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 suggèrent que la maturation fonctionnelle et l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK sont régies par des mécanismes différents. Cette supposition est d'ailleurs renforcée par les résultats que nous avons pu générer avec notre utilisation de chimères hématopoïétiques en utilisant la moelle de B6 et de B6.Trp53^{-/-}. Effectivement, nous avons pu observer que la maturation fonctionnelle semble être régie par des mécanismes moelle intrinsèques alors que l'acquisition des fonctions semble être déterminée par des mécanismes non intrinsèques aux cellules hématopoïétiques. Il serait maintenant intéressant de prendre comme souris receveuse une B6.Trp53^{-/-} et voir si en absence de p53, ce fond génétique peut modifier les processus de maturation et d'acquisition fonctionnelle des cellules NK issues de la moelle de B6. Selon ce qui a été observé, il serait attendu que le profil de maturation fonctionnelle de celles-ci ressemble à celui de la B6.Trp53^{-/-}. Ce modèle est malheureusement peu réalisable puisque l'irradiation à laquelle les souris receveuses sont exposées serait létale pour les B6.Trp53^{-/-} qui, en absence de p53, ont leur mécanisme de réparation d'ADN complètement abrogé. De plus, afin de démontrer que ce même phénomène existe chez la souris NOD, il sera important de générer des chimères hématopoïétiques compétitives et non compétitives exploitant la moelle de souris NOD. Encore une fois, à cause de la disparité du CMH entre la B6 et la NOD demande l'utilisation de moelles osseuses ayant des similarités haplotypiques pour empêcher un effet GvH lors de la

reconstitution compétitive. Pour ce faire, nous prévoyons employer la moelle osseuse de souris B6^{g7}, qui ont le génome de la souris B6, mais avec l'haplotype H-2^{g7} de la souris NOD.

Dans un contexte immunothérapeutique, cette idée que l'acquisition fonctionnelle soit indépendante de la maturation fonctionnelle s'avère importante puisque la simple modulation de leur maturation fonctionnelle *in vitro* pourrait s'avérer totalement inefficace et n'avoir aucun impact sur leur fonction. À l'inverse, ceci pourrait aussi permettre d'induire une activité adéquate des cellules NK via l'utilisation de cytokines, malgré le fait que les cellules NK d'un individu aient une maturation fonctionnelle déficiente.

Un autre des aspects importants présentés dans le chapitre 2 est l'identification du gène *Trp53* comme étant impliqué dans le processus de maturation fonctionnelle des cellules NK. Effectivement, nous avons tout d'abord pu montrer que les cellules NK de la souris NOD exprimaient un niveau plus bas de p53 que la B6. De plus, le défaut de maturation fonctionnelle observé chez les cellules NK de la souris NOD a pu être récapitulé, en partie, dans un modèle murin déficient en p53 (*Trp53*^{-/-}). En tentant d'élucider le mécanisme par lequel p53 influence ce processus de maturation fonctionnelle, nous avons réalisé des essais par cytométrie en flux d'apoptose et de cycle cellulaire (Annexine V et Ki-67, respectivement). Ces essais ont révélé une augmentation du nombre de cellules NK entrées en cycle cellulaire dans les stades CD27^{hi}CD11b^{lo} et CD27^{hi}CD11b^{hi} chez la souris B6.Trp53^{-/-} comparé à la souris B6 (Annexe 2.2). Ces résultats ne sont pas surprenants puisque la protéine p53 participe activement au contrôle du potentiel prolifératif en bloquant le cycle cellulaire [159]. Il est par conséquent attendu qu'en absence de p53, nous observions une augmentation des cellules en prolifération. Ces résultats peuvent aussi expliquer l'augmentation cellulaire observée dans ses deux stades chez la souris B6.Trp53^{-/-}. Les essais d'annexine V ont quant à eux révélé une augmentation de

l'apoptose des cellules NK du stade le plus mature (CD27^{lo}CD11b^{hi}) chez la souris B6.Trp53^{-/-}. Cette augmentation de la mort cellulaire spécifiquement dans ce stade de maturation peut ainsi expliquer la diminution de cellules NK observée dans la lignée déficiente en p53.

De manière intéressante, p53 semble jouer un rôle dans le contrôle du diabète de type 1 tel que montré par Chen et son équipe en 2005. Ils ont pu établir qu'absence de p53, les souris étaient plus sensibles à développer un diabète de type 1 induit chimiquement au STZ (streptozotocine) ainsi qu'à produire une quantité plus importante d'IL-12 par leurs macrophages [160]. De plus en plus d'articles récents démontrent que les fonctions de p53, et du cycle cellulaire, ne s'arrête pas qu'au maintien homéostatique des cellules et au contrôle de la prolifération tumorale, mais s'étendent aussi au maintien de l'autotolérance chez l'hôte. Effectivement, p53 promeut la clairance des cellules mortes suite à leur apoptose par les macrophages ainsi qu'à l'inhibition de l'activité des cellules T via l'expression de DD1 α et PD-1 et DD1 α , respectivement. D'ailleurs, les modèles murins déficients en DD1 α exhibent après plusieurs mois une infiltration lymphocytaire dans plusieurs tissus tels que la peau, les poumons et les reins [161]. Il a aussi été démontré que le signal du TLR-3 était dépendant de p53 [162], pouvant ainsi expliquer l'absence de l'induction de NKG2D suite à la stimulation au PolyI:C. Finalement, une autre étude exploitant un modèle murin d'infection à l'influenza a établi qu'en absence de p53, plusieurs cytokines et chimiokines des cellules NK telles que l'IFN γ , le TNF et CXCL10 étaient diminuées [163]. Par conséquent, la diminution observée de p53 chez les cellules NK de la NOD, pourrait en partie expliquer leur défaut de production de cytokines.

Les résultats des chimères hématopoïétiques semblent indiquer que les défauts de maturation des cellules NK de la lignée B6.Trp53^{-/-} sont restaurés dans un fond génétique où la

réponse p53 est intacte (récepteur B6.1.2). Il est donc essentiel de considérer ses fonctions d'un point de vue systémique. Bien que les fonctions de p53, dite « gardienne de l'intégrité génomique », soient principalement d'ordre intrinsèque à chaque cellule, cette protéine revêt tout de même une importance d'ordre extrinsèque qui touche directement l'activité des cellules NK. Tout d'abord, Wang et al. ont pu mettre en évidence un nouveau mécanisme par lequel p53 contrôle directement l'expression du CMH de type 1 à la surface des cellules [164]. Les molécules du CMH-1 sont essentielles à l'éducation des cellules NK et par conséquent à leur niveau d'activation général. Il est donc raisonnable d'émettre la réflexion qu'en absence de p53, les niveaux moindres de CMH-1 retrouvés à la surface des cellules récapituleraient jusqu'à un certain point le modèle murin déficient en CHM-1 ($\beta 2m^{-/-}$) reconnu pour ses cellules NK fonctionnellement déficientes [65].

Des études conduites sur les cellules NK humaines ont révélé l'importance de p53 dans le recrutement ainsi que l'activation de celles-ci. Effectivement, la transduction d'une version fonctionnelle du gène *Trp53* dans une lignée de carcinome pulmonaire où p53 est déficiente arrive à induire l'expression des ligands de stress ULPB1 et ULPB2, ligands importants du récepteur d'activation clé NKG2D [165], rendant ainsi les cellules NK « alertées » face à une présence tumorale. En parallèle à cette fonction, p53 semble aussi importante dans l'induction de la chimiokine CCL2 ainsi que de la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-12 l'IL-15 par les cellules sénescents [166]. Il va sans dire que ces effecteurs affectent directement la fonction des cellules NK puisque ceux-ci recrutent (CCL2), puis induisent l'activation (IL-12 et IL-15) des cellules NK au site des cellules sénescents. La protéine p53 est aussi impliquée directement dans l'exportation du récepteur de mort Fas à la surface des cellules tumorales, médiant ainsi directement l'activité lytique des cellules NK [167]. Malgré

ces démonstrations que l'expression extrinsèque aux cellules NK de p53 joue un rôle direct sur la fonction de celles-ci, il est important de mentionner que les études décrites plus haut furent réalisées dans un contexte pathogénique (cellules tumorales et sénescents). Bien que leurs conditions sont bien différentes de celles présentées dans ce mémoire (contexte *ex vivo* non pathogénique), ces études laissent croire que les déficiences maturationnelles et fonctionnelles observées chez les cellules NK se développant en absence de p53 seraient exacerbées en contexte tumoral. Il serait donc excessivement pertinent de caractériser le potentiel antitumoral des cellules NK endogènes des souris B6.Trp53^{-/-} dans un contexte tumoral (B16F10, par exemple). Une autre façon de tester l'effet d'une absence de p53 sur le développement des cellules NK serait de voir comment se développent fonctionnellement des cellules iNK de souris B6 dans un environnement B6.Trp53^{-/-}. Une telle expérience serait facilement réalisable en triant les cellules iNK (CD3⁻CD19⁻NK1.1⁺) à partir de la rate d'une donneuse B6.SJL (CD45.1) puis les transférer dans une souris B6.Trp53^{-/-} (CD45.2). Selon la littérature décrite plus haut, il serait attendu que, comparées à des cellules NK B6 se développant en présence systémique de p53, ces cellules NK transférées dans un environnement déficient présenteraient des défauts similaires aux cellules NK provenant de la lignée B6.Trp53^{-/-}.

En plus des travaux présentés dans ce mémoire, j'ai aussi participé à l'identification d'une protéine du cycle cellulaire, RAD51, dans le maintien d'un sous-type de lymphocytes T immunorégulateurs. Cette seconde étude (voir Annexe 2), portant elle aussi sur un phénotype distinct entre les souris B6 et NOD, révèle encore une fois l'implication d'un gène du cycle cellulaire dans sur les populations immunitaires. En bref, nous avons pu observer une augmentation du pourcentage de cellules en phase de réplication d'ADN (phase S) dans la rate de souris NOD comparé à la B6. Il est important de mentionner que ce phénotype peut être

récapitulé par une diminution ou une inhibition de CHEK1, une autre protéine essentielle au cycle cellulaire qui induit la phosphorylation de RAD51 [168].

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pu mettre en lumière les différences fonctionnelles et de maturation existant entre la souris B6 et NOD. Les mécanismes impliqués dans ces différences sont encore cependant grandement inconnus. Ceci dit, quelques pistes de solutions peuvent être proposées. Une étude récente effectuée par Malarkannan et son groupe a pu démontrer l'implication différentielle des deux voies de mTOR (mTORC1 et mTORC2) dans les étapes de la maturation fonctionnelle des cellules NK. En bref, l'inhibition conditionnelle dans ces dernières de RAPTOR (mTORC1) ou de RICTOR (mTORC2) semble augmenter dans la rate le pourcentage de cellules NK dans le stade CD27^{hi}CD11b^{lo} au détriment du stade CD27^{lo}CD11b^{hi}. De plus, les auteurs ont aussi révélé une diminution significative de l'expression d'IFN γ dans les cellules NK déficientes pour la protéine RAPTOR du complexe mTORC1 [169]. Ces phénotypes récapitulent donc le défaut de maturation fonctionnelle que nous avons nous-mêmes observé dans les souris NOD et B6.Trp53^{-/-} ainsi que le défaut d'expression d'IFN γ dans les cellules NK de la souris NOD comparé à la B6. En tant que joueurs clés dans la régulation métabolique et physiologique les voies mTOR participent donc activement au contrôle de la prolifération cellulaire. Il a d'ailleurs été démontré qu'une inhibition chimique de mTOR induit un bloc du cycle cellulaire en phase S via la diminution de la protéine CHEK1 [170]. Ces études, mises en contexte avec les travaux présentés dans ce mémoire me laisse croire que la souris NOD exhibe un déséquilibre des voies mTOR dans les cellules NK de sa rate, menant ainsi à un bloc du cycle cellulaire, mais aussi à une dérégulation des fonctions et de la maturation fonctionnelle de ses cellules NK. Afin de consolider cette supposition il serait important de quantifier les niveaux de pS6 (produit de la voie mTOR) par

western blot sur les cellules NK des lignées B6 et NOD. De plus, il pourrait être intéressant de comparer leur métabolisme général par des analyses de *seahorse*.

En deuxième temps, afin de mieux comprendre les mécanismes en jeu dans la production de Granzyme B et des cytokines IFN γ et TNF α , il est important de comprendre le mode d'action de la PMA et de l'ionomycine utilisés lors de nos simulations *ex vivo*. Contrairement à une activation classique, cette méthode contourne complètement la région proximale des récepteurs d'activation. Ensemble, la PMA et l'ionomycine induisent une augmentation des niveaux calciques dans la cellule ainsi que la phosphorylation de tous les isoformes de la protéine kinase C (PKC), résultant en l'activation robuste de la cellule. Une étude a démontré qu'en absence de l'isoforme θ de PKC, les cellules NK exhibent un profond défaut de l'expression de la cytokine IFN γ , récapitulant en partie le phénotype que nous avons observé dans nos travaux. Ceci démontre donc bien l'importance de cet isoforme dans la production de l'IFN γ suite à l'activation des cellules NK. Cependant, cette même étude a aussi démontré que l'induction de l'IFN γ par les cytokines IL-12 et IL-18 est indépendante de la PKC- θ , puisque les niveaux d'interféron étaient les mêmes entre les cellules NK WT et PKC- θ KO [171]. Cette observation est extrêmement intéressante puisqu'elle corrèle avec des travaux précédemment effectués chez les cellules NK de la souris NOD où une stimulation *in vitro* avec l'IL-12 et l'IL-18 arrive à restaurer la production d'IFN γ [172]. Ensemble, ces travaux offrent une piste sur la possible implication d'un tel mécanisme sur les défauts fonctionnels observés chez la NOD. Il serait alors pertinent de comparer les niveaux de l'isoforme θ de PKC entre les cellules NK de la B6 et de la NOD.

Les cellules NK dépendent fortement de l'expression de leurs récepteurs d'activation et d'inhibition Ly49 qui reconnaissent les CMH-1 du soi. La maturation fonctionnelle et les

fonctions effectrices déficientes que nous avons observées chez les cellules NK de la souris NOD pourraient donc sous-entendre un défaut dans l'expression de ces récepteurs ou de leurs ligands. Il est déjà bien établi que les modèles murins déficients en $\beta 2m$, une des sous-unités du CMH-1, exhibent des populations des cellules NK avec de profonds défauts cytotoxiques. Cependant, contrairement à nos résultats chez la NOD, ces cellules conservent une expression normale de granules et de cytokines [173]. Mise en contexte, cette étude sous-entend donc que le défaut fonctionnel observé chez les cellules NK de la NOD n'est pas dû à un problème d'éducation. De plus, il est important de noter que le même groupe a précédemment démontré que les cellules NK de la NOD ont l'haplotype du groupe de gènes *Ly49* qui contient le plus de récepteurs activateurs fonctionnels, toutes lignées confondues (Fig 4, p. 136). Avec un tel répertoire on devrait alors s'attendre à une forte activation de ces cellules NK, ce qui pourrait d'ailleurs aider à élucider le rôle controversé des cellules NK dans le diabète de type 1 [174]. Pourtant, les cellules NK de la NOD exhibent plutôt un phénotype fonctionnel inverse. Une des explications possibles pour une telle disparité pourrait être le fait que malgré leurs nombres, ces récepteurs n'arrivent pas à enclencher la cascade signalétique nécessaire afin d'induire une réponse effectrice adéquate. La molécule au centre de la transduction du signal reçu par tous les récepteurs *Ly49* est la protéine adaptatrice DAP12 qui pourrait alors être défectueuse chez les cellules NK de la souris NOD.

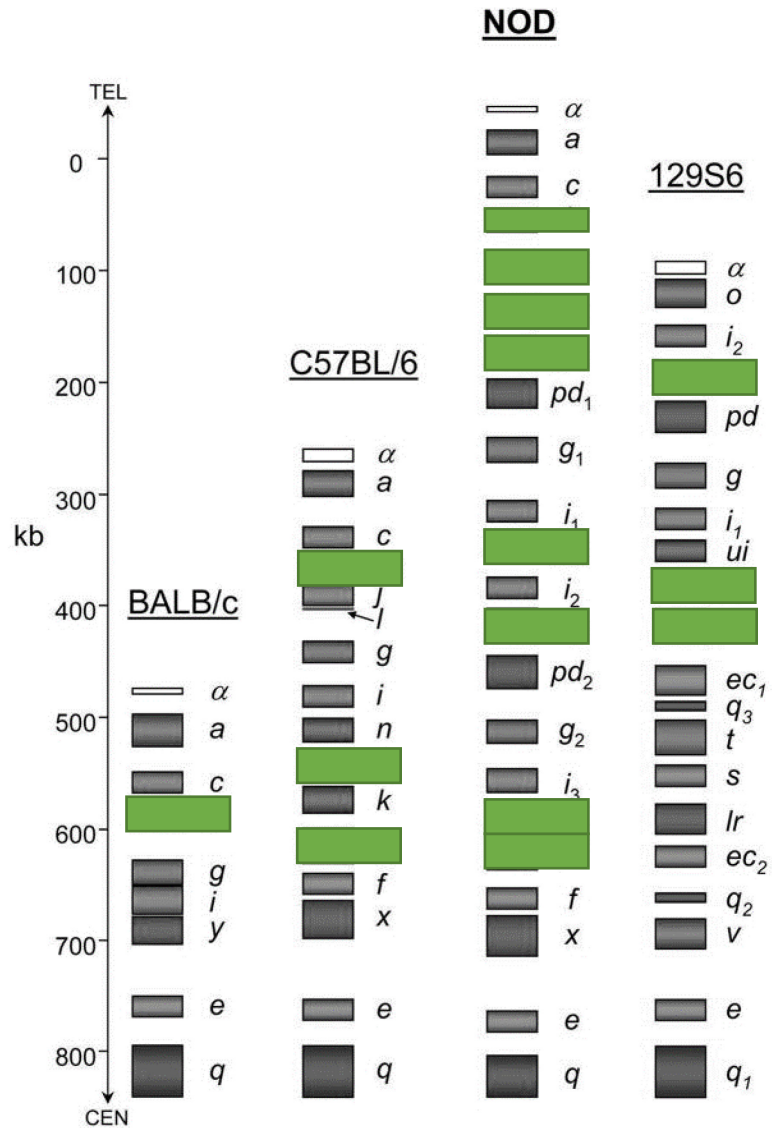


Figure 4. Haplotype du groupe de gènes des Ly49 parmi différentes lignées murines. L'échelle à gauche représente la distance relative, en kilobases, des gènes par rapport aux télomère (TEL) et centromère (CEN) du chromosome 6. Chaque gène est représenté par un rectangle. Les rectangles surlignés en verts représentent les gènes codant pour un Ly49 activateur (Ly49D, H, M, P, R, U, W). (adaptée de Bélanger et al., 2008)

Malgré le fait que ce mémoire s'est uniquement concentré sur les variations fonctionnelles des cellules NK entre des modèles murins, ces travaux sont tout de même hautement pertinents pour une application en clinique. Tout d'abord, un programme de maturation fonctionnelle est aussi retrouvé chez les cellules NK humaines. Effectivement, récemment un groupe a pu caractériser que les cellules NK humaines pouvaient aussi être classées en fonction de leur expression de CD27 et CD11b. Le groupe a pu aussi observer que la plus grande production de TNF α et IFN γ est contenue dans les stades CD27^{hi}CD11b^{lo} et CD27^{hi}CD11b^{hi} [175]. Jusqu'à maintenant, la classification fonctionnelle des cellules NK humaines était basée sur leur expression de la molécule d'adhésion CD56 (CD56^{bright} : cytokines, CD56^{dim} : cytotoxicité). La découverte d'un programme de maturation fonctionnelle à même les cellules NK CD56^{dim} rajoute alors un niveau supplémentaire de complexité en ce qui a trait à l'utilisation de ces cellules en immunothérapie. Autrement dit, l'utilisation de cellules NK CD56^{lo} ne serait pas garante de l'efficacité optimale de ces cellules à être cytotoxiques. De plus, la lignée murine *Trp53* émule la cohorte de patients humains atteints du syndrome de Li-Fraumeni caractérisé par une mutation germinale de ce gène. Alors que leur prédisposition à plusieurs types de cancers est bien caractérisée [176], l'activité de leurs cellules NK n'a jamais été étudiée. Cependant, les résultats présentés dans ce mémoire en absence de p53 dans un contexte murin appellent à une caractérisation fonctionnelle de cette population immunitaire chez les patients Li-Fraumeni. Ultiment, une meilleure compréhension du processus de maturation fonctionnelle ainsi que de son rôle à jouer dans les fonctions effectrices des cellules NK est cruciale pour le développement de traitements adéquats.

Conclusion

L'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK est intimement liée à leur processus de maturation fonctionnelle que l'on peut décrire en 4 étapes avec la molécule de costimulation CD27 et l'intégrine CD11b. Ce mémoire avait pour but de comprendre comment ce processus affecte l'activité cytotoxique de la population de cellules NK de la souris NOD qui a été démontrée à plusieurs reprises comme étant très peu cytotoxique. Nous avons en premier lieu pu établir que la souris NOD exhibe un profond défaut dans ce processus de maturation fonctionnelle qui ultimement biaise la population de cellules NK totales vers un phénotype moins fonctionnellement mature et par conséquent, moins cytotoxique. Par souci de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce défaut de maturation, nous avons réalisé des études de liaisons génétiques et bio-informatiques qui nous ont permis d'identifier le rôle de la protéine suppressive de tumeurs p53 dans ce processus. En plus de ce défaut de maturation, nous avons en deuxième temps pu identifier une fois de plus chez la NOD - grâce à des essais de stimulation *in vitro* - un profond défaut dans l'acquisition de la production d'IFN γ , TNF α et Granzyme B au cours de la maturation fonctionnelle. Nous avons de plus identifié un défaut d'induction du récepteur d'activation NKG2D tout au long du processus, même après l'activation des cellules NK. Finalement, l'utilisation de chimères B6.SJL / B6.Trp53^{-/-} a permis de mettre en évidence que le défaut de maturation fonctionnelle associé à l'absence de p53 pouvait être compensé par un fond génétique non déficient pour cette protéine.

Avec l'intégration de plus en plus importante de l'immunothérapie dans les traitements anticancéreux, il est essentiel de mieux comprendre comment les variations génétiques qui existent entre chaque individu affectent les fonctions antitumorales des cellules NK. La mise en évidence de mécanismes différents qui régiraient la maturation et l'acquisition fonctionnelle de

ces cellules pourrait à long terme offrir une meilleure flexibilité thérapeutique en menant au développement de traitements personnalisés dépendamment du phénotype de leurs cellules NK.

Bibliographie

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* (London, England). 2001;357(9270):1777-89.
2. Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*.4(3):a006049.
3. Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(12):826-37.
4. Turvey SE, Broide DH. Innate immunity. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2010;125(2 Suppl 2):S24-S32.
5. Eberl G, Colonna M, Di Santo JP, McKenzie ANJ. Innate Lymphoid Cells: a new paradigm in immunology. *Science* (New York, NY). 2015;348(6237):aaa6566-aaa.
6. Bernink JH, Peters CP, Munneke M, te Velde AA, Meijer SL, Weijer K, et al. Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. *Nature immunology*. 2013;14(3):221-9.
7. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, et al. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. *Immunity*. 2013;38(4):769-81.
8. Monticelli LA, Sonnenberg GF, Abt MC, Alenghat T, Ziegler CG, Doering TA, et al. Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. *Nature immunology*. 2011;12(11):1045-54.

9. Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eisley CJ, Erle DJ, et al. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(25):11489-94.
10. Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature*. 2010;464(7293):1367-70.
11. Coccia M, Harrison OJ, Schiering C, Asquith MJ, Becher B, Powrie F, et al. 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*. 2012;209(9):1595-609.
12. Sawa S, Lochner M, Satoh-Takayama N, Dulauroy S, Berard M, Kleinschek M, et al. RORgammat+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. *Nature immunology*. 2011;12(4):320-6.
13. Crellin NK, Cupedo T, Trifari S, Kaplan C, Spits H. Human lymphoid tissue inducer (LTi) cells are CD127+RORc+ and can be expanded ex vivo (91.11). *The Journal of Immunology*. 2009;182(1 Supplement):91.11-91.11.
14. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 21:313. *International immunology*. 2009;21(4):317-37.
15. Tang J, Lin G, Langdon WY, Tao L, Zhang J. Regulation of C-Type Lectin Receptor-Mediated Antifungal Immunity. *Frontiers in immunology*. 2018;9:123.
16. Davis BK, Wen H, Ting JPY. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annual review of immunology*. 2011;29:707-35.

17. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Adib-Conquy M, Cavaillon JM. Natural killer (NK) cells in antibacterial innate immunity: angels or devils? *Mol Med*. 2012;18:270-85.
18. King KY, Goodell MA. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(10):685-92.
19. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in immunology*. 2018;9:1869-.
20. Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Frontiers in immunology*. 2012;3:319.
21. Male V, Nisoli I, Kostrzewski T, Allan DS, Carlyle JR, Lord GM, et al. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(4):635-42.
22. Fathman JW, Bhattacharya D, Inlay MA, Seita J, Karsunky H, Weissman IL. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood*. 2011;118(20):5439-47.
23. Boggs SS, Trevisan M, Patrene K, Geogopoulos K. Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. *Natural immunity*. 1998;16(4):137-45.
24. Ikawa T, Fujimoto S, Kawamoto H, Katsura Y, Yokota Y. Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(9):5164-9.
25. Colucci F, Samson SI, DeKoter RP, Lantz O, Singh H, Di Santo JP. Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood*. 2001;97(9):2625-32.

26. Delconte RB, Shi W, Sathe P, Ushiki T, Seillet C, Minnich M, et al. The Helix-Loop-Helix Protein ID2 Governs NK Cell Fate by Tuning Their Sensitivity to Interleukin-15. *Immunity*. 2016;44(1):103-15.
27. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting CN, Walunas TL, Lanier LL, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*. 1998;9(4):555-63.
28. Ramirez K, Chandler KJ, Spaulding C, Zandi S, Sigvardsson M, Graves BJ, et al. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity*. 2012;36(6):921-32.
29. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 2004;20(4):477-94.
30. Samson SI, Richard O, Tavian M, Ranson T, Vosshenrich CA, Colucci F, et al. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity*. 2003;19(5):701-11.
31. Ali AK, Oh JS, Vivier E, Busslinger M, Lee SH. NK Cell-Specific Gata3 Ablation Identifies the Maturation Program Required for Bone Marrow Exit and Control of Proliferation. *Journal of immunology*. 2016;196(4):1753-67.
32. Taieb J, Chaput N, Menard C, Apetoh L, Ullrich E, Bonmort M, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nature medicine*. 2006;12(2):214-9.
33. Himoudi N, Nabarro S, Buddle J, Eddaoudi A, Thrasher AJ, Anderson J. Bone marrow-derived IFN-producing killer dendritic cells account for the tumoricidal activity of unpulsed dendritic cells. *Journal of immunology*. 2008;181(9):6654-63.

34. Chan CW, Crafton E, Fan HN, Flook J, Yoshimura K, Skarica M, et al. Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nature medicine*. 2006;12(2):207-13.
35. Guimont-Desrochers F, Boucher G, Dong Z, Dupuis M, Veillette A, Lesage S. Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK-cell differentiation. *Blood*. 2012;119(19):4349-57.
36. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun XH, et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood*. 2007;109(11):4825-931.
37. Kallies A, Carotta S, Huntington ND, Bernard NJ, Tarlinton DM, Smyth MJ, et al. A role for Blimp1 in the transcriptional network controlling natural killer cell maturation. *Blood*. 2011;117(6):1869-79.
38. van Helden MJ, Goossens S, Daussy C, Mathieu AL, Faure F, Marcais A, et al. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(12):2015-25.
39. Rabacal W, Pabbisetty SK, Hoek KL, Cendron D, Guo Y, Maseda D, et al. Transcription factor KLF2 regulates homeostatic NK cell proliferation and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(19):5370-5.
40. Simonetta F, Pradier A, Roosnek E. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Frontiers in immunology*. 2016;7:241.
41. Intlekofer AM, Takemoto N, Wherry EJ, Longworth SA, Northrup JT, Palanivel VR, et al. Effector and memory CD8⁺ T cell fate coupled by T-bet and eomesodermin. *Nature immunology*. 2005;6(12):1236-44.

42. Gordon SM, Chaix J, Rupp LJ, Wu J, Madera S, Sun JC, et al. The transcription factors Tbet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity*. 2012;36(1):55-67.
43. Daussy C, Faure F, Mayol K, Viel S, Gasteiger G, Charrier E, et al. Tbet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine*. 2014;211(3):563-77.
44. Yokoyama WM, Sojka DK, Peng H, Tian Z. Tissue-resident natural killer cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 2013;78:149-56.
45. Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, et al. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1444-56.
46. Takeda K, Cretney E, Hayakawa Y, Ota T, Akiba H, Ogasawara K, et al. TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood*. 2005;105(5):2082-9.
47. Paust S, Gill HS, Wang B-Z, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, et al. Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nature immunology*. 2010;11(12):1127-35.
48. Peng H, Tian Z. Diversity of tissue-resident NK cells. *Seminars in immunology*. 2017;31:3-10.
49. Chen Z, Zhang J, Hatta K, Lima PD, Yadi H, Colucci F, et al. DBA-lectin reactivity defines mouse uterine natural killer cell subsets with biased gene expression. *Biology of reproduction*. 2012;87(4):81.

50. Cortez VS, Cervantes-Barragan L, Robinette ML, Bando JK, Wang Y, Geiger TL, et al. Transforming Growth Factor- β Signaling Guides the Differentiation of Innate Lymphoid Cells in Salivary Glands. *Immunity*. 2016;44(5):1127-39.
51. Victorino F, Sojka DK, Brodsky KS, McNamee EN, Masterson JC, Homann D, et al. Tissue-Resident NK Cells Mediate Ischemic Kidney Injury and Are Not Depleted by Anti-Asialo-GM1 Antibody. *Journal of immunology*. 2015;195(10):4973-85.
52. Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, de Boer J, Williams O, Seddon B, et al. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nature immunology*. 2009;10(10):1118-24.
53. Taki S, Nakajima S, Ichikawa E, Saito T, Hida S. IFN regulatory factor-2 deficiency revealed a novel checkpoint critical for the generation of peripheral NK cells. *Journal of immunology*. 2005;174(10):6005-12.
54. Lohoff M, Duncan GS, Ferrick D, Mittrucker HW, Bischof S, Prechtel S, et al. Deficiency in the transcription factor interferon regulatory factor (IRF)-2 leads to severely compromised development of natural killer and T helper type 1 cells. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(3):325-36.
55. Lacorazza HD, Miyazaki Y, Di Cristofano A, Deblasio A, Hedvat C, Zhang J, et al. The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity*. 2002;17(4):437-49.
56. Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *Journal of immunology*. 1983;131(4):1789-96.

57. Sedlmayr P, Schallhammer L, Hammer A, Wilders-Truschnig M, Wintersteiger R, Dohr G. Differential phenotypic properties of human peripheral blood CD56dim⁺ and CD56bright⁺ natural killer cell subpopulations. *International archives of allergy and immunology*. 1996;110(4):308-13.
58. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, et al. Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *Journal of immunology*. 1998;161(1):400-8.
59. Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, et al. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nature immunology*. 2002;3(6):523-8.
60. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *Journal of immunology*. 2006;176(3):1517-24.
61. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*. 2009;113(22):5488-96.
62. Yu J, Wei M, Mao H, Zhang J, Hughes T, Mitsui T, et al. CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets. *Journal of immunology*. 2009;183(8):4968-74.
63. Boudreau JE, Hsu KC. Natural Killer Cell Education and the Response to Infection and Cancer Therapy: Stay Tuned. *Trends Immunol*. 2018.
64. Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews Immunology*. 2012;12(4):239-52.
65. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 2005;436(7051):709-13.

66. Lowin-Kropf B, Kunz B, Beermann F, Held W. Impaired natural killing of MHC class I-deficient targets by NK cells expressing a catalytically inactive form of SHP-1. *Journal of immunology*. 2000;165(3):1314-21.
67. He Y, Tian Z. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cellular & Molecular Immunology*. 2016;14:321.
68. Ogasawara K, Hamerman JA, Hsin H, Chikuma S, Bour-Jordan H, Chen T, et al. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity*. 2003;18(1):41-51.
69. Sun JC, Lanier LL. Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. *The Journal of experimental medicine*. 2008;205(8):1819-28.
70. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(10):2065-72.
71. Wagner AK, Wickstrom SL, Talerico R, Salam S, Lakshmikanth T, Brauner H, et al. Retuning of Mouse NK Cells after Interference with MHC Class I Sensing Adjusts Self-Tolerance but Preserves Anticancer Response. *Cancer immunology research*. 2016;4(2):113-23.
72. Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol*. 2009;30(4):143-9.
73. He Y, Peng H, Sun R, Wei H, Ljunggren HG, Yokoyama WM, et al. Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education. *Journal of autoimmunity*. 2017;81:1-12.
74. Waksman G, Kumaran S, Lubman O. SH2 domains: role, structure and implications for molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2004;6(3):1-18.

75. Veillette A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunological reviews*. 2006;214:22-34.
76. Veillette A. SLAM Family Receptors Regulate Immunity with and without SAP-related Adaptors. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(9):1175-8.
77. Hare NJ, Ma CS, Alvaro F, Nichols KE, Tangye SG. Missense mutations in SH2D1A identified in patients with X-linked lymphoproliferative disease differentially affect the expression and function of SAP. *International immunology*. 2006;18(7):1055-65.
78. Morra M, Simarro-Grande M, Martin M, Chen AS, Lanyi A, Silander O, et al. Characterization of SH2D1A missense mutations identified in X-linked lymphoproliferative disease patients. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(39):36809-16.
79. Toth B, Soltesz B, Gyimesi E, Csorba G, Veres A, Lanyi A, et al. Severe XLP Phenotype Caused by a Novel Intronic Mutation in the SH2D1A Gene. *Journal of clinical immunology*. 2015;35(1):26-31.
80. Dong Z, Veillette A. How do SAP family deficiencies compromise immunity? *Trends Immunol*. 2010;31(8):295-302.
81. Chen S, Yang M, Du J, Li D, Li Z, Cai C, et al. The Self-Specific Activation Receptor SLAM Family Is Critical for NK Cell Education. *Immunity*. 2016;45(2):292-304.
82. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;9(5):503-10.
83. Paul S, Lal G. The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1124.

84. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009;128(1):7-15.
85. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(9):713-25.
86. Menasche G, Pastural E, Feldmann J, Certain S, Ersoy F, Dupuis S, et al. Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet*. 2000;25(2):173-6.
87. Wilson SM, Yip R, Swing DA, O'Sullivan TN, Zhang Y, Novak EK, et al. A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(14):7933-8.
88. Haddad EK, Wu X, Hammer JA, 3rd, Henkart PA. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from Ashen mice. *J Cell Biol*. 2001;152(4):835-42.
89. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 2004;16(2):139-44.
90. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2015;6:368.
91. Chan WK, Sutherland MK, Li Y, Zalevsky J, Schell S, Leung W. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity overcomes NK cell-resistance in MLL-rearranged leukemia expressing inhibitory KIR ligands but not activating ligands. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2012;18(22):6296-305.
92. Seidel U, Schlegel P, Lang P. Natural Killer Cell Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Tumor Immunotherapy with Therapeutic Antibodies. *Frontiers in immunology*. 2013;4(76).

93. Chung AW, Rollman E, Center RJ, Kent SJ, Stratov I. Rapid degranulation of NK cells following activation by HIV-specific antibodies. *Journal of immunology*. 2009;182(2):1202-10.
94. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 2000;88(3):577-83.
95. Takanami I, Takeuchi K, Giga M. The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2001;121(6):1058-63.
96. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002;35(1):23-8.
97. Ballas ZK, Buchta CM, Rosean TR, Heusel JW, Shey MR. Role of NK cell subsets in organ-specific murine melanoma metastasis. *PLoS One*. 2013;8(6):e65599.
98. Zamai L, Ponti C, Mirandola P, Gobbi G, Papa S, Galeotti L, et al. NK cells and cancer. *Journal of immunology*. 2007;178(7):4011-6.
99. Gilfillan S, Ho EL, Cella M, Yokoyama WM, Colonna M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nature immunology*. 2002;3(12):1150-5.
100. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 1999;285(5428):727-9.
101. Jamieson AM, Diefenbach A, McMahon CW, Xiong N, Carlyle JR, Raulet DH. The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 2002;17(1):19-29.

102. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *Journal of immunology*. 2002;169(8):4079-83.
103. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature immunology*. 2000;1(2):119-26.
104. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, et al. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity*. 2000;12(6):721-7.
105. Spear P, Wu M-R, Sentman M-L, Sentman CL. NKG2D ligands as therapeutic targets. *Cancer immunity*. 2013;13:8-.
106. Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(20):11521-6.
107. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature*. 2001;413(6852):165-71.
108. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, et al. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *Journal of immunology*. 2005;175(2):720-9.
109. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008;28(4):571-80.

110. Iwasaki A, Welker R, Mueller S, Linehan M, Nomoto A, Wimmer E. Immunofluorescence analysis of poliovirus receptor expression in Peyer's patches of humans, primates, and CD155 transgenic mice: implications for poliovirus infection. *J Infect Dis.* 2002;186(5):585-92.
111. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* 2005;105(5):2066-73.
112. Tahara-Hanaoka S, Shibuya K, Kai H, Miyamoto A, Morikawa Y, Ohkochi N, et al. Tumor rejection by the poliovirus receptor family ligands of the DNAM-1 (CD226) receptor. *Blood.* 2006;107(4):1491-6.
113. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(13):2959-64.
114. Yu J, Mitsui T, Wei M, Mao H, Butchar JP, Shah MV, et al. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *The Journal of clinical investigation.* 2011;121(4):1456-70.
115. Halfteck GG, Elboim M, Gur C, Achdout H, Ghadially H, Mandelboim O. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *Journal of immunology.* 2009;182(4):2221-30.
116. Glasner A, Ghadially H, Gur C, Stanietsky N, Tsukerman P, Enk J, et al. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *Journal of immunology.* 2012;188(6):2509-15.

117. Glasner A, Isaacson B, Viukov S, Neuman T, Friedman N, Mandelboim M, et al. Increased NK cell immunity in a transgenic mouse model of NKp46 overexpression. *Scientific reports*. 2017;7(1):13090.
118. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology*. 2004;5(12):1260-5.
119. Mocikat R, Braumuller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003;19(4):561-9.
120. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(3):230-52.
121. Kelly JM, Darcy PK, Markby JL, Godfrey DI, Takeda K, Yagita H, et al. Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nature immunology*. 2002;3(1):83-90.
122. Waggoner SN, Reighard SD, Gyurova IE, Cranert SA, Mahl SE, Karnele EP, et al. Roles of natural killer cells in antiviral immunity. *Current opinion in virology*. 2016;16:15-23.
123. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine*. 1989;320(26):1731-5.
124. Lee SH, Miyagi T, Biron CA. Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol*. 2007;28(6):252-9.
125. Mitrovic M, Arapovic J, Jordan S, Fodil-Cornu N, Ebert S, Vidal SM, et al. The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *J Virol*. 2012;86(4):2165-75.

126. Kielczewska A, Pyzik M, Sun T, Krmpotic A, Lodoen MB, Munks MW, et al. Ly49P recognition of cytomegalovirus-infected cells expressing H2-Dk and CMV-encoded m04 correlates with the NK cell antiviral response. *The Journal of experimental medicine*. 2009;206(3):515-23.
127. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*. 2001;409(6823):1055-60.
128. Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, et al. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nature immunology*. 2006;7(5):517-23.
129. Orange JS, Fassett MS, Koopman LA, Boyson JE, Strominger JL. Viral evasion of natural killer cells. *Nature immunology*. 2002;3(11):1006-12.
130. Pearson JA, Wong FS, Wen L. The importance of the Non Obese Diabetic (NOD) mouse model in autoimmune diabetes. *Journal of autoimmunity*. 2016;66:76-88.
131. Miyazaki A, Hanafusa T, Yamada K, Miyagawa J, Fujino-Kurihara H, Nakajima H, et al. Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study. *Clinical and experimental immunology*. 1985;60(3):622-30.
132. Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken dobutsu Experimental animals*. 1980;29(1):1-13.

133. Wang Y, Pontesilli O, Gill RG, La Rosa FG, Lafferty KJ. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(2):527-31.
134. Driver JP, Serreze DV, Chen Y-G. Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Seminars in Immunopathology*. 2011;33(1):67-87.
135. Delovitch TL, Singh B. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity*. 1997;7(6):727-38.
136. Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annual review of immunology*. 2005;23:447-85.
137. Negishi K, Waldeck N, Chandy G, Buckingham B, Kershner A, Fisher L, et al. Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986;29(6):352-7.
138. Nair MP, Lewis EW, Schwartz SA. Immunoregulatory dysfunctions in type I diabetes: natural and antibody-dependent cellular cytotoxic activities. *Journal of clinical immunology*. 1986;6(5):363-72.
139. Kataoka S, Satoh J, Fujiya H, Toyota T, Suzuki R, Itoh K, et al. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes*. 1983;32(3):247-53.
140. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, Tennent B, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *Journal of immunology*. 1995;154(1):180-91.

141. Maier LM, Howlett S, Rainbow K, Clark J, Howson JMM, Todd JA, et al. NKG2D - RAE-1 receptor-ligand variation does not account for the Natural Killer cell defect in nonobese diabetic mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2008;181(10):7073-80.
142. Brown MG, Fulmek S, Matsumoto K, Cho R, Lyons PA, Levy ER, et al. A 2-Mb YAC contig and physical map of the natural killer gene complex on mouse chromosome 6. *Genomics*. 1997;42(1):16-25.
143. Rogner UC, Boitard C, Morin J, Melanitou E, Avner P. Three loci on mouse chromosome 6 influence onset and final incidence of type I diabetes in NOD.C3H congenic strains. *Genomics*. 2001;74(2):163-71.
144. Ho EL, Heusel JW, Brown MG, Matsumoto K, Scalzo AA, Yokoyama WM. Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(11):6320-5.
145. Yokoyama WM, Ryan JC, Hunter JJ, Smith HR, Stark M, Seaman WE. cDNA cloning of mouse NKR-P1 and genetic linkage with LY-49. Identification of a natural killer cell gene complex on mouse chromosome 6. *Journal of immunology*. 1991;147(9):3229-36.
146. Montaldo E, Vitale C, Cottalasso F, Conte R, Glatzer T, Ambrosini P, et al. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood*. 2012;119(17):3987-96.
147. Carnaud C, Gombert J, Donnars O, Garchon H, Herbelin A. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *Journal of immunology*. 2001;166(4):2404-11.

148. Collin R, St-Pierre C, Guilbault L, Mullins-Dansereau V, Policheni A, Guimont-Desrochers F, et al. An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation. *Journal of immunology*. 2017;199(4):1490-504.
149. Biron CA. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current opinion in immunology*. 1997;9(1):24-34.
150. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *European journal of immunology*. 2001;31(6):1900-9.
151. Williams NS, Kubota A, Bennett M, Kumar V, Takei F. Clonal analysis of NK cell development from bone marrow progenitors in vitro: orderly acquisition of receptor gene expression. *European journal of immunology*. 2000;30(7):2074-82.
152. Collin R, Doyon K, Mullins-Dansereau V, Karam M, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, et al. Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, Idd2 and Idd13, in determining immunoregulatory DN T cell proportion. *Immunogenetics*. 2018.
153. Schmidt W, Steinlein P, Buschle M, Schweighoffer T, Herbst E, Mechtler K, et al. Transloading of tumor cells with foreign major histocompatibility complex class I peptide ligand: a novel general strategy for the generation of potent cancer vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(18):9759-63.
154. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Frontiers in immunology*. 2018;9:283.
155. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, et al. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7(6):753-63.

156. Shilling HG, Young N, Guethlein LA, Cheng NW, Gardiner CM, Tyan D, et al. Genetic control of human NK cell repertoire. *Journal of immunology*. 2002;169(1):239-47.
157. Takeda K, Nakayama M, Sakaki M, Hayakawa Y, Imawari M, Ogasawara K, et al. IFN-gamma production by lung NK cells is critical for the natural resistance to pulmonary metastasis of B16 melanoma in mice. *Journal of leukocyte biology*. 2011;90(4):777-85.
158. Grundy MA, Zhang T, Sentman CL. NK cells rapidly remove B16F10 tumor cells in a perforin and interferon-gamma independent manner in vivo. *Cancer Immunol Immunother*. 2007;56(8):1153-61.
159. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(3):a026104.
160. Zheng SJ, Lamhamedi-Cherradi SE, Wang P, Xu L, Chen YH. Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function. *Diabetes*. 2005;54(5):1423-8.
161. Yoon KW, Byun S, Kwon E, Hwang S-Y, Chu K, Hiraki M, et al. Control of signaling-mediated clearance of apoptotic cells by the tumor suppressor p53. *Science (New York, NY)*. 2015;349(6247):1261669-.
162. Taura M, Eguma A, Suico MA, Shuto T, Koga T, Komatsu K, et al. p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol*. 2008;28(21):6557-67.
163. Yan W, Wei J, Deng X, Shi Z, Zhu Z, Shao D, et al. Transcriptional analysis of immune-related gene expression in p53-deficient mice with increased susceptibility to influenza A virus infection. *BMC Medical Genomics*. 2015;8:52.

164. Wang B, Niu D, Lai L, Ren EC. p53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature communications*. 2013;4:2359.
165. Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer research*. 2011;71(18):5998-6009.
166. Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulat DH. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(10):2057-69.
167. Bennett M, Macdonald K, Chan S-W, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell Surface Trafficking of Fas: A Rapid Mechanism of p53-Mediated Apoptosis. *Science*. 1998;282(5387):290-3.
168. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewska J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, et al. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol*. 2005;7(2):195-201.
169. Yang C, Tsaih SW, Lemke A, Flister MJ, Thakar MS, Malarkannan S. mTORC1 and mTORC2 differentially promote natural killer cell development. *eLife*. 2018;7.
170. Zhou X, Liu W, Hu X, Dorrance A, Garzon R, Houghton PJ, et al. Regulation of CHK1 by mTOR contributes to the evasion of DNA damage barrier of cancer cells. *Scientific reports*. 2017;7(1):1535.
171. Tassi I, Cella M, Presti R, Colucci A, Gilfillan S, Littman DR, et al. NK cell-activating receptors require PKC- θ for sustained signaling, transcriptional activation, and IFN- γ secretion. *Blood*. 2008;112(10):4109-16.

172. Johansson SE, Hall H, Bjorklund J, Hoglund P. Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-18 in vitro. *International immunology*. 2004;16(1):1-11.
173. Bélanger S, Tu MM, Rahim MMA, Mahmoud AB, Patel R, Tai L-H, et al. Impaired natural killer cell self-education and “missing-self” responses in Ly49-deficient mice. *Blood*. 2012;120(3):592-602.
174. Bélanger S, Tai LH, Anderson SK, Makrigiannis AP. Ly49 cluster sequence analysis in a mouse model of diabetes: an expanded repertoire of activating receptors in the NOD genome. *Genes and immunity*. 2008;9(6):509-21.
175. Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(3):350-9.
176. Merino D, Malkin D. p53 and hereditary cancer. *Sub-cellular biochemistry*. 2014;85:1-16.

Annexe 1: Figures supplémentaires

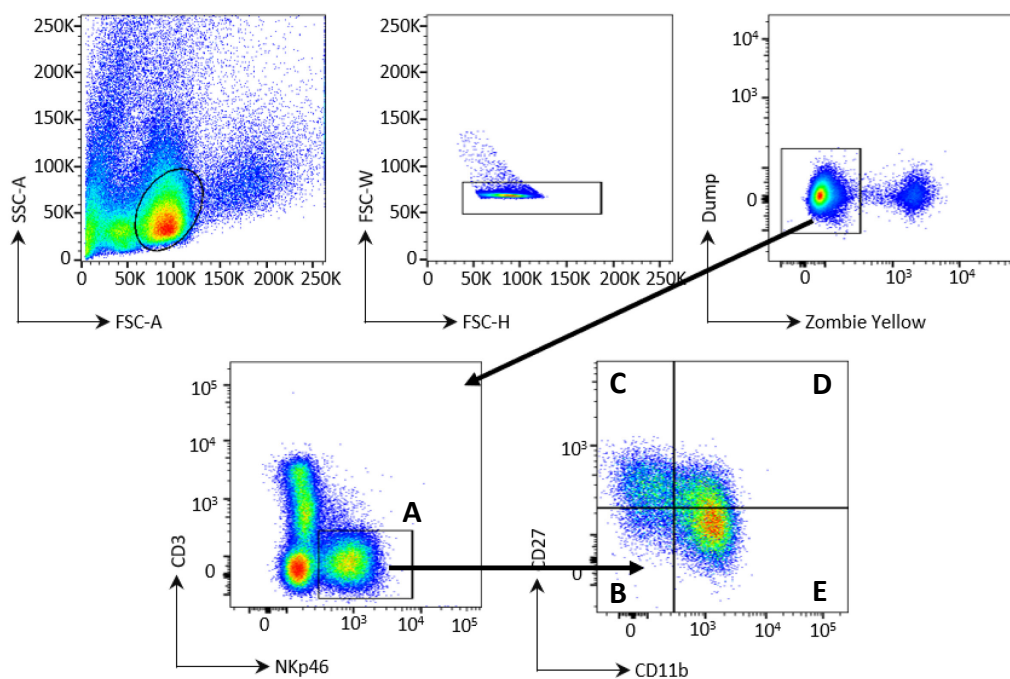


Figure supplémentaire 1. Stratégie de gating pour les populations de cellules NK totales et leurs stades de maturation suite à la stimulation *ex vivo* pour les cellules NK des lignées B6, NOD, B6.NODIdd1, B6.Rag et NOD.Rag. Tout d'abord, une gate FSC-SSC est appliquée pour les cellules NK suivant l'application d'une backgate sur les cellules NKp46⁺. Par la suite, les doublets et les cellules mortes sont retirés, puis les cellules NK sont sélectionnées et les cellules T exclues avec une gate CD3⁻NKp46⁺. Finalement, les stades de maturation fonctionnelle des cellules NK sont identifiées avec les marqueurs CD27 et CD11b. La gate de cellules NK totales (A) et les gates des stades de maturation (B à E) sont utilisées pour la quantification des effecteurs IFN γ , TNF α , Granzyme B et du marqueur de dégranulation CD107a.

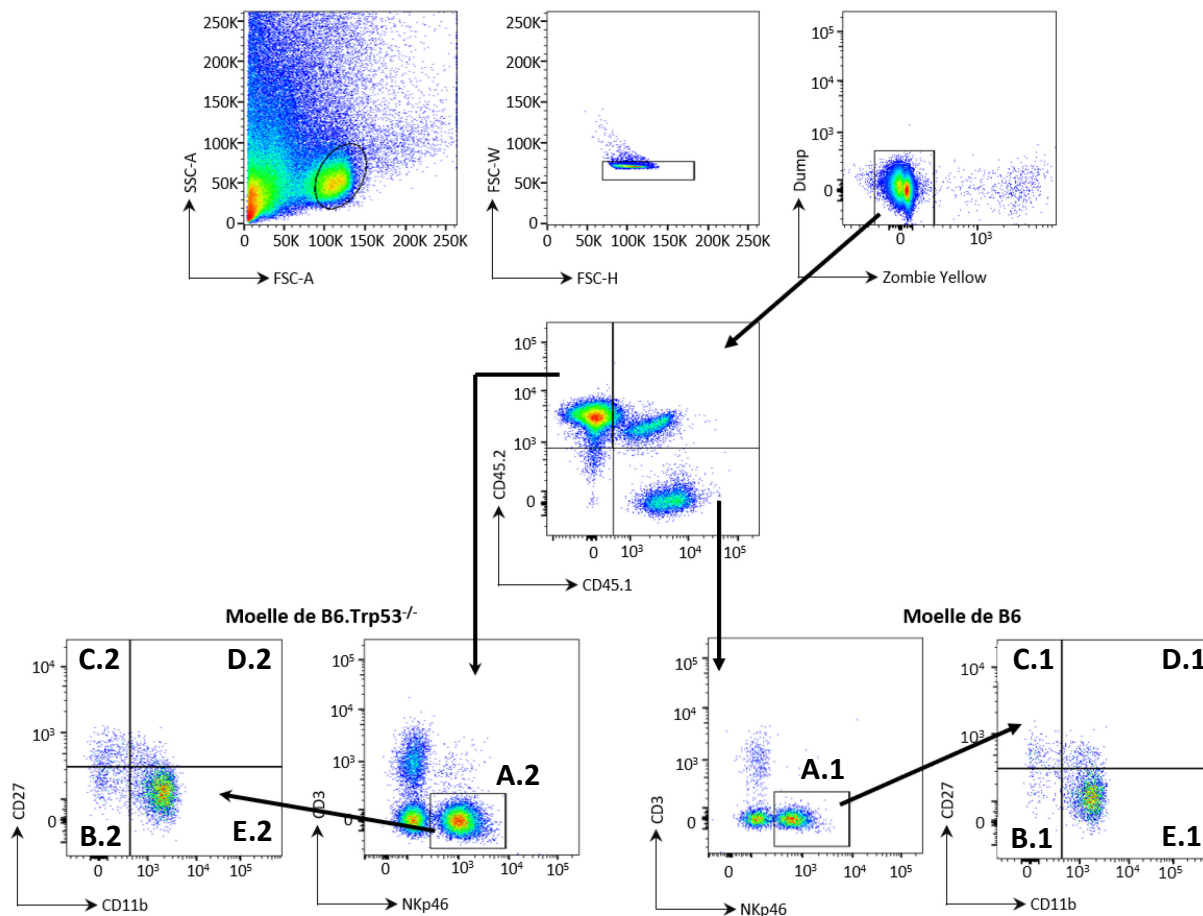


Figure supplémentaire 2. Stratégie de gating pour les populations de cellules NK totales et leurs stades de maturation suite à la stimulation *ex vivo* sur les chimères hématopoïétiques B6 / B6.Trp53^{-/-}. Tout d'abord, une gate FSC-SSC est appliquée pour les cellules NK suivant l'application d'une backgate sur les cellules NKp46⁺. Par la suite, les doublets et les cellules mortes sont retirés, puis les cellules hématopoïétiques des moelles B6 et B6.Trp53^{-/-} sont sélectionnées avec leur expression de CD45.1 ou CD45.2, respectivement. Finalement, les cellules NK totales (CD3⁺NKp46⁺) sont sélectionnées et leurs stades de maturation fonctionnelle sont identifiés avec les marqueurs CD27 et CD11b. La gate de cellules NK totales (A) et les gates des stades de maturation (B à E) sont utilisées pour la quantification des effecteurs IFN γ , TNF α , Granzyme B et du marqueur de dégranulation CD107a.

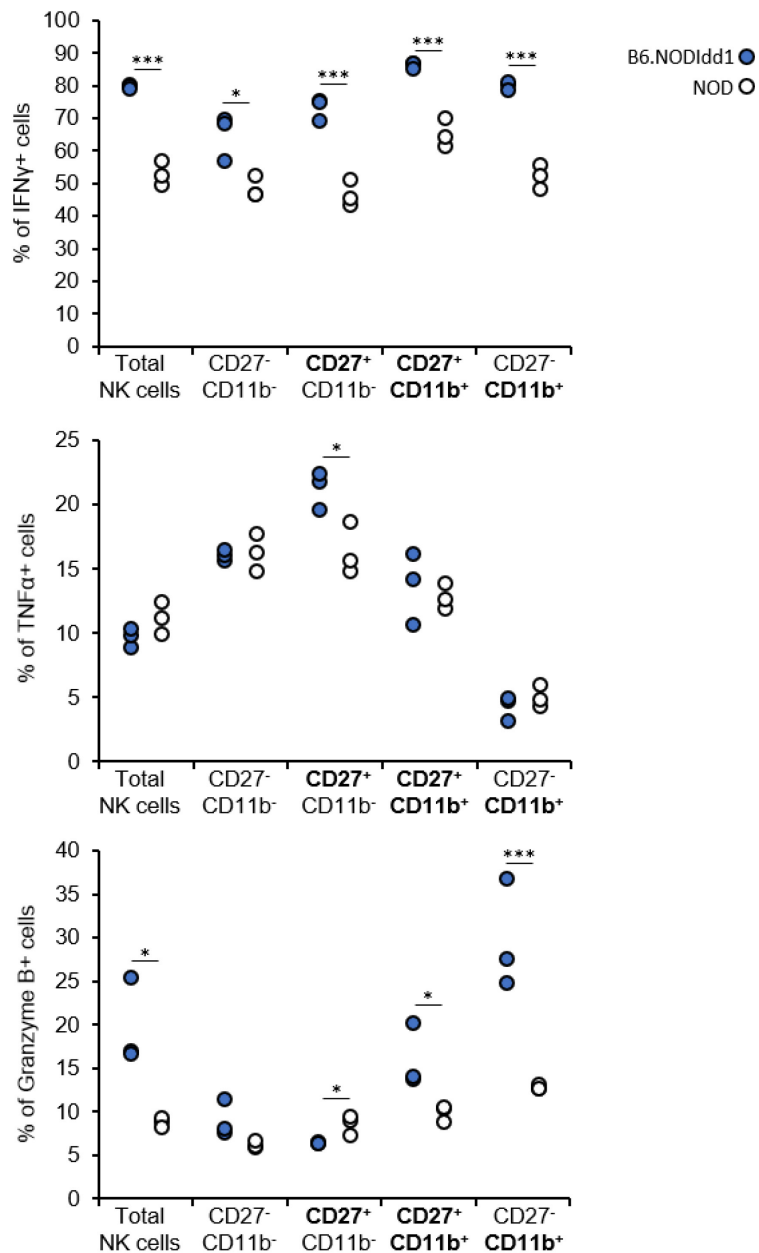


Figure supplémentaire 3. Les fonctions effectrices sont conservées dans les souris B6 portant l'haplotype du CMH de la souris NOD (B6.NODIdd1). Les cellules NK des rates de souris B6.NODIdd1 et NOD furent stimulées avec de la PMA/ ionomycine et BFA pendant 6h. Les graphiques représentent le pourcentage de cellules NK (CD3⁻ NKp46⁺) positives pour IFN γ , TNF α et GrzB dans la population de cellules NK totales et dans chacun des stades de la maturation fonctionnelle.

Annexe 2: Articles

ANNEXE 2.1: An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation



Free
Magnet Offer



An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation

This information is current as of May 5, 2018.

Roxanne Collin, Charles St-Pierre, Lorie Guilbault, Victor Mullins-Dansereau, Antonia Policheni, Fanny Guimont-Desrochers, Adam-Nicolas Pelletier, Daniel H. Gray, Elliot Drobetsky, Claude Perreault, Erin E. Hillhouse and Sylvie Lesage

J Immunol 2017; 199:1490-1504; Prepublished online 14 July 2017;
doi: 10.4049/jimmunol.1600789
<http://www.jimmunol.org/content/199/4/1490>

Supplementary Material <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2017/07/14/jimmunol.1600789.DCSupplemental>

References This article cites **74 articles**, 34 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/199/4/1490.full#ref-list-1>

Why *The JI*? [Submit online.](#)

- **Rapid Reviews! 30 days*** from submission to initial decision
- **No Triage!** Every submission reviewed by practicing scientists
- **Fast Publication!** 4 weeks from acceptance to publication

**average*

Subscription Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscription>

Permissions Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/About/Publications/JI/copyright.html>

Email Alerts Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/alerts>

The Journal of Immunology is published twice each month by The American Association of Immunologists, Inc., 1451 Rockville Pike, Suite 650, Rockville, MD 20852
Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.



An Unbiased Linkage Approach Reveals That the p53 Pathway Is Coupled to NK Cell Maturation

Roxanne Collin,^{*,†} Charles St-Pierre,^{‡,§} Lorie Guilbault,^{*,†} Victor Mullins-Dansereau,^{*,†} Antonia Policheni,^{¶,||} Fanny Guimont-Desrochers,^{*,†} Adam-Nicolas Pelletier,^{*,†} Daniel H. Gray,^{¶,||} Elliot Drobetsky,^{*} Claude Perreault,^{‡,§} Erin E. Hillhouse,^{*,1} and Sylvie Lesage^{*,†,1}

Natural killer cells constitute potent innate lymphoid cells that play a major role in both tumor immunosurveillance and viral clearance via their effector functions. A four-stage model of NK cell functional maturation has been established according to the expression of CD11b and CD27, separating mature NK (mNK) cells into distinct populations that exhibit specific phenotypic and functional properties. To identify genetic factors involved in the regulation of NK cell functional maturation, we performed a linkage analysis on F₂ (B6.Rag1^{-/-} × NOD.Rag1^{-/-} intercross) mice. We identified six loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11, and 18 that were linked to one or more mNK cell subsets. Subsequently, we performed an in silico analysis exploiting mNK cell subset microarray data, highlighting various genes and microRNAs as potential regulators of the functional maturation of NK cells. Together, the combination of our unbiased genetic linkage study and the in silico analysis positions genes known to affect NK cell biology along the specific stages of NK cell functional maturation. Moreover, this approach allowed us to uncover a novel candidate gene in the regulation of NK cell maturation, namely *Trp53*. Using mice deficient for *Trp53*, we confirm that this tumor suppressor regulates NK cell functional maturation. Additional candidate genes revealed in this study may eventually serve as targets for the modulation of NK cell functional maturation to potentiate both tumor immunosurveillance and viral clearance. *The Journal of Immunology*, 2017, 199: 1490–1504.

Natural killer cells are innate lymphoid cells whose potent effector functions are important for both tumor immunosurveillance and viral clearance. Indeed, NK cells exhibit cytotoxic activity and the ability to rapidly produce and secrete vast amounts of chemokines and cytokines. NK cells acquire these properties in a sequential manner involving multiple stages of development. The first stage is defined as the pre-NK cell precursor, giving rise sequentially to NK cell precursor, immature NK cells, and finally mature NK (mNK) cells expressing the surface molecule CD49b (1, 2). Subsequently, mNK cells undergo a four-stage maturation process defined by the regulated expression of CD11b and CD27. Specifically, the first mNK cell functional maturation subset expresses low levels of both CD11b and CD27 [hereafter referred to as double negative (DN)]. DN mNK cells then follow a CD11b^{low}CD27^{high} (named CD11b^{low}) → CD11b^{high}CD27^{high}

[double positive (DP)] → CD11b^{high}CD27^{low} (CD27^{low}) differentiation process (3). Notably, Chiosso et al. (3) found that the least mature (DN and CD11b^{low}) and most mature (DP and CD27^{low}) mNK cells largely differ by their specialization in proliferation and effector functions, respectively.

Various lines of evidence indicate that transcription factors and microRNAs (miRNAs) can influence mNK differentiation. Indeed, deficiency in *Gata3*, *Id2*, *Nfil3*, *miR150*, or *miR-15a/16* leads to a decrease in the proportion of CD27^{low} mNK cells (4–9). *Eomes*, *Tbx21* (T-bet), *Myb*, *Zeb2*, and *miR155* also influence NK cell differentiation at specific stages of functional maturation (3, 8, 10–13). Although *Eomes*, *Myb*, and *Zeb2* play a more prominent role during the later stages (3, 8, 10, 13), *Tbx21* is believed to play a role at both the early and later stages of functional maturation (10, 12). In contrast, *miR155* inhibits NK cell maturation as

^{*}Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada; [†]Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada; [‡]Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada; [§]Département de Médecine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada; [¶]Molecular Genetics of Cancer Division, Immunology Division, Walter and Eliza Hall Institute, Parkville, Victoria 3052, Australia; and ^{||}Department of Medical Biology, Melbourne University, Parkville, Victoria 3052, Australia
¹E.E.H. and S.L. contributed equally to this work.

ORCID: 0000-0002-4776-8696 (R.C.); 0000-0003-2744-9986 (V.M.-D.); 0000-0001-8371-1921 (F.G.-D.); 0000-0002-8457-8242 (D.H.G.); 0000-0002-0991-4314 (E.D.); 0000-0001-9453-7383 (C.P.); 0000-0002-0968-2795 (S.L.).

Received for publication May 4, 2016. Accepted for publication June 18, 2017.

This work was supported by research funds from the Cancer Research Society to S.L. (20379) and from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (06531). S.L. holds a senior scholarship from the Fonds de Recherche-Santé Québec, R.C. holds a studentship from the Fonds de Recherche-Santé Québec, and L.G. and V.M.-D. both hold a scholarship from Diabète Québec and from l'Université de Montréal.

R.C., C.S.-P., F.G.-D., A.-N.P., D.H.G., E.D., C.P., and S.L. designed the research; R.C., A.P., L.G., V.M.-D., A.-N.P., and F.G.-D. performed the research; R.C., C.S.-P., V.M.-D., D.H.G., E.E.H., and S.L. analyzed the data; R.C., C.S.-P., V.M.-D., and E.E.H. prepared the figures; E.E.H. and S.L. wrote the paper; and all authors read and approved the final manuscript.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Erin E. Hillhouse or Dr. Sylvie Lesage, Department of Immunology-Oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC H1T 2M4, Canada (E.E.H.) or Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada (S.L.).

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: B6, C57BL/6; DC, dendritic cell; DEG, differentially expressed gene; DN, double negative; DP, double positive; GEO, Gene Expression Omnibus; IPA, Ingenuity-based pathway analysis; LOD, logarithm of odds; MFI, mean fluorescence intensity; miRNA, microRNA; mNK, mature NK; *Nkfm*, NK functional maturation; SNP, single nucleotide polymorphism; URA, upstream regulator analysis.

Copyright © 2017 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/17/\$30.00

miR155-deficient NK cells exhibit a more mature phenotype with an increase in the frequency of the CD27^{low} subset (14).

In addition to transcription factors and miRNAs, other genes also influence NK cell differentiation (15). As a follow-up to our study identifying genetic loci linked to the proportion of NK cells (16), in this study we aimed to identify the key genetic determinants involved in mNK cell functional maturation, more specifically to identify the molecular pathways defining the transition between the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} stages of mNK cell development. To this end, we used an unbiased genetic approach that indiscriminately addresses the contribution of all genetic determinants to variations in mNK cell functional maturation. We performed a linkage analysis that allowed for the identification of six significant loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11, and 18, suggesting a multigenic regulation of NK cell functional maturation. To restrict the list of candidate genes located within these intervals, we performed an *in silico* analysis based on data available through the Gene Expression Omnibus (GEO) repository. Our analysis allowed us to highlight various molecular pathways and candidate genes regulating the specific stages of NK cell functional maturation. Lastly, we validated *Trp53* as a gene regulating the functional maturation of NK cells. This study brings not only insight into the biology of NK cell maturation, but also unveils novel candidate genes regulating the functional maturation of NK cells, which is of relevance to both tumor immunosurveillance and viral clearance.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6 (B6), NOD, B6.Rag1^{-/-}, NOD.Rag1^{-/-}, and B6.Trp53^{-/-} mice were purchased from the Jackson Laboratory. All of these strains were subsequently maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada). F1.Rag (B6.Rag1^{-/-} × NOD.Rag1^{-/-}) and F2.Rag (F1.Rag × F1.Rag) mice were bred in house from the parental strains. For phenotypic analyses, 6–10 wk old mice were used. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved the experimental procedures.

Flow cytometry

Spleens were treated with collagenase (1 mg/ml in PBS, Type V from *Clostridium histolyticum*; Sigma-Aldrich) for 15 min at 37°C and passed through a 70 μm cell strainer (BD Biosciences) to yield single-cell suspensions prior to staining with Abs. CD11b (clone M1/70), CD122 (clone TM-B1), CD27 (clone LG.3A10), CD3 (clone 17A2), B220 (clone RA3-6B2), CD19 (clone 6D5), CD45.1 (clone A20), CD45.2 (clone 104), Annexin V, and Zombie Aqua Dye Amcyan Abs were purchased from BioLegend; CD49b (clone DX5), NKp46 (clone 29A1.4), T-bet (clone eBio4B10), and Eomes (clone Dan1.1mag) from eBioscience; Ki-67 (clone B56) from BD Biosciences; LIVE/DEAD Fixable Yellow from Thermo Fisher Scientific; and p53 (clone 1C12) from Cell Signaling Technology. The Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set was used for intracellular staining according to the manufacturer's instructions (eBioscience). Annexin V staining was performed in buffer containing HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, and CaCl₂ 1.8 mM. All samples were acquired using FACSCanto I (BD Biosciences), Fortessa 1 (BD Biosciences), or Fortessa x-20 (BD Biosciences), and were analyzed using the FlowJo software (Tree Star, Ashland). After excluding doublets, CD3⁺CD19⁻ cells were excluded for Rag1-sufficient mice, followed by the application of a strict size exclusion backgate to the forward light scatter/side scatter profile corresponding to live CD122⁺CD49b⁺ NK cells for both Rag1-sufficient and -deficient mice. NK subsets were then separated based on their expression of CD11b and CD27.

Linkage analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2.Rag male and female mice by using the DNeasy blood and tissue kit from Qiagen. Single nucleotide polymorphisms were then detected from the F2.Rag mice DNA using the Illumina mouse low density linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, ON, Canada. Marker location (in megabases) was determined using the National Center for Biotechnology Information Build m37. The logarithm of odds (LOD) scores

were obtained through a single- or two-dimensional quantitative trait locus model using the R/qtl package (17, 18) for the R software (version 2.11.1) with the Haley–Knott algorithm to increase single nucleotide polymorphism (SNP) resolution. LOD scores higher than 3.54 were significant for single-dimensional analysis according to permutation tests ($n = 10,000$, $p = 0.05$), and LOD scores between 2.14 and 3.54 were considered suggestive. A Pearson Chi-Square for allele frequencies confirmed that all the significant and suggestive loci did not differ from the Hardy–Weinberg equilibrium. For the NK functional maturation (*Nkfm*) 2 locus, the distal part of chromosome 7 starting at 100.84 Mb was excluded from the Bayes interval analysis because of the bimodal LOD score distribution.

Statistical analysis

Data for the various experiments were tested for significance using a nonparametric Mann–Whitney *U* test with a minimal threshold of 0.05, or a paired Student *t* test with a minimal threshold of 0.05 in the analysis of p53 expression. Estimation of the interval coordinates was obtained using a 95% Bayes interval test. Significance for the genotype distribution differences was tested with an ANOVA and Games–Howell post hoc test. Normality of distributions was determined using a Shapiro–Wilk test. All statistical analyses and the F₂ distribution were obtained using the SPSS 19.0 software.

Ingenuity pathway analysis

Fold changes (>1.5) in microarray datasets for B6.Rag2^{-/-} mNK cell subsets from Chiossone et al. (3) were tabulated and uploaded into the Ingenuity-based pathway analysis (IPA) software (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com>). To predict the activation state of transcription factors and other regulators based on their effect on expression of downstream target genes, we performed an upstream regulator analysis (URA). The IPA regulation z-score algorithm was used to predict the direction of change for a given function (increase or decrease). A z-score >2 or <-2 means that a function is significantly increased or decreased, respectively, for all significantly enriched groups of genes ($p < 0.05$).

Results

Identification of a block in the functional maturation of NK cells from the NOD background

NOD mice are known to possess NK cells that exhibit multiple functional defects (16, 19–24). Consequently, we first set out to determine whether NOD NK cells displayed any disparities in the four-stage model of functional maturation relative to those from B6 mice. To select for NK cells in both B6 and NOD mice, we performed flow cytometry and gated on CD3⁺CD19⁻B220⁻CD122⁺CD49b⁺ cells (Fig. 1A). Addition of NKp46 to this gating strategy did not improve our ability to select for NK cells and was thus not included in our subsequent analyses (Supplemental Fig. 1). To assess the functional maturation of NK cells, we subsequently verified the expression of CD27 and CD11b on the CD3⁺CD19⁻B220⁻CD122⁺CD49b⁺ NK cells (Fig. 1A). When comparing B6 and NOD mice, in addition to the total mNK cell proportion (16), we observed conspicuous differences in the maturation profiles of the mNK cells. Relative to B6 mNK cells, NOD mNK cells exhibited an increased proportion of the least mature DN and CD11b^{low} subsets and a reduced proportion of the most mature CD27^{low} subset (Fig. 1B). The impaired mNK cell functional maturation in NOD mice relative to B6 is also reflected in the absolute numbers of the CD11b^{low} and CD27^{low} NK cell subsets, denoting a block in the functional maturation process for NOD mNK cells. To confirm that this block is not secondary to a defect in the regulation of CD11b or CD27 expression in mNK cells from NOD mice, we also determined the level of expression of T-bet and Eomes. T-bet expression is enhanced with mNK cell functional maturation, whereas Eomes is more highly expressed in the least mature mNK cell subsets (25). Accordingly, we find that mNK cells from NOD mice express lower levels of T-bet and higher levels of Eomes than mNK cells from B6 mice (Fig. 1C). This is further evidenced by defining the ratio of Eomes/T-bet expression, quantified by the mean fluorescence intensity (MFI),

which is highest in NOD relative to B6 mice (Fig. 1C). Together, these data support the view that mNK cell functional maturation is impaired in NOD mice.

As the NOD mouse is a well-established model of spontaneous autoimmune diabetes, we wished to determine if the inflammation associated with the underlying pathology was causal to the observed block in NK cell functional maturation. To do so, we took advantage of mice deficient for *Rag1*, where *Rag1*-deficient NOD mice do not develop autoimmune diabetes (26), eliminating any potential underlying inflammation that might bias our observed phenotype. Moreover, the deletion of *Rag1* leads to a complete ablation of peripheral T and B cells while still allowing NK cell development (3, 27, 28). Due to the absence of T and B cells, we gated directly on live cells expressing CD49b and CD122 to select for mNK cells (Fig. 2A). Using *Rag1*-deficient mice of the B6 and NOD backgrounds, we found that, similar to the wild-type counterparts (Fig. 1B), mNK cells from NOD.*Rag1*^{-/-} mice display an increase in the proportion and absolute number of the CD11b^{low} subset as well as a decrease in the proportion and absolute number of the most mature CD27^{low} subset (Fig. 2B). Therefore, in comparison with the B6 genetic background, mNK cells from the NOD genetic background display a distinct block in their functional maturation process, which cannot be attributed to the ongoing autoimmune process or the presence of B and T cells. As a result, the differences observed in the functional maturation of NK cells are most likely to be caused by genetic differences between the two inbred strains.

Linkage analysis for NK cell functional maturation

To identify genetic factors contributing to the regulation of NK cell functional maturation, we performed a genetic linkage analysis. Recent publications from our team (16, 29, 30) have demonstrated that *Rag1* deficiency increases the sensitivity for identifying significant loci linked to an observed phenotype for rare lymphomyeloid cell populations. As a result, we generated a cohort of 181 F₂ (B6.*Rag1*^{-/-} × NOD.*Rag1*^{-/-}) mice, hereafter termed F₂.*Rag* mice, and quantified the proportions of mNK cells comprising the four stages of functional maturation, namely the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets. The proportion of the four mNK cell subsets each followed a Gaussian distribution (Fig. 3A), which is suggestive of a multigenic regulation of the phenotypes. We then undertook linkage analyses for these traits, where we subjected the DNA from each F₂.*Rag* mouse to the Illumina Golden Gate low-density platform and executed a genome-wide SNP genotyping. Using this approach we were able to identify six major loci on chromosomes 2, 4, 7, 10, 11, and 18 (Figs. 3B, 4), underlining the multigenic regulation of NK cell functional maturation. Accordingly, we have named the loci *Nkfm*.

We then generated a high-resolution map of the significant loci. Specifically for the DN mNK cell subset, we identified a single significant linkage on distal chromosome 18 with a LOD score of 5.76 (Fig. 4A), where we named this interval *Nkfm1.1*. The 95% Bayes confidence interval analysis, depicted by the gray shaded area, delimits the *Nkfm1.1* locus between 47.48 and 67.48 Mb (Fig. 4A, top right). For the CD11b^{low} mNK cell subset, we identified three loci significantly linked to the trait. Notably, an overlapping segment of *Nkfm1* was also significantly linked to the proportion of the CD11b^{low} mNK subset and was consequently named *Nkfm1.2* (Fig. 3B). *Nkfm1.2*, which is positioned at 59.48–71.48 Mb on chromosome 18, presented with a LOD score of 8.02 (Fig. 4B). The two additional loci, on chromosomes 7 and 11, significantly linked to the CD11b^{low} mNK subset, showed respective LOD scores of 4.70 and 9.06 (Fig. 4B). We termed these loci *Nkfm2* (chromosome 7, Bayes interval 43.46–83.46 Mb) and

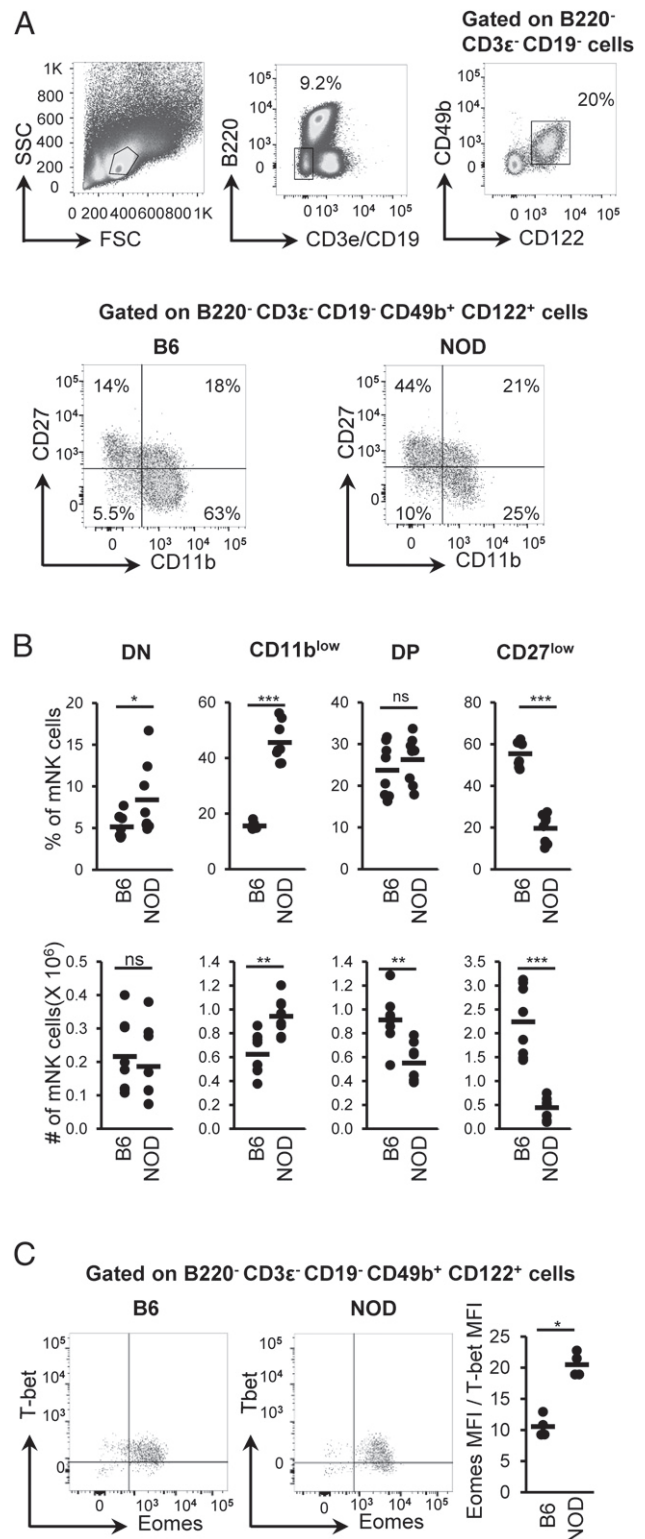


FIGURE 1. NOD mice exhibit a block in mNK cell functional maturation. **(A)** mNK cells are selected based on the lack of T and B cell markers, namely CD3⁻CD19⁻B220⁻ expression and positive expression of both CD122 and CD49b (top panels). The flow cytometry profiles of CD11b versus CD27 expression for mNK cells are illustrated for both B6 (bottom left) and NOD (bottom right) strains. **(B)** The proportion (top) and absolute numbers (bottom) of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets among total mNK cells is shown for B6 and NOD mice. **(C)** Tbet and Eomes expression on total mNK cells from the spleens of B6 and NOD mice is shown. The right panel represents the ratio of Eomes MFI over Tbet MFI. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. **p* < 0.05, ***p* < 0.001, ****p* < 0.001.

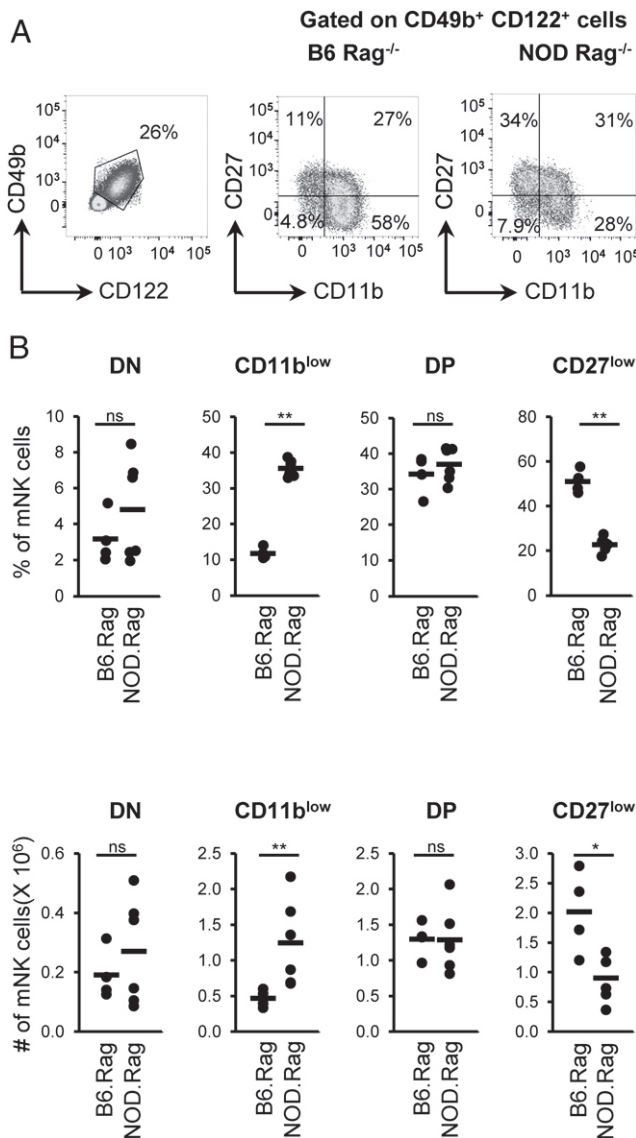


FIGURE 2. The block in mNK cell functional maturation is conserved in Rag1-deficient NOD mice. **(A)** mNK cells in Rag1-deficient mice are selected based on the positive expression of both CD122 and CD49b. The flow cytometry profiles of CD11b versus CD27 expression for mNK cells is illustrated for both B6.Rag1^{-/-} (middle) and NOD.Rag1^{-/-} (right) strains. **(B)** The proportion (top) and absolute numbers (bottom) of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets among total mNK cells is shown for B6.Rag1^{-/-} and NOD.Rag1^{-/-} mice. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

Nkfm3.1 (chromosome 11, Bayes interval 57.68–89.93 Mb). These results portray a differential genetic regulation of the two least mature mNK subsets, namely the DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, where one and three loci are respectively linked to each subset. However, these data also suggest a potential common regulation of both DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, as *Nkfm1* is linked to both of these subsets (Fig. 3B).

The size of the DP mNK subset was independent of the *Nkfm1*, 2, or 3 loci. Instead, we identified a locus on proximal chromosome 10, which we termed *Nkfm4*, with a significant linkage for the DP mNK cells (Fig. 4C) as well as the CD27^{low} mNK cells (Fig. 4D). Consequently, we subdivided this locus into two separate loci, which we termed *Nkfm4.1* and *Nkfm4.2* (Fig. 3B). *Nkfm4.1*, which is positioned at 20.15–36.27 Mb, is the sole locus linked to the regulation of the DP mNK cell subset and presented with a LOD

score of 7.67, whereas *Nkfm4.2*, which is positioned at 24.15–44.15 Mb, is linked to the regulation of the CD27^{low} mNK cell subset and presented with a LOD score of 8.02 (Fig. 4C, 4D). Along with *Nkfm4.2*, three additional significant loci were identified for the regulation of the most mature CD27^{low} mNK cell subset. These loci are located on chromosomes 2, 4, and 11 with LOD scores of 5.51, 5.41, and 3.90, respectively (Fig. 4D). These loci, which we named *Nkfm5* (chromosome 2), *Nkfm6* (chromosome 4), and *Nkfm3.2* (chromosome 11), are located at 31.21–64.17 Mb,

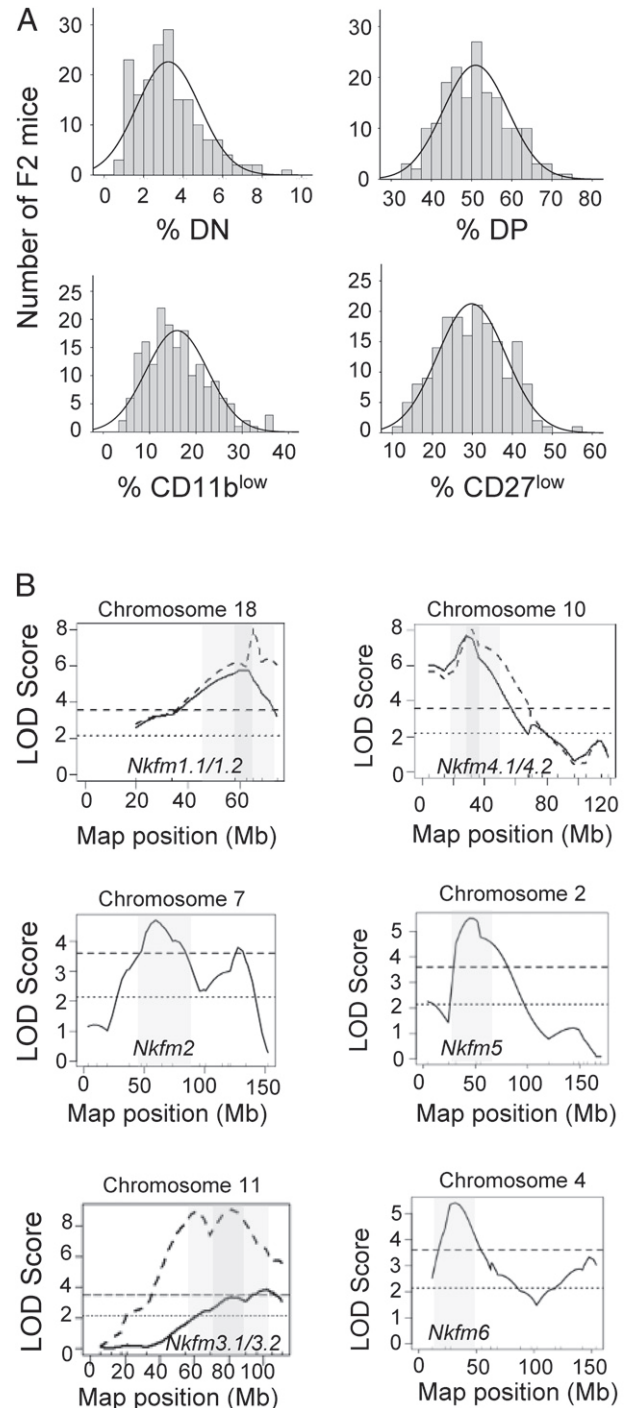


FIGURE 3. mNK cell maturation is a multigenic trait. **(A)** The distribution of the F2.Rag cohort relative to the proportion of DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cells is shown. **(B)** The location of each *Nkfm* locus (light gray shaded area), including overlapping loci (dark gray shaded area), on the associated chromosome is shown.

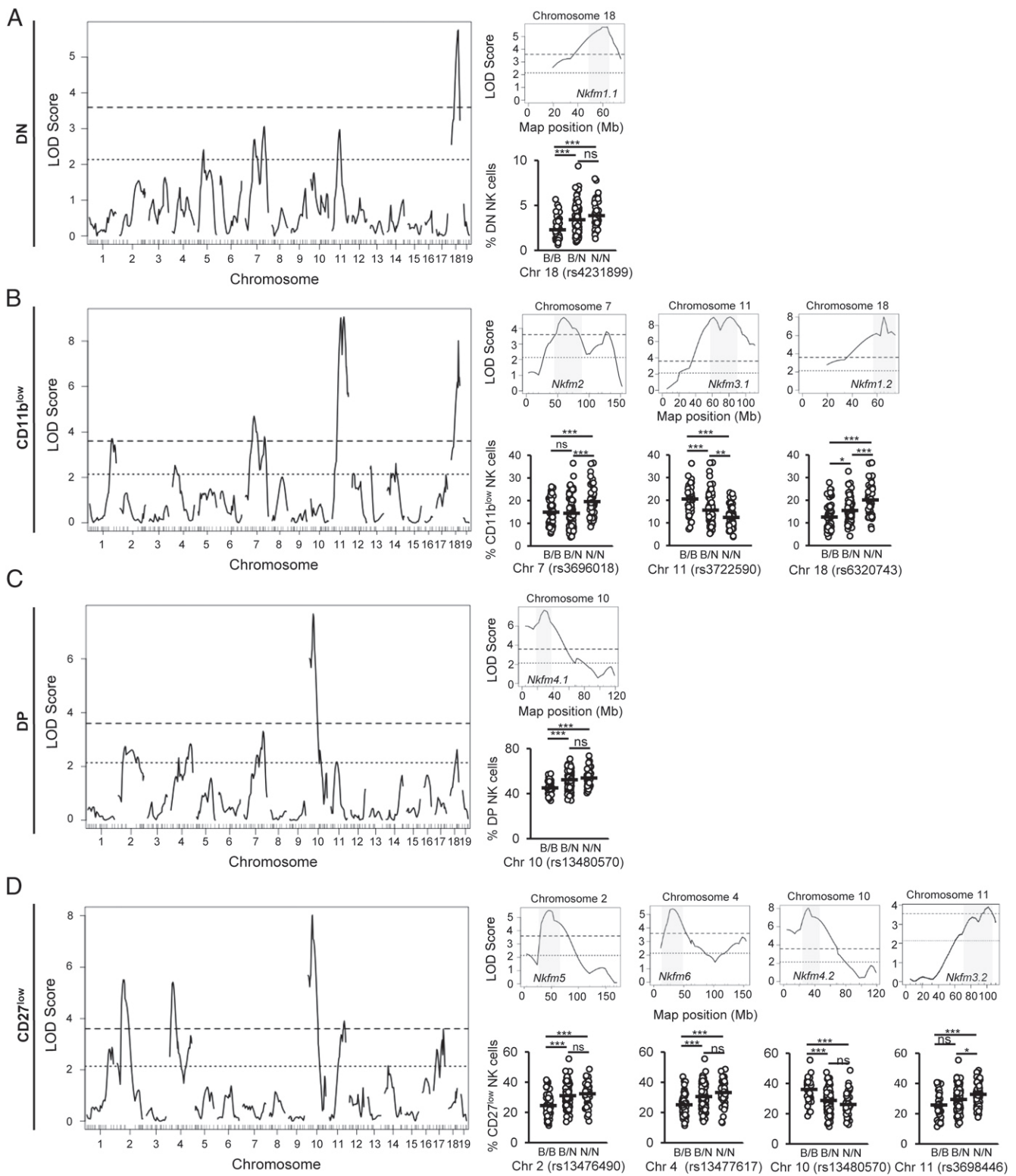


FIGURE 4. Linkage analysis of mNK cell functional maturation in F2.Rag mice. The genome-wide LOD score plots (R/Qtl) (left), the high resolution map of the linkage to the chromosome (top right), and the representation of the proportion of the mNK cell subsets segregated in relation to the genotype at the identified SNP (bottom right) is depicted for the (A) DN, (B) CD11b^{low}, (C) DP, and (D) CD27^{low} mNK cell subsets in the F2.Rag cohort. The dashed and dotted lines respectively indicate the significance threshold of $p < 0.05$ and the suggestive threshold for LOD score plots. For the high-resolution map, the gray shaded region depicts the 95% Bayes interval for the specified *Nkfm* locus. Each dot represents an individual mouse on haplotype distributions, and a dash represents the mean. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. B/B mice, homozygous for B6 alleles; B/N, heterozygous for B6 and NOD alleles; N/N, homozygous for NOD alleles.

23.03–47.63 Mb, and 73.68–110.98 Mb, respectively. Interestingly, as for DN and CD11b^{low} mNK cell subsets, although the DP and CD27^{low} mNK cell subsets are linked to one and four

loci respectively, potential common regulation of both DP and CD27^{low} mNK cell subsets is suggested by a common linkage to the *Nkfm4* locus (Fig. 3B).

To determine the impact of the specific genotype on each mNK cell subset, we subsequently segregated F2.Rag mice based on their haplotype at the SNP corresponding with the highest LOD score within each locus. This segregation of F2.Rag mice is, at times, in agreement with the parental NOD and B6 phenotypes, where NK cells from the NOD genetic background depict a more immature phenotype relative to the B6 background (Figs. 1, 2). Notably, F2.Rag mice bearing the NOD genotype within *Nkfm1.1* and *Nkfm1.2* exhibit a higher proportion of DN and CD11b^{low} mNK cells (Fig. 4A, 4B, lower right), and F2.Rag mice with NOD alleles at the *Nkfm4.2* locus present with a lower proportion of CD27^{low} mNK cells (Fig. 4D, lower right). Conversely, mice homozygous for the NOD alleles within *Nkfm3.1* presented with a decreased proportion of the CD11b^{low} mNK subset (Fig. 4B, lower right), and those with NOD alleles within the *Nkfm3.2*, *Nkfm5*, and *Nkfm6* loci an increased proportion of CD27^{low} mNK cells (Fig. 4D, lower right), both of which contrasts with the mNK cell phenotype found in the NOD.Rag1^{-/-} parental strain (Fig. 2B). These results reveal complex interactions between loci, suggesting some degree of genetic epistasis in the regulation of NK cell functional maturation (31), and where the *Nkfm4.2* locus likely plays a dominant contribution over the aforementioned loci in defining the proportion of CD27^{low} mNK cells.

Candidate genes found within *Nkfm* loci

We next generated a complete list of all genes encoded within the six identified *Nkfm* loci (Supplemental Table I). Several genes located in the *Nkfm* intervals caught our attention as they have previously been associated with NK cell development (Supplemental Table I). Indeed, *Tbx21*-deficient mice present with a deficit in CD27^{low} mNK cells (10), in line with our finding that *Tbx21* is encoded within the *Nkfm3.2* locus linked to the regulation of the CD27^{low} mNK cell subset. The *Myb* transcription factor encoded within the *Nkfm4.1* locus linked to the DP subset also plays a role in mNK cell functional maturation (8, 10). Moreover, the *Nkfm6* locus linked to the CD27^{low} mNK cell subset contains *Tgfb1*, which is involved in the signal transduction pathway for TGF- β (32, 33), known to influence the final stage of mNK cell maturation (34). The *Nkfm3* locus also reveals *Stat3*, *Stat5a*, and *Stat5b* as interesting potential candidate genes for NK cell functional maturation, where various cytokines, hormones, and growth factors activate Stat3 and Stat5 via their signaling pathway, including IL-2, IL-7, IL-15, and Flt3 (35, 36), which influence NK cell development (37–39). Interestingly, *Flt3l* is a candidate gene located within *Nkfm2*, where Flt3L is involved in the generation of common lymphoid progenitors from which NK cells originate (39). Altogether, the loci linked to NK cell functional maturation encode genes that have been previously associated to this trait. This supports the validity of the linkage analysis for identifying candidate genes and pathways regulating each differentiation step during NK cell functional maturation.

Candidate genes based on differential expression

To delimit the list of candidate genes encoded within the *Nkfm* loci, we aimed to identify differentially expressed genes (DEGs) between the CD11b^{low} versus DP and DP versus CD27^{low} mNK cell maturation stages that were also located within the loci of interest. Correspondingly, in 2009, Chiossone et al. (3) published their findings that validated the four-stage developmental pathway of mNK cells during functional maturation for which they also performed microarray analyses on the CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets from a B6.Rag2^{-/-} mouse. Importantly, these microarray data were submitted to, and thus accessible from, the GEO repository. Therefore, we took advantage of this microarray

data and listed the DEGs that were found within *Nkfm1.2*, -2, -3.1, -3.2, -4.1, -4.2, -5, and -6 (Supplemental Table II). Of the DEGs listed, seven genes, namely *Arg1*, *Cdc6*, *1110036003Rik*, *Myb*, *Pkp4*, *Ptgs1*, and *Zeb2*, exhibited at least a 2-fold difference in their expression between maturation stages. Interestingly, the gene expression of *Arg1*, *Cdc6*, *Myb*, and *Pkp4* decreases, whereas that of *1110036003Rik*, *Ptgs1*, and *Zeb2* increases during mNK cell functional maturation, where the role of *Zeb2* in functional maturation of mNK cells has recently been validated (13). Note that although the majority of the DEGs listed exhibited less than a 2-fold change in expression, small variations in expression in a set of genes may have a compound effect on a given biological phenotype and should not be readily dismissed. Altogether, this analysis highlighted multiple candidate genes from our linkage analysis that are also differentially expressed between the functional maturation stages of mNK cells.

To provide additional insight into the relevant genes affecting the specific steps of NK cell functional maturation, we next aimed to identify the genes located within the *Nkfm* loci whose differential gene expression between mNK cell subsets correlated with a change in the activity of their associated upstream regulators. To do so, an unrestricted Ingenuity-based URA was performed. This analysis predicts the activation state of upstream regulators based on their effect on the expression of all downstream target genes, where upstream regulators are not limited to transcription factors but can be any gene or small molecule that has been observed experimentally to affect gene expression. We applied a URA that was not restricted to genes within the *Nkfm* loci, but took into account all genes that are differentially expressed between the mNK cell subsets. We used two metrics to identify the most important upstream regulators: activation z-score and *p* value (dotted lines and red dots, respectively, in Fig. 5). The *p* value, calculated with the Fischer exact test, provides the statistical significance of the difference, whereas the activation z-score depicts the amplitude of the difference between NK cell subsets. The URA predicted that various pathways were differentially activated between the CD11b^{low} versus DP and DP versus CD27^{low} mNK cell subsets (Fig. 5). This approach positions the relative importance of specific genes in discrete functional maturation subsets. For instance, *Il7* is an upstream regulator of the CD11b^{low} subset, whereas *Il21* is an upstream regulator of the CD27^{low} subset, with respective *p* values of 3.83e-14 and 1.18e-08. The URA also suggests that mNK cells undergo major transcriptional changes as they transition from one functional maturation stage to the next, where almost twice the number of upstream regulators are listed during the transition between the DP to CD27^{low} stage relative to the CD11b^{low} to DP stage (compare Fig. 5A, 5B). Interestingly, some genes were common to both the CD11b^{low} to DP and the DP to CD27^{low} maturation stages (Fig. 6). Moreover, the activity of all but one of these common genes, namely *Tlr3*, followed a CD11b^{low} → DP → CD27^{low} mNK cell development program as they either followed a CD11b^{low} > DP > CD27^{low} or CD11b^{low} < DP < CD27^{low} hierarchy (Fig. 6). Importantly, some of the genes predicted to be differentially activated in this analysis are also upstream regulators for DEGs located within the *Nkfm* loci (Tables I, II). For instance, our analysis revealed that *Trp53* is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Figs. 5A, 6, Table I) as well as between the DP and CD27^{low} mNK cell subsets (Figs. 5B, 6, Table II). In addition, our analysis revealed that *Ifng* is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Fig. 5A), based on the differential gene expression of many genes, yet is not differentially activated between the DP and

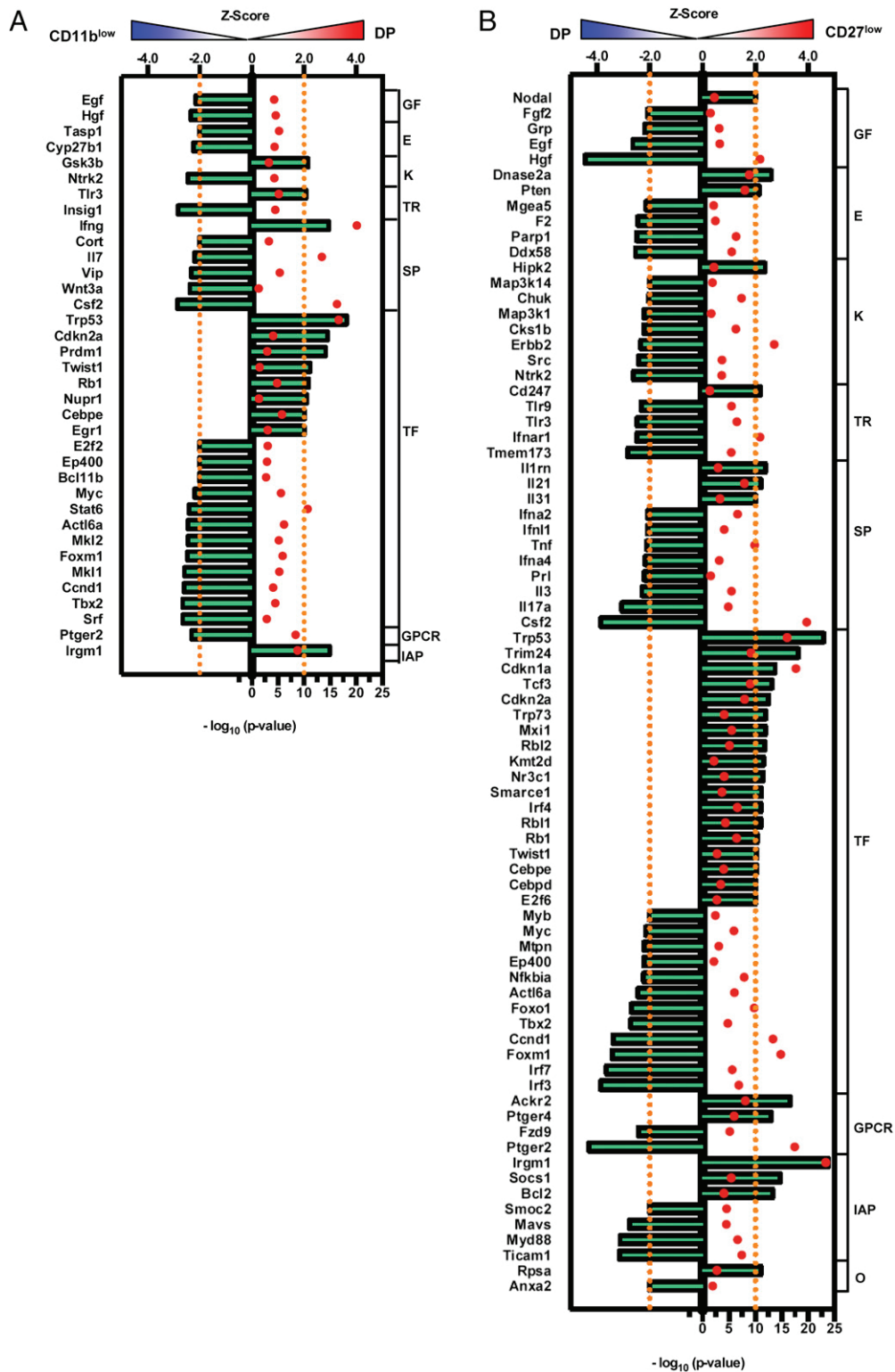


FIGURE 5. Upstream regulator analysis of DEGs between CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cells. An IPA was applied to predict upstream regulators that are differentially activated between the mNK cell subsets. The analysis was based on two metrics: z-score and *p* value. The upstream regulators that are expected to be increased or decreased in (A) CD11b^{low} versus DP or (B) DP versus CD27^{low} NK cells based on the gene expression changes in the dataset were identified using the IPA regulation z-score algorithm. A positive or negative z-score value indicates that an upstream regulator is predicted to be respectively activated or repressed in the distinct mNK cell subsets. Only functions and pathways with a z-score > 2 or < -2 (represented by orange dotted lines) were considered. Upstream regulators were grouped based on their biological function: growth factors (GF), enzymes (E), kinases (K), transmembrane receptors (TR), secreted proteins (SP), transcription factors (TF), G-protein coupled receptors (GPCR), intracellular adaptor proteins (IAP), and other (O). The *p* value (red dots), calculated with the Fischer exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related biological pathway is significant ($p < 0.05$ for $-\log_{10} > [1.3]$).

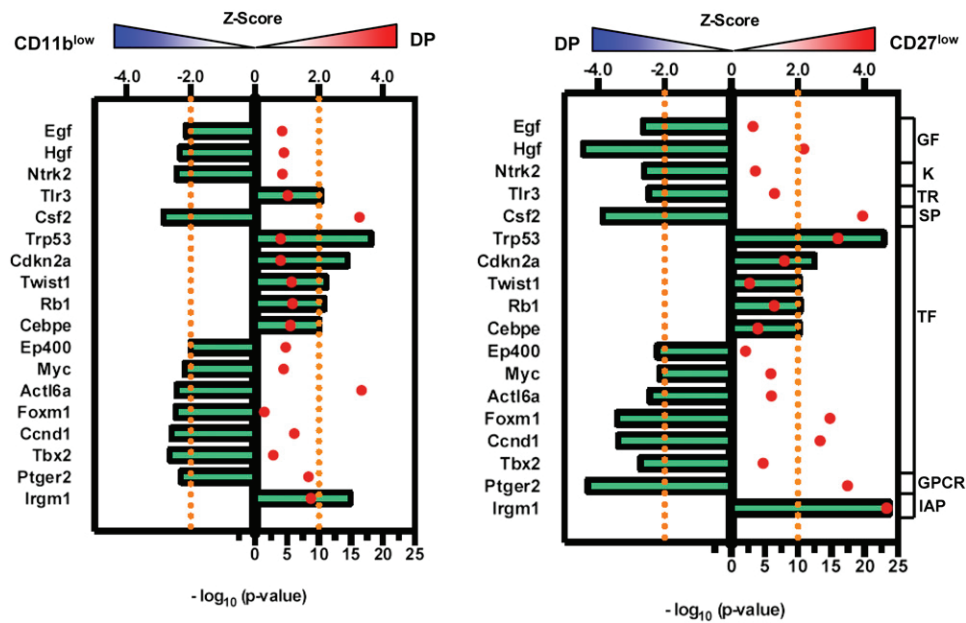


FIGURE 6. Upstream regulators common to both CD11b^{low} to DP and DP to CD27^{low} NK cell functional maturation stages. All upstream regulators identified in Fig. 5 that are common to both CD11b^{low} to DP and DP to CD27^{low} NK cell functional maturation stages are shown. A positive or negative z-score value indicates that the activity of the upstream regulator is predicted to be respectively increased or decreased in the distinct mNK cell subsets. Only upstream regulators with a z-score >2 or <-2 (represented by orange dotted lines) were considered. Upstream regulators were grouped based on their biological function: growth factors (GF), kinases (K), transmembrane receptors (TR), secreted proteins (SP), transcription factors (TF), G-protein coupled receptors (GPCR), and intracellular adaptor proteins (IAP). The *p* value (red dots), calculated with the Fischer exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related upstream regulator is significant ($p < 0.05$ for $-\log_{10} > [1.3]$).

CD27^{low} mNK cell subsets (Fig. 5B). This suggests that *Ifng* may affect the early stages of NK cell functional maturation. On the contrary, *Tnf* may regulate later steps as it is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between the DP and CD27^{low} mNK cell subsets, but not the CD11b^{low} and DP mNK cell subsets (Fig. 5, Table II). Altogether, this analysis revealed upstream regulators of DEGs that are encoded within *Nkfm* loci, thereby highlighting these downstream targets as interesting candidate genes for specific stages of NK cell functional maturation.

Although our understanding of the role for miRNAs in the regulation of NK cell development is still limited (40), they nevertheless remain important potential candidates for the regulation of mNK cell functional maturation. Based on associations with their putative target genes, miRNAs can be predicted to be activated or repressed during distinct biological conditions by using microarray data (41). Therefore, we executed an Ingenuity-based URA that would predict the activation state of upstream miRNAs based on their effect on the expression of downstream target genes. The analysis predicted that several miRNAs were differentially activated between the CD11b^{low} versus DP and DP versus CD27^{low} mNK cell subsets (Fig. 7). Indeed, the URA revealed a general increase in predicted miRNA activity during the transition from the CD11b^{low} to the DP stage (Fig. 7A), followed by a general decrease in predicted miRNA activity during the transition to the final CD27^{low} stage of mNK cell functional maturation (Fig. 7B). Altogether, this analysis predicts miRNAs as upstream regulators of DEGs between the functional maturation stages of mNK cells, with the DP subset presenting the most active miRNA activity.

Validation of *Trp53* as a causal gene regulating NK cell functional maturation

Our analysis positioned the function of many genes and miRNAs along the NK cell functional maturation process. It also revealed

genes that had not previously been associated with NK cell functional maturation. For instance, *Trp53* is a candidate gene located within *Nkfm3.1*, associated with the CD11b^{low} mNK cell subset (Supplemental Table I). In addition, *Trp53* is a common upstream regulator predicted to be differentially activated between mNK cell subsets based on the global gene expression changes (Figs. 5, 6). It is also highlighted as an upstream regulator for various candidate genes encoded within the specific *Nkfm* loci (Tables I, II). Together, these results point to *Trp53* as a highly interesting candidate gene. As a result, we aimed to further characterize how *Trp53* and its gene product, p53, influence mNK cell functional maturation. We first comparatively assessed the expression of p53 in mNK cell functional maturation stages from B6 and NOD mice. We reproducibly observed a lower level of p53 expression in DN, CD11b^{low}, and DP mNK cells from NOD mice relative to B6 mice (Fig. 8A, Supplemental Fig. 2). In addition, preliminary quantitative PCR analysis suggests that mRNA expression of relevant p53 target genes was lower in NK cells from NOD mice relative to B6 mice (data not shown). We next evaluated the impact of *Trp53* deletion on NK cell functional maturation by comparing the proportion of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets between B6 and B6.Trp53^{-/-} mice. As for NOD mice, we observed a significant increase in the proportion of the immature CD11b^{low} mNK cell subset, and a respective significant decrease in the most mature CD27^{low} mNK cell subset in B6.Trp53^{-/-} mice relative to B6 mice, indicative of a defect in functional maturation of NK cells in *Trp53*-deficient mice (Fig. 8B). Therefore, these results demonstrate that *Trp53*, a candidate gene linked to the regulation of the CD11b^{low} mNK cell subset, is indeed relevant to NK cell functional maturation.

Trp53, although mostly investigated for its role as guardian of the genome and its implication in cancer, is also involved in the regulation of many cellular processes (42–44). To determine how *Trp53* deletion influences NK cell functional maturation, we

Table I. Upstream regulators of DEGs encoded within *Nkfm* loci (CD11b^{low} versus DP)

| Chromosome | <i>Nkfm</i> | Gene | Upstream Regulators |
|------------|--------------------|-----------------|---|
| 18 | <i>Nkfm1.1/1.2</i> | <i>Pmaip1</i> | Trp53 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Flt3l</i> | Tlr3, Il7 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Ppp1r15a</i> | Trp53, Nupr1, Csf2 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Emp3</i> | Twist1 |
| 7 | <i>Nkfm2</i> | <i>Tjp1</i> | Vip, Trp53, Ifng, Hgf, Foxm1, Egf |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Aurkb</i> | Trp53, Tbx2, Rb1, Myc, Irgm1, Hgf, Foxm1, Egf, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Cd68</i> | Nupr1, Insig1 |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Tnfsf13</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Chrne</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1</i> | <i>Pfn1</i> | Trp53 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Hic1</i> | Trp53 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Fam101b</i> | Wnt3a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Lgals9</i> | Ifng |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl3</i> | Wnt3a, Vip, Trp53, Tlr3, Stat6, Ifng, Egr1, Cyp27b1, Csf2, Cort, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl4</i> | Vip, Trp53, Tlr3, Il7, Ifng, Hgf, Egr1, Cyp27b1, Csf2, Cort, Cdkn2a |
| 10 | <i>Nkfm4.1/4.2</i> | <i>Arg1</i> | Stat6, Myc, Ifng, Csf2 |

examined the proliferation of NK cells using the Ki-67 proliferation marker. Interestingly, a higher proportion of B6.Trp53^{-/-} NK cells expressed Ki-67 than those from B6 mice (Fig. 9A, top panels). Expectedly, within the different NK cell functional maturation stages, we confirm that the CD11b^{low} subset represents the stage with the highest proliferative rate, with an average of 24% of Ki-67⁺ cells in B6 mice (Fig. 9A). Trp53 deficiency substantially increased the proportion of Ki-67⁺ CD11b^{low} mNK cells to an average of 37%. The proportion of Ki-67⁺ cells was also considerably enhanced in B6.Trp53^{-/-} DP NK cells relative to those from B6 mice (Fig. 9A). The high level of proliferation of both CD11b^{low} and DP NK cell functional maturation stages may contribute, at least in part, to the apparent defect in NK cell functional maturation in B6.Trp53^{-/-} mice. In addition to the cell cycle, we quantified the proportion of apoptotic NK cells. We found that, as well as the enhanced cell cycle, total NK cells from B6.Trp53^{-/-} mice exhibited a higher level of apoptosis (Fig. 9B, top panel). This was mostly attributed to the later stage of NK cell functional maturation, namely the CD27^{low} mNK cell subset. Together, the enhanced cell cycle at the early and the enhanced apoptosis at the late NK cell functional maturation stages agree with the global phenotype observed in B6.Trp53^{-/-} mice,

wherein we find an increase in the CD11b^{low} and a decrease in the CD27^{low} mNK cell subsets.

Discussion

A four-stage model of NK cell functional maturation has been established based on the expression of CD11b and CD27, separating mNK cells into four distinct subsets that follow a DN → CD11b^{low} → DP → CD27^{low} differentiation process (3). Although various genes have been demonstrated to play a role in the regulation of NK cell maturation, the precise stage at which these genes are involved remains to be fully elucidated. In this study, by exploiting the B6 and NOD inbred strains, we identified genetic determinants that regulate the transition of mNK cells between the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} stages of functional maturation. Indeed, we demonstrate that NOD mice exhibit a block in NK cell functional maturation in comparison with B6 mice in both a Rag1-sufficient and -deficient setting. Subsequently, we used an unbiased linkage analysis to reveal six novel loci, which we named *Nkfm1* to *Nkfm6*, associated with variations in the proportion of the four distinct mNK subsets. Notably, none of these loci coincide with those linked to the proportion of mNK cells from our recent study, suggesting that mNK cell functional maturation and

Table II. Upstream regulators of DEGs encoded within *Nkfm* loci (DP versus CD27^{low})

| Chromosome | Locus | Gene | Upstream Regulators |
|------------|--------------------|-----------------|--|
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Spag5</i> | Ptger2, Irgm1, Erbb2, Csf2, Cdkn1a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl9</i> | Trp73, Tnf, Nfkbia, Ifnar1, Chuk, Cebpe, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl3</i> | Trp53, Tnf, Tlr9, Tlr3, Ticam1, Ptger4, Nr3c1, Nfkbia, Myd88, Irf3, Ifnar1, Csf2, Chuk, Cebpd, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ccl4</i> | Trp53, Tnf, Tlr9, Tlr3, Ticam1, Ptger4, Nr3c1, Myd88, Irf3, Il17a, Ifnar1, Hgf, Foxo1, Erbb2, Csf2, Chuk, Cdkn2a |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Ppm1d</i> | Trp53, Anxa2 |
| 11 | <i>Nkfm3.1/3.2</i> | <i>Mpo</i> | Tnf, Il3, Il17a, Csf2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | <i>Cdc6</i> | Trp53, Tbx2, Rbl2, Rbl1, Rb1, Ntrk2, Nfkbia, Hgf, Ep400, E2f6, Cdkn1a, Ccnd1 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | <i>Top2a</i> | Trp53, Tcf3, Map3k1, Foxm1, Fgf2, Erbb2, Csf2, Cdkn1a |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | <i>Slc4a1</i> | Hipk2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | <i>Kif18b</i> | Ptger2 |
| 11 | <i>Nkfm3.2</i> | <i>Map3k3</i> | Mgea5 |
| 10 | <i>Nkfm4.1</i> | <i>Myb</i> | Rb1, Myb, Csf2 |
| 10 | <i>Nkfm4.1</i> | <i>Sgk1</i> | Trp53, Tnf, Nr3c1, Nfkbia, Myc, Hgf, Foxo1, Csf2, Chuk |
| 10 | <i>Nkfm4.1/4.2</i> | <i>Dse</i> | Cdkn1a |
| 10 | <i>Nkfm4.2</i> | <i>Traf3ip2</i> | Nr3c1 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | <i>Pbx3</i> | Rb1, Cdkn2a |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | <i>Traf1</i> | Tnf, Rpsa, Nr3c1, Nfkbia, Irf7, Foxo1, F2, Erbb2 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | <i>Ptgs1</i> | Trp53, Tnf, Tcf3, Hgf, Erbb2, Egf |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | <i>Zeb2</i> | Twist1, Rb1, Foxm1 |
| 2 | <i>Nkfm5</i> | <i>Wdsub1</i> | Kmt2d |
| 4 | <i>Nkfm6</i> | <i>Reck</i> | Erbb2 |
| 4 | <i>Nkfm6</i> | <i>Melk</i> | Trp53, Rb1, Ptger2, Hgf, Cdkn2a, Ccnd1 |

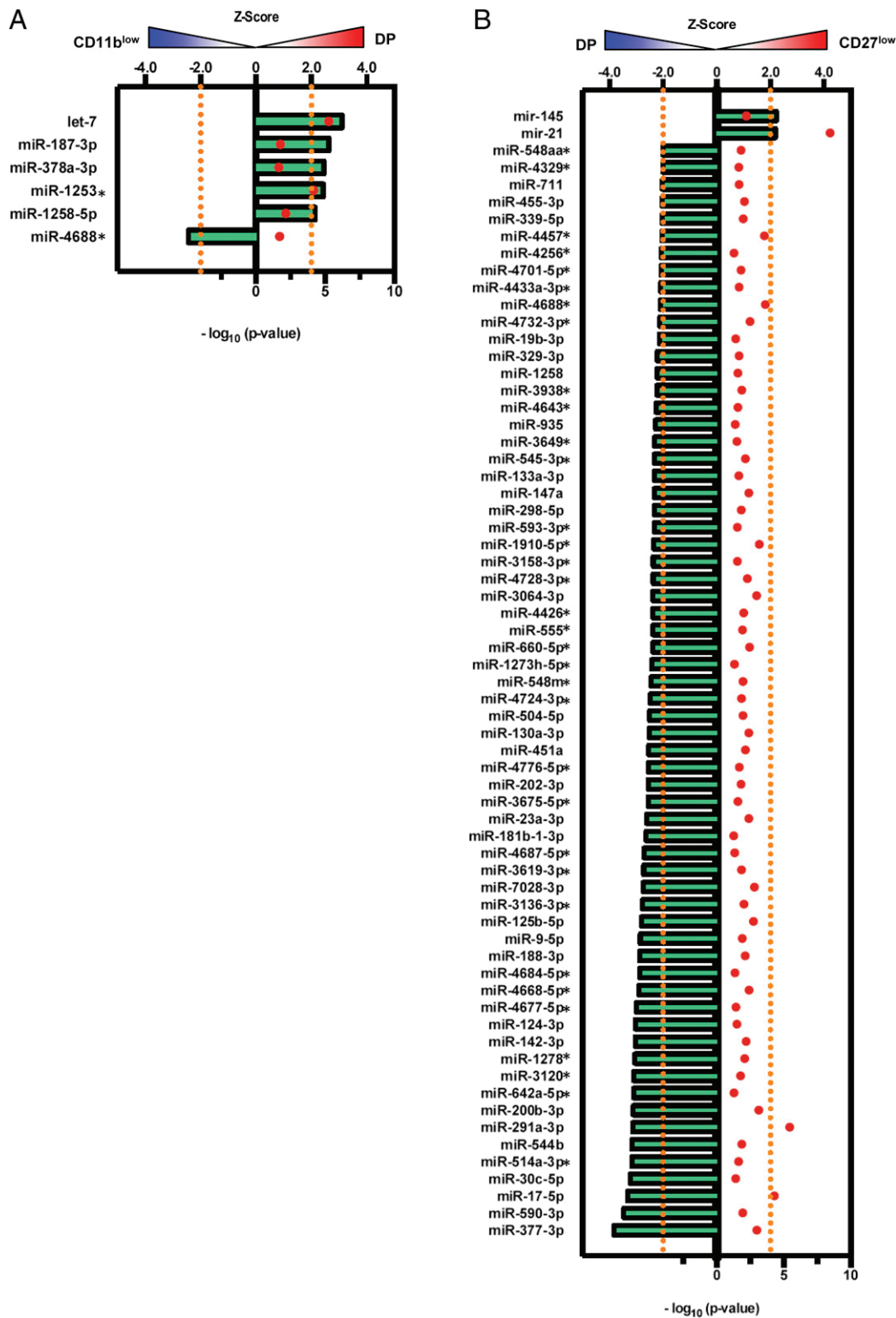


FIGURE 7. Upstream miRNA analysis between CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cells. An IPA was applied to predict upstream miRNAs that are differentially expressed between the mNK cell subsets. The analysis is based on two metrics: z-score and *p* value. The upstream miRNA that are expected to be increased or decreased in **(A)** CD11b^{low} versus DP, or **(B)** DP versus CD27^{low} NK cells according to the gene expression changes in our dataset were identified using the IPA regulation z-score algorithm. A positive or negative z-score value indicates that the activity of the miRNA is predicted to be increased or decreased in the distinct NK subsets. Only miRNA with a z-score of >2 or <-2 (represented by orange lines) were considered. An asterisk (*) next to an miRNA indicates it has yet to be confirmed in mice according to miRBase (<http://www.mirbase.org/>). The *p* value (red dots), calculated with the Fischer exact test, reflects the likelihood that the association between a set of genes in our dataset and a related miRNA is significant ($p < 0.05$ for $-\log_{10} > [1.3]$).

size of the mNK cell pool are regulated by distinct molecular pathways (16). More specifically, we found that the six loci were independently associated with distinct subsets, suggesting that the

block in mNK cell maturation occurs at multiple stages during the four-stage maturation process, where each transition is regulated by different factors. To delimit the list of candidate genes encoded

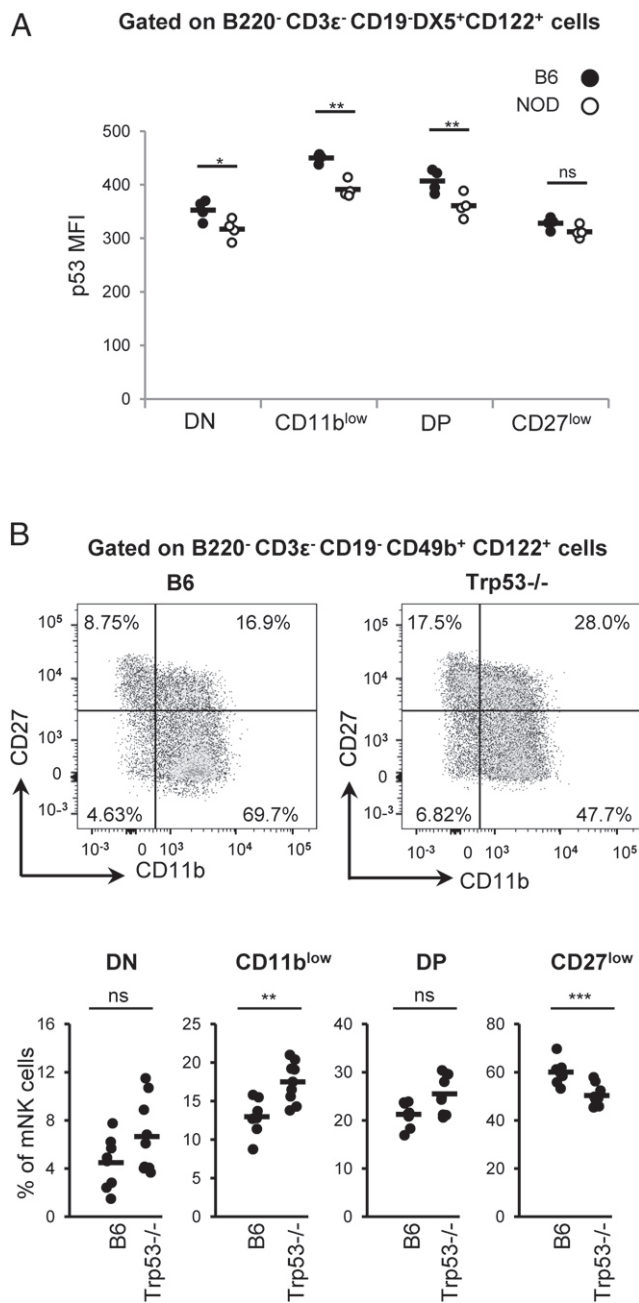


FIGURE 8. p53 impacts mNK cell functional maturation. **(A)** The MFI of p53 expression is shown for B6 and NOD NK cell functional maturation stages. To compare the p53 MFI, B6 and NOD mice were mixed in a 1:1 ratio prior to staining. CD45.1 was used to resolve NOD from B6 cells. Similar results were obtained when CD45.2 was used to positively gate on B6 cells (data not shown). **(B)** Representation of CD11b versus CD27 expression for mNK cells is illustrated for both B6 (top left) and B6.Trp53^{-/-} (top right) strains. The proportion of the DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets among total mNK cells is shown for B6 and B6.Trp53^{-/-} mice (bottom). Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001.

within each of the *Nkfm* loci, we took advantage of Affymetrix microarray data submitted to the GEO repository by Chiossone et al. (3), for which the CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets from B6.Rag2^{-/-} mice were analyzed. We performed various in silico analyses that allowed us to uncover candidate genes that are not only linked to a block in NK cell functional maturation but are also differentially expressed between the functional maturation stages themselves. Altogether, the combination of

our linkage analysis and the in silico analyses using data submitted to the GEO repository allowed us to highlight various genes, including transcription factors, receptors, proteins, enzymes, and kinases, as well as miRNAs as candidate genes regulating the specific stages of NK cell functional maturation.

Our analysis not only uncovered novel candidate genes, but also highlighted genes that are known to directly or indirectly influence NK cell maturation and positioned their role across the specific NK cell functional maturation steps. For instance, *Flt3l* located within *Nkfm2*, which is linked to the CD11b^{low} mNK cell subset, is crucial for the development and homeostasis of dendritic cells (DCs), which are known to have a close connection to NK cells through a process termed NK-DC cross-talk (38). Castillo et al. (45) have shown that, during this interaction, DCs can *trans*-present IL-15 to NK cells, where DC-mediated IL-15 *trans*-presentation plays a role in the development of mNK cells during the early stages of the maturation process, in particular the development of CD11b^{low} mNK cells. Therefore, the administration of recombinant Flt3L, which leads to the drastic expansion of DCs, consequentially gives rise to an NK cell expansion in an IL-15-dependent fashion (46). Importantly, our linkage analysis not only supports the role for *Flt3l* in the maturation of NK cells, but also identifies at which stage it plays its role. Indeed, our analysis reveals *Flt3l* to be a candidate gene located within the *Nkfm2* locus linked to the proportion of the CD11b^{low} mNK cell subset, in accordance with findings by Castillo et al. (45). By taking advantage of the GEO repository data, our analysis revealed that the *Flt3l* gene is in fact differentially expressed between CD11b^{low} and DP mNK cells, whereas IL-7 and Tlr3, which are both upstream regulators of *Flt3l*, are also predicted to be differentially activated between CD11b^{low} and DP mNK cells. Altogether, these results suggest that *Flt3l* may regulate mNK cell functional maturation specifically at the CD11b^{low} stage.

Myb is a transcription factor that has been shown to negatively regulate the terminal stages of functional maturation (3, 8). Our linkage analysis uncovers *Myb* as a candidate gene located within *Nkfm4.1* linked to the DP mNK cells. Moreover, by taking advantage of the GEO repository, we uncovered a predicted decrease in the activity of *Myb*, as well as a 5.602-fold decrease in expression of the *Myb* gene, between the DP and CD27^{low} functional maturation stages of mNK cells in the Rag2-deficient B6 mouse. Our analysis correlates with previous findings demonstrating that the expression of *Myb* is lowest in the CD27^{low} subset of mNK cells (3, 8), in agreement with a role for *Myb* in the later stages of mNK cell functional maturation.

Tgfb1, which encodes for a TGF-β receptor, is a candidate gene located within the *Nkfm6* locus linked to the most mature CD27^{low} mNK cell subset. Indeed, in the absence of TGF-β receptor signaling, the mNK cell population is comprised of a higher proportion of CD27^{low} mNK cells, which is thought to be a result of the effect of TGF-β on T-bet and GATA-3 expression (34), both of which are involved in NK cell maturation (3, 4, 10, 12). Interestingly, our linkage analysis also revealed *Tbx21*, which encodes for T-bet, as a candidate gene located within the *Nkfm3.2* locus on chromosome 11 that, like *Nkfm6*, is linked to the CD27^{low} mNK cell subset. These findings correlate with those of Chiossone et al. (3), who found *Tbx21* expression to be highest in the CD27^{low} mNK cell subset. T-bet is a transcription factor crucial for multiple stages of NK cell development including the developmental stability of immature NK cells as well as the functional maturation of mNK cells, where T-bet-deficient mNK cells do not mature to the final CD27^{low} stage (10, 12). In addition to *Tgfb1*, *Mbd2*, which is located within *Nkfm1.2* linked to the CD11b^{low} mNK cell subset, is yet another candidate gene revealed

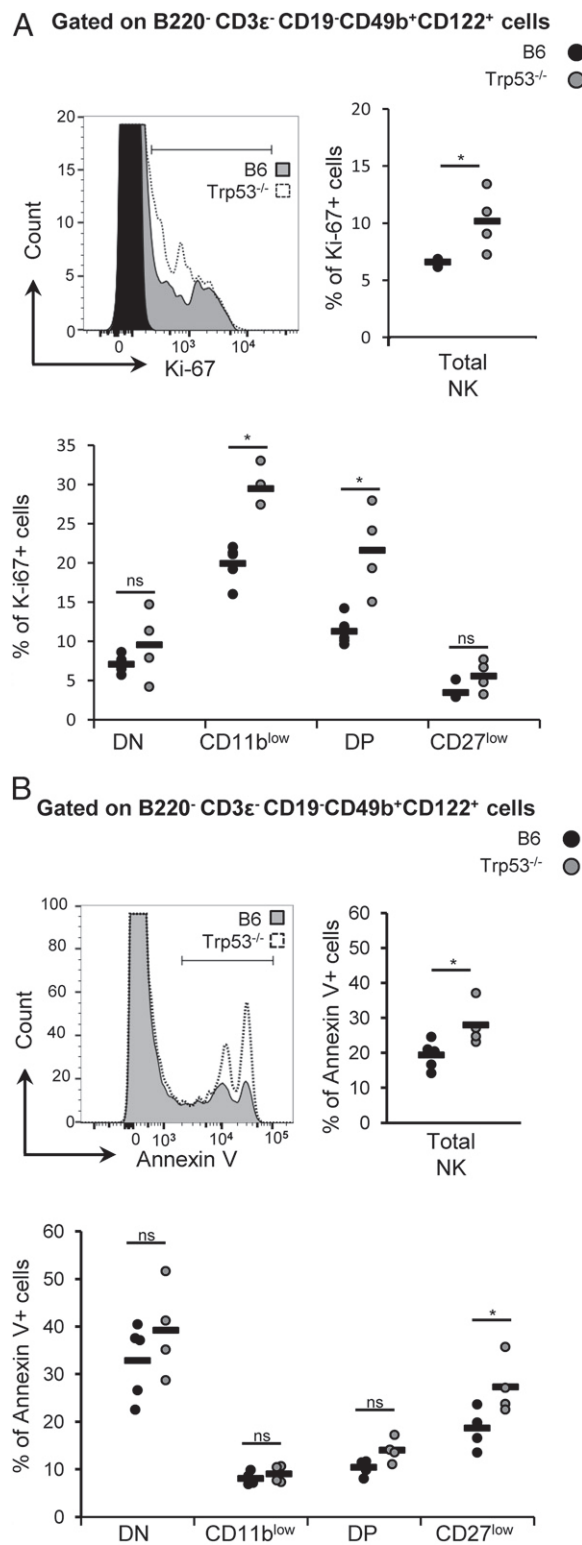


FIGURE 9. p53 enhances proliferation and apoptosis of specific mNK cell subsets. **(A)** Left, overlaid histogram representation of Ki-67 expression in mNK cells from B6 (shaded) versus B6.Trp53^{-/-} (dotted) mice. Isotype control is shown in black. Right, compilation of the percentage of Ki-67⁺ mNK cells in B6 (black) and B6.Trp53^{-/-} (gray) mice. Bottom, compilation of the percentage of Ki-67⁺ cells in DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cell subsets is shown for B6 (black) and B6.Trp53^{-/-} (gray) mice. **(B)** Left, overlaid histogram representation of Annexin V expression levels in mNK cells from B6 (shaded) versus B6.Trp53^{-/-} (dotted) strains. Right, compilation of the percentage of Annexin V⁺ mNK cells in B6 (black) and B6.Trp53^{-/-} (gray) mice. Bottom, compilation of the percentage of Annexin V⁺ cells in DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low}

by our linkage analysis that is known to regulate T-bet expression (47). Altogether, these findings support an important role for the TGF- β signaling pathway and *Tbx21* in the regulation of the CD27^{low} mNK cell subset during functional maturation.

Additionally, our analysis provides compelling evidence that *Trp53* is an important regulator of NK cell maturation. *Trp53*, also known as tumor suppressor p53, is crucial in preserving genomic stability following cellular damage or stress, including DNA damage, hypoxia, and oncogene activation, such that p53 provides protection from tumor development (48). More specifically, p53 functions as a transcription factor to modulate the expression of various genes that regulate the major defenses against tumor growth, including cell cycle arrest, apoptosis, maintenance of genetic integrity, inhibition of angiogenesis, and cellular senescence (48). Our analysis revealed *Trp53* as a candidate gene located within *Nkfm3.1*, which is also associated with the CD11b^{low} mNK cell subset. In this study, we find that p53 expression is lower in NOD than in B6 mice. Moreover, we demonstrate that *Trp53* is indeed associated with the regulation of NK cell functional maturation, where Trp53-deficient mice exhibit a decrease in functional maturation of NK cells. The decrease in NK cell functional maturation is associated with heightened proliferation of CD11b^{low} mNK cells and increased apoptosis of CD27^{low} mNK cells, suggesting that Trp53 deficiency regulates NK cell functional maturation in an NK cell-intrinsic manner. Still, these data do not exclude an NK cell-extrinsic role for *Trp53* in modulating NK cell functional maturation. Future experiments exploiting either competitive bone marrow chimeras or mice bearing NK cell lineage-specific Trp53 deletion will delineate the cell-intrinsic and -extrinsic role of *Trp53* for this phenotype.

Interestingly, *Trp53* is the most frequently mutated gene in human cancer, with greater than half of all tumors exhibiting a mutation at this locus (48). Indeed, there is growing evidence that these *Trp53* mutations can result in a loss of tumor suppressor activity as well as the acquisition of functions that contribute to the malignant progression (49). Given the role of *Trp53* as a tumor suppressor gene and its associated mutations' causative role in cancer, it is possible that patients harboring specific polymorphisms in *Trp53* may also have alterations in NK cell functional maturation and subsequent defects in tumor immunosurveillance. Hence, investigation of the proportion of mNK cell subsets in patients harboring *Trp53* polymorphisms would be of great interest. To that effect, various polymorphisms in both validated and putative p53 response elements, which would alter p53 binding and consequently the transcription of the given gene, have been identified in humans (50).

miRNAs are also emerging as regulators of NK cell functional maturation. Indeed, recent work in animals lacking either global miRNAs (51, 52) or specific miRNAs, namely miR-150, miR-155, and miR-15a/16 (8, 9, 14), has highlighted miRNAs as regulators of NK cell functional maturation. During our in silico analysis, we uncovered multiple miRNAs as upstream regulators of differentially expressed downstream target candidate genes, where four of these miRNAs are also expressed by NK cells, namely let-7, miR-21, miR-339-5p, and miR-142-3p (53). Accordingly, members of the let-7 family, namely let-7f, let-7g, and let-7a, were found to be the three most abundant miRNAs in human NK cells (54), whereas the expression of miR-339-5p increases by almost 3-fold following IL-15 stimulation of murine NK cells (53).

mNK cell subsets is shown for B6 (black) and B6.Trp53^{-/-} (gray) mice. Each dot represents data for an individual mouse. Dash represents the mean. **p* < 0.05.

Furthermore, miR-21, which is the immature form of miR-21, is the most abundant miRNA expressed in both resting and activated murine NK cells (53). Based on our analysis, let-7 exhibits a predicted increase in activity during the transition from CD11b^{low} to DP mNK cells, whereas miR-339-5p and miR-142-3p exhibit a predicted decrease during the transition from the DP to CD27^{low} mNK cell stage. Moreover, miR-21 exhibits a predicted increase in activity during the transition from the DP to the most mature CD27^{low} mNK cell stage. Interestingly, mice deficient for either Dicer or Dcgr8, which are miRNA processing enzymes, display a reduction in both the relative expression of miR-21 in NK cells as well as the frequency of the most mature CD27^{low} mNK cell subset (51, 52). Together, these results suggest that miR-21 regulates the functional maturation of mNK cells to the final CD27^{low} stage. It will therefore be relevant to verify exactly how these miRNAs influence the functional maturation of NK cells.

Interestingly, many of the candidate genes highlighted by our linkage approach are associated with cellular apoptosis. For instance, *Myb* oncogenic variants suppress apoptosis, predominantly by enhancing the expression of its direct target, the anti-apoptotic gene *Bcl2* (55, 56), whereas TGF β signaling induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase (57). p53, which is associated with regulating apoptosis following stress signals (48), also modulates the expression of downstream target genes that can be linked to apoptosis. Accordingly, *Pmaip1* has been previously demonstrated to act together with Bim to induce apoptosis of NK cells following IL-15 withdrawal in vitro (58), suggesting that *Pmaip1* influences NK cell survival. Another candidate gene, *Flt3l*, is crucial for the development and homeostasis of DCs whose IL-15 *trans*-presentation plays a role in the development of CD11b^{low} mNK cells (45). As IL-15 is known to support the survival of NK cells in the peripheral lymphoid organs (59), this suggests that *Flt3l* may regulate NK cell functional maturation by promoting IL-15 *trans*-presentation. Lastly, Yamanaka et al. (60) recently showed that inhibition of miR-21 in a human NK cell line led to increased apoptosis associated with the upregulation of proapoptotic downstream targets, suggesting that miR-21 is a key regulator of NK cell survival. Altogether, these results suggest that several candidate genes may influence NK cell functional maturation via the regulation of apoptosis. Interestingly, this may be in part due to the model system exploited. Indeed, Rag deficiency influences NK cell functional maturation and increases their rate of apoptosis (61, 62). A linkage analysis in Rag-sufficient mice would likely yield additional loci and biological pathways linked to the regulation of NK cell functional maturation. Nevertheless, we show that *Trp53*, even if revealed in a Rag-deficient setting, clearly influences NK cell functional maturation in a Rag-sufficient setting. This suggests that, as for other traits (16, 30, 63), Rag^{-/-} mice are useful in linkage analyses to identify trait-relevant loci, biological pathways, or even genes.

There are several additional genes located within the *Nkfm* loci that exhibit a known association with NK cells and thus remain likely candidate genes for the regulation of NK cell functional maturation. For instance, *Arrb2* (*Nkfm3.1*) (64), *Lgals9* (*Nkfm3.1/3.2*) (65), *Ccl3* (*Nkfm3.1/3.2*) (66), *Ccl4* (*Nkfm3.1/3.2*) (67), *Ccl5* (*Nkfm3.1/3.2*) (68), *Mpo* (*Nkfm3.1/3.2*) (69), and *Cd72* (*Nkfm6*) (70) play a role in NK cell function, whereas *CD74* (*Nkfm1.1/1.2*) (71) has been associated with NK cell numbers. Moreover, *Arg1* (*Nkfm4.1/4.2*) has been associated with both NK cell function and numbers (72). Nevertheless, the role of other candidate genes that do not yet have any known association to NK cells will need to be further explored.

In conclusion, maintenance of a pool of mNK cells with optimal effector function is essential for host defense against both pathogens and cancerous tumor formation, where each mNK cell subset, namely DN, CD11b^{low}, DP, and CD27^{low} mNK cells, exhibits a unique combination of phenotype and effector function. This study brings to light six novel loci associated with a multi-checkpoint block in the functional maturation of mNK cells, where in silico analyses further delimit the list of potential candidate genes associated with this phenotype. Importantly, our analysis not only uncovered novel candidate genes, but also highlighted genes that are known to influence NK cell maturation and positioned their role across the specific NK cell functional maturation steps. In the future, it will be relevant to verify the impact of the candidate genes in additional mouse strains. In this study, we also validate *Trp53* as a gene regulating mNK cell functional maturation as B6. *Trp53*^{-/-} mice fail to maintain normal mNK cell subset proportions. Given the causative role of *Trp53* mutations in cancer as well as the identification of polymorphisms within the p53 response elements, it will be of great interest to verify whether these patients exhibit any alterations in NK cell functional maturation, which may lead to subsequent defects in tumor immunosurveillance. We speculate that two populations would be particularly informative in this regard: 1) elephants, which have 20 copies of *TRP53* and a low incidence of cancer (73), and 2) patients with Li-Fraumeni syndrome, most of which have a germline *TRP53* mutation and a highly penetrant familial cancer syndrome (74). Genes identified in this study may eventually serve as molecular targets to permit the modulation of mNK cell functional maturation, more specifically the alteration of the frequency of a given mNK cell subset, to potentiate both tumor immunosurveillance and viral clearance.

Acknowledgments

We thank Marie-Josée Guyon, Fany De Wilde, and the animal house staff for curating the mouse colonies and the center of Applied Genomics at Sick Kids Hospital in Toronto for SNP genotyping. We thank Dr. Tarik Morøy for providing some B6.Trp53-deficient mice, Martine Dupuis at the core flow cytometry facility at Maisonneuve-Rosemont Hospital for assistance, as well as Dr. Nathalie Labrecque and Dr. Heather Melichar for critical review of the manuscript. This work benefited from data assembled by the Walzer Laboratory (3).

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Huntington, N. D., C. A. Voshenrich, and J. P. Di Santo. 2007. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 703–714.
- Fathman, J. W., D. Bhattacharya, M. A. Inlay, J. Seita, H. Karsunky, and I. L. Weissman. 2011. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* 118: 5439–5447.
- Chiossone, L., J. Chaix, N. Fuseri, C. Roth, E. Vivier, and T. Walzer. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113: 5488–5496.
- Samson, S. I., O. Richard, M. Tavian, T. Ranson, C. A. J. Voshenrich, F. Colucci, J. Buer, F. Grosveld, I. Godin, and J. P. Di Santo. 2003. GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* 19: 701–711.
- Boos, M. D., Y. Yokota, G. Eberl, and B. L. Kee. 2007. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J. Exp. Med.* 204: 1119–1130.
- Gascoyne, D. M., E. Long, H. Veiga-Fernandes, J. de Boer, O. Williams, B. Seddon, M. Coles, D. Kioussis, and H. J. Brady. 2009. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat. Immunol.* 10: 1118–1124.
- Kamizono, S., G. S. Duncan, M. G. Seidel, A. Morimoto, K. Hamada, G. Grosveld, K. Akashi, E. F. Lind, J. P. Haight, P. S. Ohashi, et al. 2009. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J. Exp. Med.* 206: 2977–2986.

8. Bezman, N. A., T. Chakraborty, T. Bender, and L. L. Lanier. 2011. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. *J. Exp. Med.* 208: 2717–2731.
9. Sullivan, R. P., J. W. Leong, S. E. Schneider, A. R. Ireland, M. M. Berrien-Elliott, A. Singh, T. Schappe, B. A. Jewell, V. Sexl, and T. A. Fehniger. 2015. MicroRNA-15/16 antagonizes Myb to control NK cell maturation. *J. Immunol.* 195: 2806–2817.
10. Gordon, S. M., J. Chaix, L. J. Rupp, J. Wu, S. Madera, J. C. Sun, T. Lindsten, and S. L. Reiner. 2012. The transcription factors T-bet and Eomes control key checkpoints of natural killer cell maturation. *Immunity* 36: 55–67.
11. Narni-Mancinelli, E., B. N. Jaeger, C. Bernat, A. Fenis, S. Kung, A. De Gassart, S. Mahmood, M. Gut, S. C. Heath, J. Estellé, et al. 2012. Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* 335: 344–348.
12. Robbins, S. H., M. S. Tessmer, L. Van Kaer, and L. Brossay. 2005. Direct effects of T-bet and MHC class I expression, but not STAT1, on peripheral NK cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 35: 757–765.
13. van Helden, M. J., S. Goossens, C. Daussy, A. L. Mathieu, F. Faure, A. Marçais, N. Vandamme, N. Farla, K. Mayol, S. Viel, et al. 2015. Terminal NK cell maturation is controlled by concerted actions of T-bet and Zeb2 and is essential for melanoma rejection. *J. Exp. Med.* 212: 2015–2025.
14. Zawislak, C. L., A. M. Beauieu, G. B. Loeb, J. Karo, D. Canner, N. A. Bezman, L. L. Lanier, A. Y. Rudensky, and J. C. Sun. 2013. Stage-specific regulation of natural killer cell homeostasis and response against viral infection by microRNA-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 6967–6972.
15. Luevano, M., A. Madrigal, and A. Saudemont. 2012. Transcription factors involved in the regulation of natural killer cell development and function: an update. *Front. Immunol.* 3: 319.
16. Pelletier, A. N., L. Guilbault, F. Guimont-Desrochers, E. E. Hillhouse, and S. Lesage. 2016. NK cell proportion and number are influenced by genetic loci on chromosomes 8, 9, and 17. *J. Immunol.* 196: 2627–2636.
17. Haley, C. S., and S. A. Knott. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315–324.
18. Broman, K. W., H. Wu, S. Sen, and G. A. Churchill. 2003. R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19: 889–890.
19. Kataoka, S., J. Satoh, H. Fujiya, T. Toyota, R. Suzuki, K. Itoh, and K. Kumagai. 1983. Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. *Diabetes* 32: 247–253.
20. Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, and D. L. Greiner. 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154: 180–191.
21. Poulton, L. D., M. J. Smyth, C. G. Hawke, P. Silveira, D. Shepherd, O. V. Naidenko, D. I. Godfrey, and A. G. Baxter. 2001. Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int. Immunol.* 13: 887–896.
22. Carnaud, C., J. Gombert, O. Donnars, H. Garchon, and A. Herbelin. 2001. Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J. Immunol.* 166: 2404–2411.
23. Johansson, S. E., H. Hall, J. Björklund, and P. Höglund. 2004. Broadly impaired NK cell function in non-obese diabetic mice is partially restored by NK cell activation in vivo and by IL-12/IL-18 in vitro. *Int. Immunol.* 16: 1–11.
24. Suwanai, H., M. A. Wilcox, D. Mathis, and C. Benoist. 2010. A defective I15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 9305–9310.
25. Simonetta, F., A. Pradier, and E. Roosnek. 2016. T-bet and Eomesodermin in NK cell development, maturation, and function. *Front. Immunol.* 7: 241.
26. Shultz, L. D., P. A. Lang, S. W. Christianson, B. Gott, B. Lyons, S. Umeda, E. Leiter, R. Hesselton, E. J. Wagar, J. H. Leif, et al. 2000. NOD/LtSz-Rag1 null mice: an immunodeficient and radioreistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J. Immunol.* 164: 2496–2507.
27. Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, and V. E. Papaioannou. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68: 869–877.
28. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68: 855–867.
29. Pelletier, A.-N., F. Guimont-Desrochers, M. P. Ashton, T. C. Brodnicki, and S. Lesage. 2012. The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7. *J. Immunol.* 188: 5561–5570.
30. Pelletier, A. N., and S. Lesage. 2013. The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J. Autoimmun.* 43: 70–77.
31. Carlborg, O., and C. S. Haley. 2004. Epistasis: too often neglected in complex trait studies? *Nat. Rev. Genet.* 5: 618–625.
32. Lagna, G., A. Hata, A. Hemmati-Brivanlou, and J. Massagué. 1996. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 383: 832–836.
33. Kavsak, P., R. K. Rasmussen, C. G. Causing, S. Bonni, H. Zhu, G. H. Thomsen, and J. L. Wrana. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* 6: 1365–1375.
34. Marcoe, J. P., J. R. Lim, K. L. Schaubert, N. Fodil-Cornu, M. Matka, A. L. McCubrey, A. R. Farr, S. M. Vidal, and Y. Laouar. 2012. TGF-β is responsible for NK cell immaturity during ontogeny and increased susceptibility to infection during mouse infancy. *Nat. Immunol.* 13: 843–850.
35. Kornfeld, J. W., F. Grebien, M. A. Kerenyi, K. Friedbichler, B. Kovacic, B. Zankl, A. Hoelbl, H. Nivarti, H. Beug, V. Sexl, et al. 2008. The different functions of Stat5 and chromatin alteration through Stat5 proteins. *Front. Biosci.* 13: 6237–6254.
36. Sallmyr, A., J. Fan, K. Datta, K. T. Kim, D. Grosu, P. Shapiro, D. Small, and F. Rassoul. 2008. Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML. *Blood* 111: 3173–3182.
37. Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, and S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9: 503–510.
38. Walzer, T., M. Dalod, E. Vivier, and L. Zitvogel. 2005. Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5(Suppl. 1): S49–S59.
39. Sitnicka, E., D. Bryder, K. Theilgaard-Mönch, N. Buza-Vidas, J. Adolfsson, and S. E. Jacobsen. 2002. Key role of flt3 ligand in regulation of the common lymphoid progenitor but not in maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Immunity* 17: 463–472.
40. Sullivan, R. P., J. W. Leong, and T. A. Fehniger. 2013. MicroRNA regulation of natural killer cells. *Front. Immunol.* 4: 44.
41. Nazarov, P. V., S. E. Reinsbach, A. Muller, N. Nicot, D. Philippidou, L. Vallar, and S. Kreis. 2013. Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function. *Nucleic Acids Res.* 41: 2817–2831.
42. Brady, C. A., and L. D. Attardi. 2010. p53 at a glance. *J. Cell Sci.* 123: 2527–2532.
43. Riley, T., E. Sontag, P. Chen, and A. Levine. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 402–412.
44. Bandelet, O. J., X. Wang, M. R. Campbell, G. S. Pittman, and D. A. Bell. 2011. Human single-nucleotide polymorphisms alter p53 sequence-specific binding at gene regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 39: 178–189.
45. Castillo, E. F., S. W. Stonier, L. Frasca, and K. S. Schluns. 2009. Dendritic cells support the in vivo development and maintenance of NK cells via IL-15 trans-presentation. *J. Immunol.* 183: 4948–4956.
46. Guimond, M., A. G. Freud, H. C. Mao, J. Yu, B. W. Blaser, J. W. Leong, J. B. Vandusen, A. Dorrance, J. Zhang, C. L. Mackall, and M. A. Caligiuri. 2010. In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *J. Immunol.* 184: 2769–2775.
47. Zhong, J., Q. Yu, P. Yang, X. Rao, L. He, J. Fang, Y. Tu, Z. Zhang, Q. Lai, S. Zhang, et al. 2014. MBD2 regulates TH17 differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the homeostasis of T-bet/Hlx axis. *J. Autoimmun.* 53: 95–104.
48. Vogelstein, B., D. Lane, and A. J. Levine. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307–310.
49. Muller, P. A., and K. H. Vousden. 2014. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25: 304–317.
50. Tomso, D. J., A. Inga, D. Menendez, G. S. Pittman, M. R. Campbell, F. Storici, D. A. Bell, and M. A. Resnick. 2005. Functionally distinct polymorphic sequences in the human genome that are targets for p53 transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 6431–6436.
51. Bezman, N. A., E. Cedars, D. F. Steiner, R. Bllecho, D. G. T. Hesslein, and L. L. Lanier. 2010. Distinct requirements of microRNAs in NK cell activation, survival, and function. *J. Immunol.* 185: 3835–3846.
52. Sullivan, R. P., J. W. Leong, S. E. Schneider, C. R. Keppel, E. Germino, A. R. French, and T. A. Fehniger. 2012. MicroRNA-deficient NK cells exhibit decreased survival but enhanced function. *J. Immunol.* 188: 3019–3030.
53. Fehniger, T. A., T. Wylie, E. Germino, J. W. Leong, V. J. Magrini, S. Koul, C. R. Keppel, S. E. Schneider, D. C. Koboldt, R. P. Sullivan, et al. 2010. Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome Res.* 20: 1590–1604.
54. Liu, X., Y. Wang, Q. Sun, J. Yan, J. Huang, S. Zhu, and J. Yu. 2012. Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunol. Lett.* 143: 208–217.
55. Taylor, D., P. Badiani, and K. Weston. 1996. A dominant interfering Myb mutant causes apoptosis in T cells. *Genes Dev.* 10: 2732–2744.
56. Salomoni, P., D. Perrotti, R. Martinez, C. Franceschi, and B. Calabretta. 1997. Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-Myb is associated with induction of BCL-2 expression and Myb-dependent regulation of bcl-2 promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 3296–3301.
57. Jang, C. W., C. H. Chen, C. C. Chen, J. Y. Chen, Y. H. Su, and R. H. Chen. 2002. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat. Cell Biol.* 4: 51–58.
58. Huntington, N. D., H. Puthalakath, P. Gunn, E. Naik, E. M. Michalak, M. J. Smyth, H. Tabarias, M. A. Degli-Esposti, G. Dewson, S. N. Willis, et al. 2007. Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat. Immunol.* 8: 856–863.
59. Ranson, T., C. A. Vossenrich, E. Corcuff, O. Richard, W. Müller, and J. P. Di Santo. 2003. IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood* 101: 4887–4893.
60. Yamanaka, Y., H. Tagawa, N. Takahashi, A. Watanabe, Y. M. Guo, K. Iwamoto, J. Yamashita, H. Saitoh, Y. Kameoka, N. Shimizu, et al. 2009. Aberrant overexpression of microRNAs activate AKT signaling via down-regulation of tumor suppressors in natural killer-cell lymphoma/leukemia. *Blood* 114: 3265–3275.
61. Karo, J. M., D. G. Schatz, and J. C. Sun. 2014. The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells. *Cell* 159: 94–107.
62. Pilbeam, K., P. Basse, L. Brossay, N. Vujanovic, R. Gerstein, A. N. Vallejo, and L. Borghesi. 2008. The ontogeny and fate of NK cells marked by permanent DNA rearrangements. *J. Immunol.* 180: 1432–1441.

63. Pelletier, A. N., F. Guimont-Desrochers, M. P. Ashton, T. C. Brodnicki, and S. Lesage. 2012. The size of the plasmacytoid dendritic cell compartment is a multigenic trait dominated by a locus on mouse chromosome 7. *J. Immunol.* 188: 5561–5570.
64. Yu, M. C., L. L. Su, L. Zou, Y. Liu, N. Wu, L. Kong, Z. H. Zhuang, L. Sun, H. P. Liu, J. H. Hu, et al. 2008. An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9: 898–907.
65. Golden-Mason, L., R. H. McMahan, M. Strong, R. Reisdorph, S. Mahaffey, B. E. Palmer, L. Cheng, C. Kulesza, M. Hirashima, T. Niki, and H. R. Rosen. 2013. Galectin-9 functionally impairs natural killer cells in humans and mice. *J. Virol.* 87: 4835–4845.
66. Bernardini, G., G. Sciumè, D. Bosisio, S. Morrone, S. Sozzani, and A. Santoni. 2008. CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood* 111: 3626–3634.
67. Maghazachi, A. A. 2010. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 341: 37–58.
68. Maghazachi, A. A., A. Al-Aoukaty, and T. J. Schall. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *Eur. J. Immunol.* 26: 315–319.
69. Betten, A., C. Dahlgren, U. H. Mellqvist, S. Hermodsson, and K. Hellstrand. 2004. Oxygen radical-induced natural killer cell dysfunction: role of myeloperoxidase and regulation by serotonin. *J. Leukoc. Biol.* 75: 1111–1115.
70. Alcón, V. L., C. Luther, D. Balce, and F. Takei. 2009. B-cell co-receptor CD72 is expressed on NK cells and inhibits IFN-gamma production but not cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 39: 826–832.
71. Herrero, L. J., K. C. Sheng, P. Jian, A. Taylor, Z. Her, B. L. Herring, A. Chow, Y. S. Leo, M. J. Hickey, E. F. Morand, et al. 2013. Macrophage migration inhibitory factor receptor CD74 mediates alphavirus-induced arthritis and myositis in murine models of alphavirus infection. *Arthritis Rheum.* 65: 2724–2736.
72. Oberlies, J., C. Watzl, T. Giese, C. Luckner, P. Kropf, I. Müller, A. D. Ho, and M. Munder. 2009. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J. Immunol.* 182: 5259–5267.
73. Abegglen, L. M., A. F. Caulin, A. Chan, K. Lee, R. Robinson, M. S. Campbell, W. K. Kiso, D. L. Schmitt, P. J. Waddell, S. Bhaskara, et al. 2015. Potential mechanisms for cancer resistance in elephants and comparative cellular response to DNA damage in humans. *JAMA* 314: 1850–1860.
74. Merino, D., and D. Malkin. 2014. p53 and hereditary cancer. *Subcell. Biochem.* 85: 1–16.

ANNEXE 2.2:
**Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes
susceptibility loci, Idd2 and Idd13, in determining
immunoregulatory DN T cell proportion**



Genetic interaction between two insulin-dependent diabetes susceptibility loci, *Idd2* and *Idd13*, in determining immunoregulatory DN T cell proportion

Roxanne Collin^{1,2} · Kathy Doyon¹ · Victor Mullins-Dansereau^{1,2} · Martin Karam^{3,4} · Geneviève Chabot-Roy¹ · Erin E. Hillhouse¹ · Alexandre Orthwein^{3,4,5} · Sylvie Lesage^{1,2} 

Received: 9 February 2018 / Accepted: 12 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Several immune regulatory cell types participate in the protection against autoimmune diseases such as autoimmune diabetes. Of these immunoregulatory cells, we and others have shown that peripheral CD4⁻CD8⁻ double negative (DN) T cells can induce antigen-specific immune tolerance. Particularly, we have described that diabetes-prone mice exhibit a lower number of peripheral DN T cells compared to diabetes-resistant mice. Identifying the molecular pathways that influence the size of the DN T cell pool in peripheral lymphoid organs may thus be of interest for maintaining antigen-specific immune tolerance. Hence, through immunogenetic approaches, we found that two genetic loci linked to autoimmune diabetes susceptibility, namely *Idd2* and *Idd13*, independently contribute to the partial restoration of DN T cell proportion in secondary lymphoid organs. We now extend these findings to show an interaction between the *Idd2* and *Idd13* loci in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs. Using bioinformatics tools, we link potential biological pathways arising from interactions of genes encoded within the two loci. By focusing on cell cycle, we validate that both the *Idd2* and *Idd13* loci influence RAD51 expression as well as DN T cell progression through the cell cycle. Altogether, we find that genetic interactions between *Idd2* and *Idd13* loci modulate cell cycle progression, which contributes, at least in part, to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

Keywords Double negative T cells · Type 1 diabetes · Transgenic mice · Cell cycle

Introduction

A prominent role in the prevention of autoimmunity has been credited to various regulatory cell subsets, including peripheral immunoregulatory CD4⁻CD8⁻ double negative (DN) T cells. Indeed, DN T cells have been shown to inhibit immune responses in an antigen-specific manner (Zhang et al. 2006; Zhang et al. 2000). This has major implications since the use of DN T cells in immunotherapy should therefore lead to fewer side effects and a decreased risk of infection, which remains a major concern in the application of broad immunosuppressive regimens (Bluestone et al. 2010a). As a result, DN T cells have been studied in various disease models, revealing that DN T cells display a promising therapeutic potential in the induction of allo- and xenograft tolerance (Chen et al. 2003; Ma et al. 2008; Young et al. 2002; Zhang et al. 2000) and in the prevention of both graft-vs-host disease (He et al. 2007; McIver et al. 2008; Young et al. 2003; Young et al. 2002) and

✉ Alexandre Orthwein
alexandre.orthwein@mcgill.ca

✉ Sylvie Lesage
sylvie.lesage@umontreal.ca

¹ Division of Immunology-oncology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center, Montréal, 5415 l'Assomption Blvd, Québec H1T 2M4, Canada

² Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

³ Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec H4A 3J1, Canada

⁴ Lady Davis Institute, Jewish General Hospital, 3755 Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec H3T 1E2, Canada

⁵ Department of Oncology, McGill University, Montréal, Québec H4A 3J1, Canada

autoimmune diabetes (Dugas et al. 2010; Duncan et al. 2010; Ford et al. 2007; Zhang et al. 2011).

Using TCR transgenic models, our work has supported the contribution of DN T cells towards immune tolerance in autoimmune diabetes (Dugas et al. 2010). Specifically, we have demonstrated that TCR transgenic DN T cell proportion is low in autoimmune diabetes-susceptible mice (Dugas et al. 2010). However, the immunoregulatory function of TCR transgenic DN T cells remains unaltered in these mice (Hillhouse et al. 2010), demonstrating that a deficiency in DN T cell number, rather than function, contributes to autoimmune diabetes susceptibility. Correspondingly, the injection of DN T cells is sufficient to reduce the incidence of autoimmune diabetes in autoimmune diabetes-susceptible mice in the TCR transgenic setting (Dugas et al. 2010). These results highlight the importance of identifying the genetic determinants controlling DN T cell number as they may reveal key molecular targets to promote DN T cell development, thereby supporting immune tolerance.

As for most autoimmune diseases, susceptibility to autoimmune diabetes is a complex genetic trait (Bluestone et al. 2010b; Concannon et al. 2009). NOD (non-obese diabetic) mice, which spontaneously develop autoimmune diabetes, have facilitated the study of genetic factors underlying autoimmune diabetes susceptibility (Anderson and Bluestone 2005; Wicker et al. 2005). To date, more than 20 *Idd* (Insulin-dependent diabetes) loci linked to diabetes predisposition have been identified in NOD mice (www.T1Dbase.org), and the concordance with human diabetes susceptibility has been demonstrated for some of these loci (Driver et al. 2011; Wicker et al. 2005). Subsequent analysis of NOD.*Idd* congenic mice has revealed *Idd* regions which are sufficient to reduce insulinitis and/or diabetes incidence (Ghosh et al. 1993; Lyons et al. 2000; McAleer et al. 1995; Serreze et al. 1994). Interestingly, we have also linked certain *Idd* regions to the regulation of DN T cell number (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014), where increased DN T cell number is associated with autoimmune diabetes resistance (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010). More specifically, using a linkage analysis approach and congenic strain validation, we have shown that DN T cell proportion in peripheral lymphoid organs is a multigenic trait and that both *Idd2* and *Idd13* loci each contribute to the partial restoration of DN T cell numbers in the spleen and lymph nodes (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). These results suggest that *Idd2* and *Idd13* loci modulate diabetes development, at least in part, by influencing DN T cell number.

Idd2 and *Idd13*, located on chromosome 9 and 2, respectively, are two loci linked to autoimmune diabetes susceptibility, while *Idd2* is also linked to insulinitis (Ghosh et al. 1993; Prochazka et al. 1987; Serreze et al. 1998; Serreze et al. 1994; Wicker et al. 1995). Recently, our group has shown that, in contrast to *Idd13* (Hillhouse et al. 2016), the *Idd2* locus also

protects NOD.*H2^k* mice from diabetes development and insulinitis in the 3A9 TCR:insHEL transgenic model (Collin et al. 2014). In addition to their role in DN T cell number modulation in the non-transgenic and/or TCR transgenic setting, both *Idd2* and *Idd13* loci are thought to play a role in the selection of diabetogenic T cells (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014; Pearce et al. 1995; Serreze et al. 1998). Accordingly, the *Idd13* interval encodes for several candidate genes implicated in the negative selection of autoreactive T cells including the Mer tyrosine kinase (*Mertk*) gene as well as multiple apoptosis-associated genes (Liston et al. 2007; Liston et al. 2004; Serreze et al. 1998; Wallet et al. 2009; Zucchelli et al. 2005), and *Idd2* encodes for *Thy1*, *Cbl*, and *Il10ra*, all likely contributors to T cell biology (Lang and Bellgrau 2004; Prochazka et al. 1987). In addition to DN T cell numbers, the *Idd13* locus also influences the proportion of merocytic dendritic cells, another cell population associated with autoimmune diabetes susceptibility (Pelletier and Lesage 2013). Altogether, the *Idd2* and *Idd13* loci clearly play a role in autoimmune diabetes progression via different mechanisms, including the modulation of DN T cell number.

For our studies, we take advantage of a spontaneous autoimmune diabetes model, namely the 3A9 TCR:insHEL transgenic mouse model. In this model, the insHEL transgene promotes hen egg lysosyme (HEL) expression under the rat insulin promoter, thus inducing pancreatic β cell specific expression, while the 3A9 TCR transgene yields T cells recognizing a HEL peptide presented in the context of I-A^k (Akkaraju et al. 1997; Ho et al. 1994). To allow for effective HEL peptide presentation on I-A^k, this pair of insHEL and 3A9 TCR transgenes was introduced onto B10.BR and NOD.*H2^k* genetic backgrounds, resulting in the diabetes-resistant 3A9 TCR:insHEL B10.BR and diabetes-susceptible 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k* mouse strains (Lesage et al. 2002). Importantly, 3A9 DN T cell proportion is decreased in secondary lymphoid organs of mice from the diabetes-susceptible NOD.*H2^k* background in comparison to the diabetes-resistant B10.BR background (Dugas et al. 2010), where this difference is partially restored by the presence of the *Idd2* or *Idd13* locus from the B10.BR background in NOD.*H2^k* congenic mice (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014).

Herein, we investigated the interactions between genetic determinants encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci and how they influence DN T cell proportion. To do so, we generated 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice. Using the double congenic mice, we demonstrate an interaction between *Idd2* and *Idd13* loci in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs, where DN T cell proportion is fully restored in the lymph nodes of 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. By exploiting DAVID and STRING bioinformatics databases, we link potential biological pathways arising from interactions of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci. This in silico

approach suggested that the *Idd2* and *Idd13* loci may regulate cell cycle progression. Using congenic mice, we validate that the *Idd2* and *Idd13* loci influence progression through S-phase and DN T cell proliferation. Moreover, we find that both the *Idd2* and *Idd13* loci modulate RAD51 expression. Together, the bioinformatics data, the cell cycle analysis, and the regulation of RAD51 expression suggests that *Idd2* and *Idd13* loci modulate cell cycle progression, which likely contributes to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

Results

The proportion of 3A9 DN T cells is significantly lower in the lymph nodes of 3A9 TCR NOD.*H2^k* mice in comparison to 3A9 TCR B10.BR mice, even in the absence of cognate antigen (Dugas et al. 2010). This suggests that the NOD genetic background, independent of the autoimmune response, defines the low number of DN T cells in secondary lymphoid organs. To identify these genetic determinants, we previously performed a linkage analysis on an F2 outcross from these two parental strains and found that immunoregulatory DN T cell proportion is regulated by a multigenic trait in secondary lymphoid organs (Collin et al. 2014). By exploiting the 3A9 TCR transgenic mouse model, we subsequently demonstrated that both *Idd2* and *Idd13* loci independently contribute to defining the proportion and number of DN T cells in the spleen and lymph nodes (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). Still, 3A9 TCR NOD mice congenic for either of these loci presented with a modest increase in DN T cell number relative to mice bearing the B10.BR genetic background. As a result, we proposed that interactions between genetic determinants encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the proportion and number of immunoregulatory DN T cells. We segregated the F2 mice from our aforementioned linkage analysis (Collin et al. 2014) according to their genotype at the SNP with the highest LOD score on both chromosome 2 (*Idd13*) and chromosome 9 (*Idd2*), namely rs6193859 and D9Mit232, respectively, and plotted the proportion of 3A9 DN T cells from the skin-draining lymph nodes (Fig. 1a, Table 1). F2 mice bearing NOD homozygous alleles at the *Idd2* locus present with a low proportion of DN T cells, which is not significantly influenced by the presence of either NOD or B10.BR alleles at the *Idd13* locus (Fig. 1a, white circles). However, we find a significant increase in the proportion of DN T cells in F2 mice bearing homozygous B10.BR alleles at both loci (19.34 ± 1.42) when compared to mice bearing homozygous NOD alleles at *Idd2* (13.60 ± 1.10), at *Idd13* (13.65 ± 1.36), or at both loci (11.82 ± 2.05) (Table 1). This suggests that B10.BR alleles from both *Idd2* and *Idd13* loci may have an additive or synergistic effect in regulating DN T cell proportion.

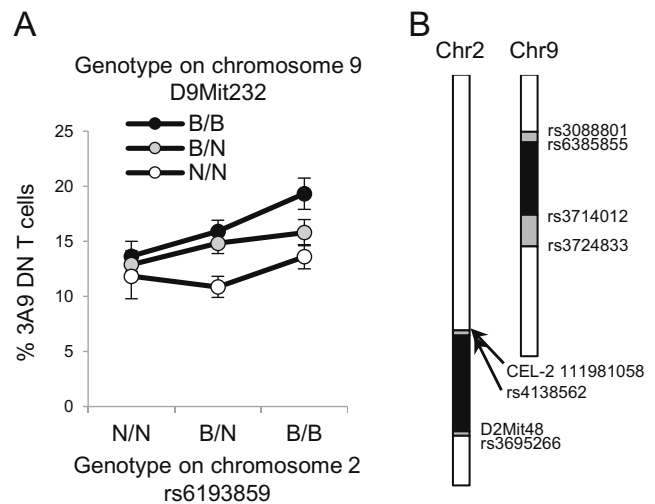


Fig. 1 Interactions between chromosome 2 and chromosome 9 in determining 3A9 DN T cell proportion in 3A9 TCR F2 mice. **a** The proportion of 3A9 DN T cells in the skin-draining lymph nodes of 3A9 TCR F2 mice is represented based on their genotype on chromosome 2 at rs6193859 (x axis) and chromosome 9 at D9Mit232 (colored circles). N/N = homozygous NOD.*H2^k* alleles, B/N = heterozygous alleles, B/B = B10.BR homozygous alleles. Black circles, homozygous B10.BR alleles at D9Mit232; gray circles, heterozygous alleles at D9Mit232; white circles, homozygous NOD.*H2^k* alleles at D9Mit232. Mean \pm SEM are represented. **b** Schematic representation of mouse chromosome 2 and chromosome 9 from NOD.*H2^k*-*Idd2/13* congenic mice. The delimitation of the congenic interval as defined by Illumina medium density or PCR reaction. B10 alleles are shown in black, NOD alleles in white, and alleles of undetermined origin in gray. The markers are positioned according to assembly NCBI m37 coordinates

To test this potential interaction between *Idd2* and *Idd13* loci, we generated 3A9 TCR NOD.*H2^k*-*Idd2/13* as well as 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice, where the limits of the intervals were determined by genotyping and medium density SNP Illumina platform (Fig. 1b). As previously reported, B10.BR mice present with a higher proportion of 3A9 DN T cells than NOD.*H2^k* mice in both the spleen and lymph nodes of either the 3A9 TCR single transgenic or 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Fig. 2) (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010; Dugas et al. 2013;

Table 1 3A9 DN T cell proportion in the lymph nodes of 3A9 TCR F2 mice based on homozygous genotypes at one or both loci, specifically at rs6193859 encoded within *Idd13* and at D9Mit232 encoded within *Idd2*

| <i>Idd13</i> ; <i>Idd2</i> | Mean \pm SEM | | <i>Idd13</i> ; <i>Idd2</i> | Mean \pm SEM | <i>p</i> value |
|----------------------------|------------------|----|----------------------------|------------------|----------------|
| N/N; N/N | 11.82 \pm 2.05 | vs | B/B; N/N | 13.60 \pm 1.10 | 1.00 |
| N/N; N/N | 11.82 \pm 2.05 | vs | N/N; B/B | 13.65 \pm 1.36 | 1.00 |
| N/N; N/N | 11.82 \pm 2.05 | vs | B/B; B/B | 19.34 \pm 1.42 | 0.011 |
| B/B; N/N | 13.60 \pm 1.10 | vs | N/N; B/B | 13.65 \pm 1.36 | 1.00 |
| B/B; N/N | 13.60 \pm 1.10 | vs | B/B; B/B | 19.34 \pm 1.42 | 0.039 |
| N/N; B/B | 13.65 \pm 1.36 | vs | B/B; B/B | 19.34 \pm 1.42 | 0.033 |

**p* value < 0.05; ns: non-significant based on Bonferroni's Multiple Comparison Test

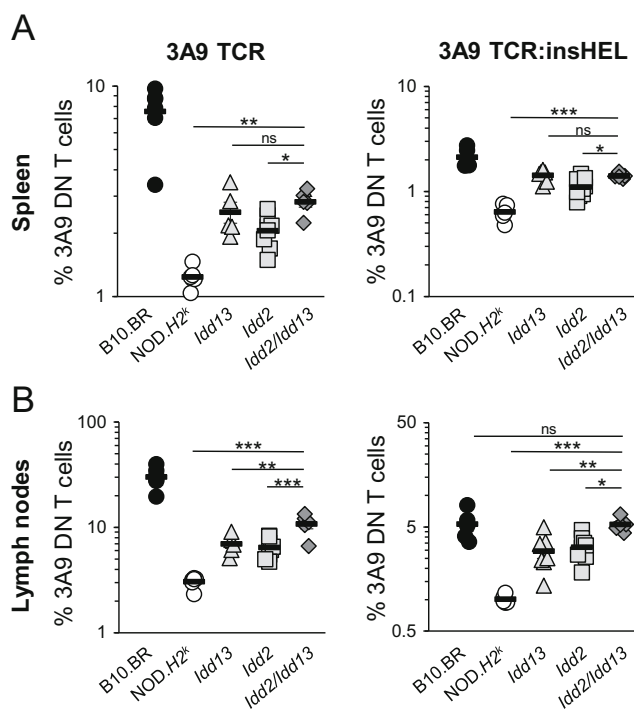


Fig. 2 The *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the proportion of 3A9 DN T cells in lymph nodes. The proportion of 3A9 DN T cells is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice in the spleen (a) and the lymph nodes (b). Each dot represents data from one mouse. Mean \pm SEM are shown. p value * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 according to one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. ns, non-significant

Dugas et al. 2014; Hillhouse et al. 2010). In addition, both the NOD.*H2^k*-*Idd2* and NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice show an increase in the proportion of 3A9 DN T cells relative to NOD.*H2^k* mice (Fig. 2) (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). Although the proportion of 3A9 DN T cells was increased in the spleen of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to the parental NOD.*H2^k* strain, the proportion of 3A9 DN T cells of the double congenic mice did not exceed that of NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice in the spleen (Fig. 2a). In contrast to the spleen, and in agreement with the F2 linkage data of 3A9 DN T cells in the lymph nodes (Fig. 1), we observe a statistically significant increase in the proportion of 3A9 DN T cells of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice compared to single congenic mice in the lymph nodes (Fig. 2b). Importantly, the proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice was comparable to that of the 3A9 TCR:insHEL B10.BR parental strain (Fig. 2b). Notably, the increased proportion of 3A9 DN T cells in the lymph nodes of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to NOD.*H2^k*, although not as striking, is corroborated in absolute numbers (Fig. 3), and is not the result of a decrease in the proportion of either CD4 or CD8 T cells (Table 2). Together, these data suggest that an interaction between *Idd2* and *Idd13*

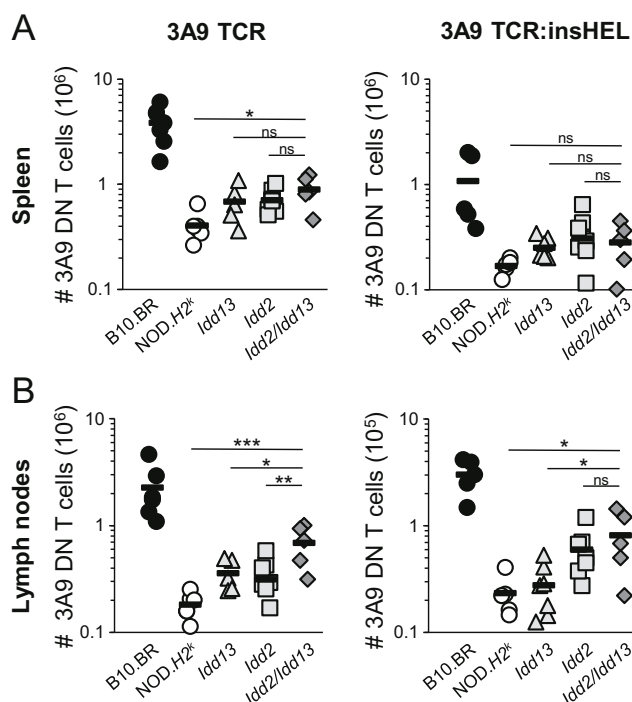


Fig. 3 The *Idd2* and *Idd13* loci cooperate to define the absolute number of 3A9 DN T cells in lymph nodes. The absolute number of 3A9 DN T cells is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice in the spleen (a) and the lymph nodes (b). Each dot represents data from one mouse. Mean \pm SEM are shown. p value * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 according to one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. ns, non-significant

loci increases the proportion of 3A9 DN T cells in the NOD.*H2^k* transgenic mice.

The increased proportion of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to that of NOD.*H2^k* mice may potentially result from an increase in thymic selection in the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. We thus quantified the proportion of 3A9 DN T cells in the thymus of the various 3A9 TCR single transgenic and 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice. As for the spleen and lymph nodes, we find a higher proportion and absolute number of 3A9 DN T cells in the thymus of B10.BR mice relative to NOD.*H2^k* mice, in both the 3A9 TCR single transgenic and 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Fig. 4). In addition, the NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice show a modest increase in the proportion of 3A9 DN T cells relative to NOD.*H2^k* mice, whereas the increase in 3A9 DN T cells for NOD.*H2^k*-*Idd2* is only observed in the 3A9 TCR:insHEL double transgenic mice (Fig. 4). Notably, although the proportion and absolute number of 3A9 DN T cells was modestly increased in the thymus of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice relative to NOD.*H2^k* mice, this increase was comparable to that observed in the NOD.*H2^k*-*Idd13* single congenic mice (Fig. 4). This suggests the absence of an additive effect of the *Idd2* and *Idd13* loci in defining DN T cell number in the thymus. In line

Table 2 Proportion of 3A9 CD4⁺ and 3A9 CD8⁺ T cells in the spleen and lymph nodes of 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL mice in each strain, as indicated. Mean ± SD from at least four mice per group is shown

| | | 3A9 TCR | | 3A9 TCR:insHEL | |
|-------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | % 3A9 CD4 T cells | % 3A9 CD8 T cells | % 3A9 CD4 T cells | % 3A9 CD8 T cells |
| Spleen | B10.BR | 4.43 ± 3.20 | 1.22 ± 0.52 | 0.21 ± 0.08 | 0.12 ± 0.07 |
| | NOD.H2 ^k | 5.91 ± 3.27 | 0.79 ± 0.18 | 1.47 ± 0.98 | 0.16 ± 0.04 |
| | NOD. <i>Idd13</i> | 6.62 ± 2.26 | 1.6 ± 0.47 | 1.82 ± 1.26 | 0.48 ± 0.08 |
| | NOD. <i>Idd2</i> | 6.58 ± 4.59 | 1.54 ± 0.52 | 1.61 ± 2.9 | 0.5 ± 0.28 |
| | NOD. <i>Idd2-Idd13</i> | 4.15 ± 2.10 | 1.07 ± 0.32 | 0.64 ± 0.35 | 0.36 ± 0.12 |
| Lymph nodes | B10.BR | 9.52 ± 5.68 | 4.04 ± 1.72 | 0.24 ± 0.12 | 0.53 ± 0.33 |
| | NOD.H2 ^k | 15.15 ± 6.18 | 2.78 ± 0.69 | 2.72 ± 2.56 | 0.86 ± 0.38 |
| | NOD. <i>Idd13</i> | 17.24 ± 6.44 | 5.85 ± 1.65 | 2.69 ± 2.07 | 1.83 ± 0.68 |
| | NOD. <i>Idd2</i> | 15.11 ± 7.91 | 5.52 ± 1.71 | 1.07 ± 1.3 | 1.44 ± 0.67 |
| | NOD. <i>Idd2-Idd13</i> | 8.87 ± 3.80 | 4.41 ± 0.79 | 0.81 ± 0.52 | 1.47 ± 0.40 |

with our previous work showing that thymic DN T cell proportion in 3A9 TCR mice does not correlate with 3A9 DN T cell proportion in secondary lymphoid organs (Dugas et al. 2013), we find that the increased proportion of 3A9 DN T cells in the secondary lymphoid organs of NOD.H2^k-*Idd2/13*

double congenic mice relative to NOD.H2^k mice is not a consequence of increased thymic differentiation towards the DN T cell lineage.

In the 3A9 TCR:insHEL B10.BR, BALB.K, and NOD.H2^k mice, we have previously shown that elevated numbers 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs correlate with a decrease in diabetes incidence and that injection of 3A9 DN T cells in the BALB.K setting is sufficient to prevent diabetes onset (Dugas et al. 2010). We have also shown that 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-*Idd2* mice exhibit an increase in 3A9 DN T cells and a lower incidence of diabetes relative to 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k mice (Collin et al. 2014). However, we recently found that 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-*Idd13* mice, which present an increase in 3A9 DN T cells relative to their NOD.H2^k counterpart (Fig. 2) (Dugas et al. 2014), exhibit an increase in diabetes incidence (Hillhouse et al. 2016). This result suggests that, in contrast to *Idd2*, the increase in DN T cell number conferred by the *Idd13* locus is not sufficient to control insulinitis present in the 3A9 TCR:insHEL mouse model (as detailed in (Hillhouse et al. 2016)). Because of the contrasting phenotypes of *Idd2* and *Idd13* in controlling diabetes incidence in 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k mice, we decided to study the impact of the combination of both *Idd2* and *Idd13* loci. Expectedly, 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-*Idd2/13* double congenic mice presented a level of insulinitis that was comparable to both 3A9 TCR:insHEL B10.BR and NOD.H2^k mice (Fig. 5). Still, all of the nine 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-*Idd2/13* mice that were aged to over 28 weeks remained diabetes-free and never exhibited glucosuria nor glycemia (Table 3). The combination of the *Idd2* and *Idd13* loci in the 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k mice also significantly reduced the serum level of HEL-specific IgG autoantibodies (Table 3). Taken together, these data show that the combined presence of *Idd2* and *Idd13* loci in 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k mice enhances the proportion

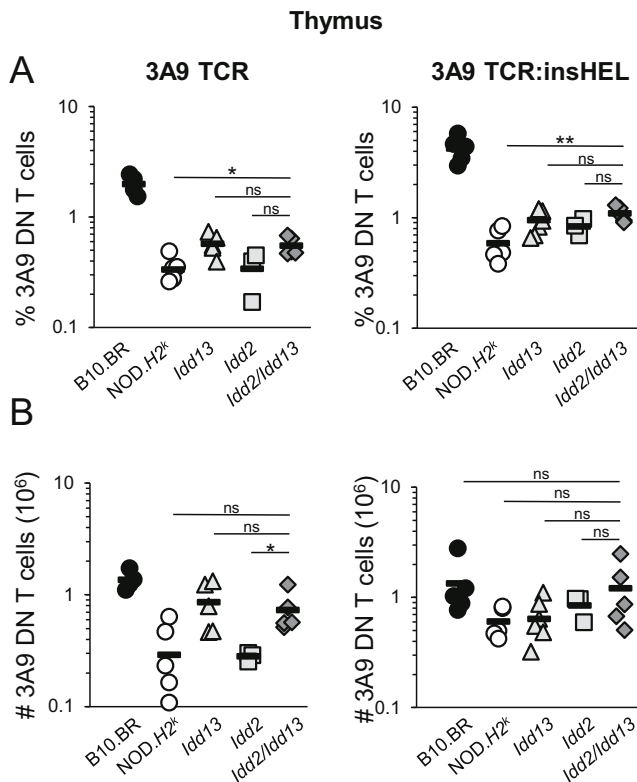


Fig. 4 The impact of *Idd2* and *Idd13* loci on the proportion and number of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs is not due to increased thymic differentiation. The proportion (a) and absolute number (b) of 3A9 DN T cells in the thymus is shown for 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL transgenic mice. Each dot represents data from one mouse. Mean ± SEM are shown. *p* value * < 0.05, ** < 0.01 according to one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test. ns, non-significant

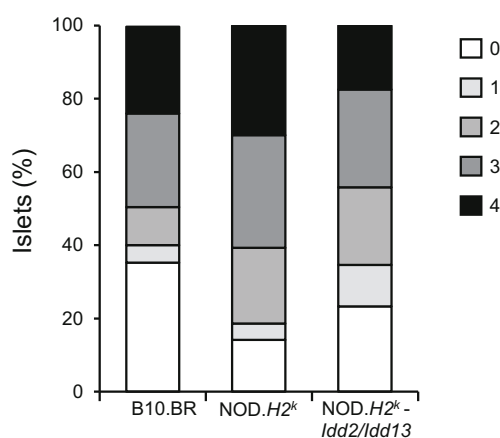


Fig. 5 Insulinitis is not affected by the combination of *Idd2* and *Idd13* loci in 3A9 TCR:insHEL mice. The degree of islet infiltration is shown for euglycemic male and female mice of 8–14 weeks old. B10.BR ($n = 5$), NOD.H2^k ($n = 4$), and NOD.H2^k-*Idd2/Idd13* mice ($n = 5$)

of 3A9 DN T cells in secondary lymphoid organs and decreases the level of autoantibodies, as well as prevents diabetes onset.

We next sought to define the biological process related to the increase in DN T cell proportion which is mediated by the combination of the *Idd2* and *Idd13* congenic intervals. We considered all of the genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci. We then queried the DAVID bioinformatics database based on the gene list from the *Idd2* and *Idd13* loci. The *Idd2* and *Idd13* gene lists independently revealed nine and five biological processes respectively, while 11 biological processes were identified by the combination of the two gene lists (Table 4). Using the combined *Idd2* and *Idd13* gene lists obtained by the DAVID analysis, we next independently queried the STRING database for each of these 11 biological processes. We selectively considered associations from genes in *Idd2* and *Idd13* that showed a confidence score above 0.7 for the given biological process (Table 5). We find strong interactions between genes in all biological processes, except for lipid transport where the four links between genes from *Idd2* and *Idd13* all presented with a confidence below 0.7. Based on this observation, we decided to further restrict our attention to biological processes where a confidence score above 0.7 was given to most of the gene interactions (i.e., more than 50% of the interactions). Out of the 11 biological processes,

only 3 fit these criteria, namely phospholipid catabolism, T cell, and cell cycle (Table 5, highlighted in gray).

The DAVID analysis grouped 7 genes from the *Idd2* locus and 28 genes from the *Idd13* locus under phospholipid catabolism. STRING revealed that only two genes from the *Idd2* locus, namely *Arhgef12* and *Pafah1b2*, were associated with genes from the *Idd13* locus (Fig. 6a). Accordingly, *Arhgef12* was linked to *Adra1d* while *Pafah1b2* was linked to four genes of the *Pla2g4* family, specifically *Pla2g4b*, *Pla2g4d*, *Pla2g4e*, and *Pla2g4f*. Based on ImmGen, *Arhgef12* is strongly expressed in germinal center B cells and *Pafah1b2* is expressed in many immune cell populations (immgen.org). However, neither *Adra1d* nor any of the four *Pla2g4* genes from the *Idd13* locus are expressed in hematopoietic cells (immgen.org). As we have previously shown that DN T cell proportion is regulated at least in part by hematopoietic-intrinsic factors (Dugas et al. 2014), it is unclear how the *Arhgef12* and *Pafah1b2* genes from the *Idd2* locus interact with *Adra1d* or any of the four *Pla2g4* genes from the *Idd13* locus to influence the proportion of DN T cells, as none of the potentially interacting genes in *Idd13* are expressed in the hematopoietic system.

The T cell biological process showed interactions between genes from the CD3 complex encoded in the *Idd2* locus and *B2m* from the *Idd13* locus (Fig. 6b). This interaction stems from the antigen presentation of peptides to CD8⁺ T cells, where the chains of the CD3 complex are necessary for TCR expression which recognizes peptides in the context of MHC class I molecules that are associated with $\beta 2m$. However, we have previously demonstrated that *B2m* deficiency does not decrease the proportion of 3A9 DN T cells in both the spleen and lymph nodes of 3A9 TCR transgenic mice, as shown in *B2m*-deficient mice from both B10.BR and NOD.H2^k genetic backgrounds (Dugas et al. 2014). The T cell biological process is thus unlikely to explain the additive interaction between *Idd2* and *Idd13* loci in defining the proportion of DN T cells.

Finally, STRING analysis of the cell cycle progression reveals multiple relevant interactions between genes from the *Idd2* and *Idd13* loci (Fig. 6c). For one, *Chek1* in *Idd2* partners with *Rad51*, *Mcm8*, and *Cdc25b* in *Idd13* to regulate cell cycle progression (Kramer et al. 2004; Lutzmann et al. 2012; Patil et al. 2013; Sorensen et al. 2005). In addition, *Zw10* in *Idd2*

Table 3 Serum antibodies (relative units) and diabetes incidence of 3A9 TCR:insHEL mice from the different strains

| | B10.BR | NOD.H2 ^k | NOD.H2 ^k - <i>Idd2/Idd13</i> |
|-------------------------|--------------------|--------------------------|---|
| Levels of total IgG | 15.85 ± 4.06 | 10.34 ± 2.20 | 7.80 ± 2.35 |
| Levels of IgG anti-HEL | 0.45 ± 0.45 | 3.12 ± 0.90 | 1.49 ± 0.41 |
| Levels of IgG1 anti-HEL | 0.15 ± 0.12 | 0.57 ± 0.18 | 0.23 ± 0.07 |
| Diabetes incidence (%) | 25 ^{a, b} | 60–80 ^{a, b, c} | 0 |

^a Lesage, Goodnow, JEM (2002)

^b Collin et al., JI (2014)

^c Hillhouse et al., ICB (2016)

Table 4 Biological pathways present in *Idd2*, *Idd13* or in both loci

| <i>Idd2</i> | <i>Idd13</i> | <i>Idd2</i> and <i>Idd13</i> |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Cell junction and synapse | Cell cycle | Microtubules and cytoskeleton |
| Dendrite | Intracellular organelle | Cell cycle |
| DNA checkpoint | Response to stress | Nucleotide process |
| Glycosylation | Signal process | Phospholipid catabolic process |
| Immune system development | Cilium formation | Protease inhibitor |
| Ions transport and voltage | | Carbohydrate metabolism |
| Lipid metabolic process | | Ig-like domain |
| Negative regulation of motion | | Lipid transport |
| Protease | | Signal protein |
| | | T cell |
| | | Endoplasmic reticulum membrane |

and *Bub1*, *Bub1b*, and *Casc5* in *Idd13* all localize to the kinetochore and facilitate mitotic progression (Anderson et al. 2002; Genin et al. 2012; Taylor and McKeon 1997; Vallee et al. 2006; Varma et al. 2006). Importantly, all of these genes are ubiquitously expressed.

To determine if cell cycle progression is possibly impaired in NOD.*H2^k* and could therefore define DN T cell number, we performed cell cycle analysis using propidium iodide staining in total spleen cells from B10.BR, NOD.*H2^k* and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. A greater proportion of cells from NOD.*H2^k* mice were actively engaged in S-phase (Fig. 7a). Interestingly, cells from NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice exhibited a comparable cell cycle profile to that of B10.BR mice with a similar proportion of cells in S-phase (Fig. 7a). This finding suggests that the *Idd2* and *Idd13* loci on the NOD.*H2^k* background are sufficient to modulate the proportion of cells in S-phase. We confirm that this is not a particularity of the MHC haplotype, as we find that spleen cells from NOD mice also have a higher proportion of cells in S-phase relative to those from C57BL/6 mice (Fig. 7b). More importantly, we find that, among T cell subsets, the impact of the *Idd2* and *Idd13* loci on proliferation is specific to DN T cells (Fig. 7c). Indeed, when comparing T

cell subsets from both NOD.*H2^k* and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice, we find a similar proportion of either CD4⁺ or CD8⁺ T cells that express Ki-67. However, a lower proportion of DN T cells from NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice stained positive for Ki-67 relative to DN T cells from NOD.*H2^k* mice (Fig. 7c). As for S-phase measurements, the fraction of Ki-67⁺ DN T cells from NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice is comparable to that of B10.BR mice. Altogether, these data suggest that the low proportion of DN T cells in the NOD background is influenced by allelic variants of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci, which together influence the cell cycle of immunoregulatory DN T cells.

Progression of DN T cells through the cell cycle is influenced by the *Idd2* and *Idd13* loci. Of the candidate genes encoded within *Idd13*, our attention turned to *Rad51*, as inhibition of RAD51 has recently been shown to inhibit diabetes development (Ratiu et al. 2017). RAD51 is a recombinase involved in DNA repair, an essential step to allow efficient progression through the cell cycle. RAD51 acts downstream of γ -H2AX and CHEK1, both of which are encoded within *Idd2*. Interestingly, we found that RAD51, but not γ -H2AX, was expressed more abundantly in spleen cells from

Table 5 Summary of interactions between genes in *Idd2* and *Idd13* loci

| | Number of gene interactions with > 0.7 confidence score | Percentage of interactions with > 0.7 confidence score |
|--------------------------------|---|--|
| Phospholipid catabolism | 5 | 71.4% |
| T cell | 2 | 66.7% |
| Cell cycle | 15 | 51.7% |
| Carbohydrate metabolism | 5 | 45.5% |
| Microtubules and cytoskeleton | 10 | 41.7% |
| Ig-like domain | 3 | 33.3% |
| Signal protein | 20 | 26.7% |
| Protease inhibitor | 2 | 22.2% |
| Nucleotide process | 12 | 11.8% |
| Endoplasmic reticulum membrane | 1 | 10.0% |
| Lipid transport | 0 | 0.0% |

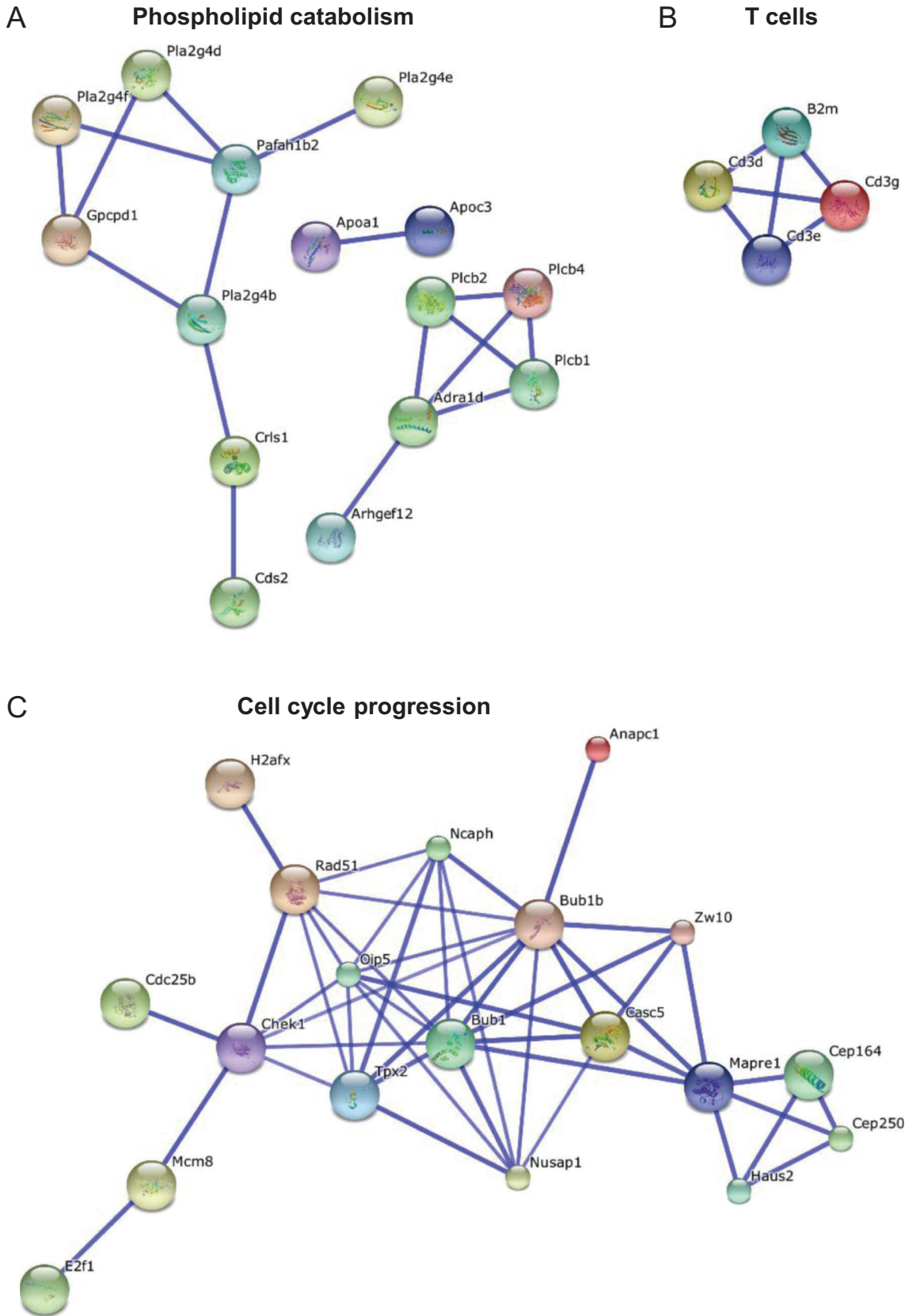


Fig. 6 STRING analysis of gene lists grouped under biological pathways revealed by DAVID. **a** Phospholipid catabolic process; **b** T cells; and **c** cell cycle progression, showing the confidence level of protein interaction for genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci

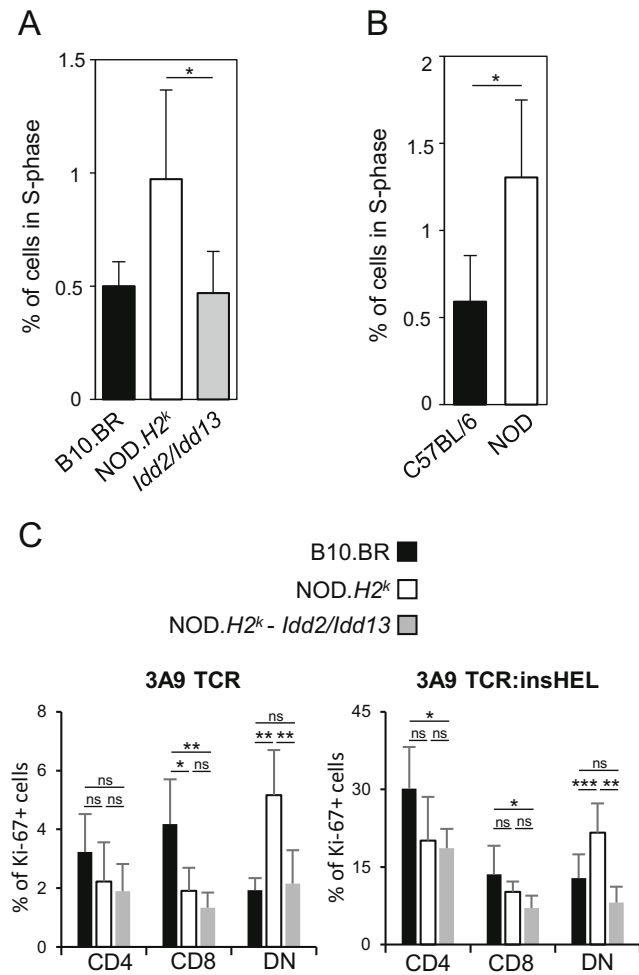


Fig. 7 Allelic variants in the *Idd2* and *Idd13* loci influence cell cycle. Total spleen cells were stained with propidium iodide and the percentage of cells in S-phase was quantified by flow cytometry, for **a** B10.BR, NOD.H2^k and NOD.H2^k-*Idd2*/*Idd13* mice (*n* = 5) and **b** C57BL/6 (B6) and NOD mice (*n* = 7). Mean ± SEM are shown. **c** Spleen cells from B10.BR and NOD.H2^k-*Idd2*/*Idd13* mice were stained with antibodies to CD3, CD4, CD8, and Ki-67. The percentage of Ki-67⁺ cells was quantified for CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), CD8⁺ (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), and DN (CD3⁺CD4⁻CD8⁻) T cells. *n* = 5. Mean ± SEM are shown. Student *t* test, *p* value * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, ns = non-significant

NOD.H2^k mice relative to B10.BR mice (Fig. 8 and data not shown). We also found that NOD.H2^k mice carrying either the *Idd2* or the *Idd13* locus both showed a reduction in RAD51 expression, which was not enhanced in NOD.H2^k-*Idd2*/*Idd13* mice (Fig. 8). This result suggests that polymorphisms within the *Idd13* locus, which encodes for *Rad51*, effectively modulate RAD51 expression. Importantly, it also suggests that polymorphisms in the *Idd2* locus, likely in either *H2afx* or *Chek1*, also impact RAD51 expression. Yet, the polymorphism in both *Idd2* and *Idd13* did not cooperate to restore RAD51 expression to the levels observed in B10.BR mice, suggesting that although *Idd2* and *Idd13* clearly regulate RAD51 expression, other pathways are also affected by the two loci.

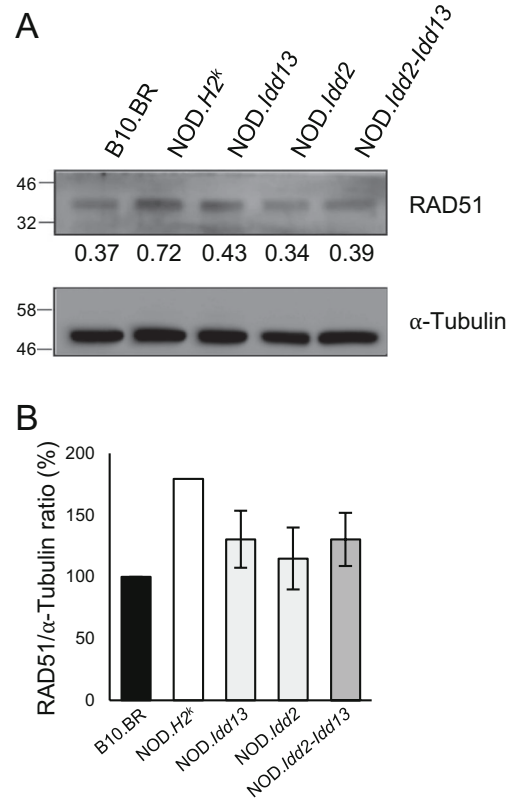


Fig. 8 RAD51 expression is modulated by polymorphisms on both the *Idd2* and *Idd13* loci. One representative Western blot (**a**) and data compilation (**b**) of relative RAD51 protein levels in total spleen cells from B10.BR, NOD.H2^k, NOD.H2^k-*Idd2*, NOD.H2^k-*Idd13*, and NOD.H2^k-*Idd2*/*Idd13* (*n* = 3). alpha-tubulin is used as a loading control.

Discussion

We have previously shown that autoimmune diabetes susceptibility is associated with decreased DN T cell proportion (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2010). In order to identify the genetic determinants defining DN T cell number, we used a linkage analysis approach and congenic strain validation and demonstrated that DN T cell proportion is influenced by *Idd2* and *Idd13* (Collin et al. 2014; Dugas et al. 2014). However, as the contribution of each locus was modest, we sought to investigate the interactions between the genetic determinants encoded within *Idd2* and *Idd13* loci and how they cooperate to define DN T cell numbers. Here, we analyzed our linkage analysis data (Collin et al. 2014) and revealed that F2 mice bearing homozygous B10.BR alleles at both the *Idd2* and *Idd13* loci exhibit a significant increase in DN T cell proportion when compared to mice bearing homozygous NOD alleles at either or both loci. In addition, we show that *Idd2* and *Idd13* together increase the proportion of DN T cells in both 3A9 TCR and 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k mice. Moreover, in a cohort of nine female mice, none of the 3A9 TCR:insHEL NOD.H2^k-*Idd2*/*Idd13* mice develop autoimmune diabetes. Together, these data suggest an additive effect of the mouse

Idd2 and *Idd13* loci in the restoration of DN T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance. Lastly, we demonstrated that cell cycle and DN T cell proliferation are regulated by the *Idd2* and *Idd13* loci. Together with our bioinformatics analysis, this suggests that cell cycle progression, by modulating RAD51 expression, is likely contributing to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs.

Of interest, RAD51 has recently been linked to type 1 diabetes (Ratiu et al. 2017). In this study, they find that inhibiting RAD51 protects from diabetes development by enhancing the proportion of immunoregulatory B cells. Notably, DN T cells are able to eliminate B cells and in vivo injection of DN T cells leads to a decrease in autoantibody levels (Dugas et al. 2010; Hillhouse et al. 2010; Ma et al. 2008). It is thus tempting to suggest that inhibiting RAD51 leads to a specific increase in DN T cells which would eliminate autoantibody-producing B cells, thereby resulting in a proportional increase in immunoregulatory B cells, altogether preventing autoimmune diabetes onset. Alternatively, as we have shown that RAD51 is generally increased in the spleen of NOD mice, inhibiting RAD51 may independently affect many cell types, all actively participating in the induction or maintenance of immune tolerance.

Identifying the molecular pathways that influence the size of the DN T cell pool in peripheral lymphoid organs is of interest as it will facilitate the identification of molecular targets that regulate DN T cell numbers. During our analysis of DAVID and STRING bioinformatics databases exploiting the *Idd2* and *Idd13* gene lists, we were able to limit our focus on three biological processes mediated by strong interactions of genes within the two loci, namely phospholipid catabolism, T cell biology, and cell cycle progression. However, concerning phospholipid catabolism, the five genes located within the *Idd13* locus that were found to interact with genes from the *Idd2* locus, specifically *Adra1d*, *Pla2g4b*, *Pla2g4d*, *Pla2g4e*, and *Pla2g4f*, are not expressed in hematopoietic cells (immgen.org). As we have previously shown that DN T cell proportion is regulated at least in part by hematopoietic-intrinsic factors (Dugas et al. 2014), we found it unlikely that the phospholipid catabolism is the biological process influencing DN T cell numbers. Likewise, the T cell biological process was highlighted by interactions between genes from the CD3 complex encoded in the *Idd2* locus and *B2m* from the *Idd13* locus, where we have previously shown that *B2m*-deficiency does not influence 3A9 DN T cell proportion in secondary lymphoid organs (Dugas et al. 2014). Therefore, the T cell biological process is not likely influencing DN T cell numbers. As a result, we shifted our focus to the third biological process highlighted by our bioinformatics analyses, cell cycle. The STRING analysis of the cell cycle progression revealed several relevant interactions between genes from the *Idd2* and *Idd13* loci, with various genes of interest being ubiquitously

expressed. We further validate that cell cycle and proliferation are regulated by the *Idd2* and *Idd13* loci as a greater proportion of lymphocytes from NOD.*H2^k* mice are in S-phase. Moreover, the proportion of Ki-67⁺ DN T cells is also increased in NOD.*H2^k* mice in comparison to both B10.BR and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice. The greater proportion of proliferating DN T cells in NOD.*H2^k* mice, which exhibit a lower proportion of DN T cells in lymphoid organs, relative to NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice is counterintuitive. However, the increased proportion of cells in S-phase may suggest a block in cell cycle progression, yielding lower numbers of DN T cells. Altogether, our data thus suggest that DN T cell proportion is influenced by allelic variants of genes encoded within the *Idd2* and *Idd13* loci, which together influence cell cycle progression.

The cell cycle consists of a series of sequential phases, specifically the G₀/G₁, S, G₂, and M (mitosis) phases, leading to cell division. During the cell cycle, multiple checkpoints are encountered prior to entry into the subsequent phase, which provides an important surveillance mechanism for faithful replication and division of cells (Elledge 1996). The STRING analysis of the cell cycle progression revealed that *Chek1* in *Idd2* partners with *Rad51*, *Mcm8*, and *Cdc25b* from the *Idd13* locus. Indeed, each of these four genes play an important role during S-phase by controlling DNA replication and the DNA damage response to replicative stress. For instance, the DNA helicase MCM8 is a significant player in the elongation phase of DNA replication (Maiorano et al. 2005), it promotes RAD51 recruitment to DNA damage sites and it facilitates homologous recombination-mediated repair of DNA double-strand breaks (Park et al. 2013). As RAD51 is central in replication fork progression (Berti and Vindigni 2016), MCM8 may participate in this pathway during S-phase. In addition to MCM8, *Cdc25b*, which encodes a phosphatase that is essential for cell cycle transition by promoting the dephosphorylation of key substrates (Lammer et al. 1998), is also a key player during S-phase. For instance, down-regulation of *Cdc25* mRNA levels in HeLa cells delays S-phase and leads to a proliferation defect (Garner-Hamrick and Fisher 1998). Furthermore, CDC25B has been involved in centrosome duplication, a process that is initiated in S-phase (Boutros et al. 2007). Interestingly, unscheduled expression of CDC25B during DNA replication has been linked to replicative stress and the formation of DNA lesions (Bugler et al. 2010). In this regard, CHEK1 also plays a dual role during DNA replication. Indeed, CHEK1 is linked to fork progression during S-phase by controlling the initiation of DNA replication (Petermann et al. 2010), and is also critical in the response to single-stranded DNA lesions by phosphorylating key substrates, including the CDC25 phosphatases, and promoting the activation of DNA damage checkpoints (Patil et al. 2013). Interestingly, the conditional deletion, knockdown, or inhibition of *Chek1* is associated with an

accumulation of cells in S-phase cells as well as increased cell death (Lam et al. 2004; Sorensen et al. 2005), which mirrors our observations for DN T cells from mice exhibiting NOD alleles for *Idd2* and *Idd13*. Indeed, our findings suggest that the *Idd2* and *Idd13* loci regulate the proportion of cells accumulating in S-phase and of Ki-67⁺ DN T cells. Moreover, we find that NOD.*H2^k* mice carry fewer DN T cells than both B10.BR and NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice in the transgenic setting and that this difference in number may be regulated, at least in part, by apoptosis (Hillhouse et al. 2010). Interestingly, CHEK1 phosphorylates RAD51 at serine-309 and recruits it to DNA repair foci in order to promote homologous recombination repair and cell survival (Sorensen et al. 2005). The fact that we observe increased RAD51 levels in the NOD.*H2^k* mice and that RAD51 is central during S-phase argues for a model where dysregulation of RAD51 levels impairs progression of DN T cells through S-phase resulting in a block in their cell cycle progression. Consequently, these results suggests that potential genetic polymorphisms influencing the interactions between genes encoded within *Idd2*, such as *Chek1*, and those encoded within *Idd13*, such as *Rad51*, *Mcm8*, and *Cdc25b*, modulate DN T cell number.

In summary, our data clearly demonstrates an interaction between the *Idd2* and *Idd13* loci in determining the number of DN T cells in secondary lymphoid organs, where DN T cell proportion and number are increased in the 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2/13* mice relative to both single congenic mice and to 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*. Our findings also suggest that the S-phase is likely contributing to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. Although cell cycle progression was the biological process that we identified through our bioinformatics approach, we cannot exclude that other pathways contribute to defining the proportion of DN T cells in secondary lymphoid organs. Further investigation of NOD.*H2^k*-*Idd2/13* double congenic mice may reveal other relevant pathways as a target for potentiating the number of immunoregulatory DN T cells, which may be of clinical use for the antigen-specific treatment of various autoimmune pathologies.

Materials and methods

Mice

3A9 TCR transgenic and HEL transgenic mice, where HEL is expressed under the rat insulin promoter (insHEL), on B10.BR and NOD.*H2^k* backgrounds have been previously described (Lesage et al. 2002). The 3A9 TCR NOD.*H2^k*-*Idd2* congenic strain bears B10.BR alleles on chromosome 9 between 29.4 and 50.0 Mb (corresponding to markers rs6385855 and rs13480186) at a locus included within *Idd2* and was

described elsewhere (Collin et al. 2014). *Idd13* congenic mice were a gift of D.V. Serreze and were crossed to NOD.*H2^k* 3A9 TCR:insHEL background to introduce the transgenes (Dugas et al. 2014). The NOD.*H2^k*-*Idd2/Idd13* strain was obtained by an intercross between 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd2* mice and 3A9 TCR:insHEL NOD.*H2^k*-*Idd13* mice. Offspring were genotyped using the markers D9Mit129, D9Mit328, D2Mit132, D2Mit48, and D2Mit338. Mice bearing B10.BR alleles at all of these markers were selected for further intercrosses. After two generations of homozygous mating, an Illumina medium density linkage, serviced through The Centre for Applied Genomics at the Hospital for Sick Children, was performed on the tail DNA from congenic mice to delimit the boundaries of both the *Idd2* and *Idd13* loci in the NOD.*H2^k*-*Idd2/dd13* mice; *Idd2* (chromosome 9:29.6–61.4 Mb) and *Idd13* (chromosome 2:114.0–156.1 Mb) where positions are based on NCBI Build m38. All of the mouse strains were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital animal house facility (Montreal, Canada).

Flow cytometry

Eight- to 12-week-old non-diabetic mice (diastix negative) were analyzed. Spleen, lymph nodes, and thymus were pressed through a 70- μ m cell strainer (Thermo Fisher Scientific, Ottawa, Ontario, Canada). Spleen cell suspensions were treated with NH₄Cl to lyse red blood cells. Single cell suspensions were stained with the following antibodies to quantify 3A9 DN T cells: CD3 (17A2; Biolegend), TCR β (H57-597, Biolegend), CD4 (GK1.5; Biolegend and eBioscience), CD8 α (53-6.7; Biolegend), CD19 (6D5; Biolegend), and anti-clonotypic 1G12 (homemade) (Peterson et al. 1999) antibody followed by detection with IgG1 (RMG1-1; Biolegend). For Ki-67, cells were subsequently permeabilized using the eBioscience FoxP3 staining kit according to the manufacturer's protocol. Following permeabilization, cells were incubated with either Ki-67 (B56, BD) or its isotype control (IgG1 κ ; BD) for 30 min at 4 °C. For propidium iodide, single cell suspensions from the spleen were washed in PBS and thoroughly resuspended in cold 70% ethanol for at least 1 h at 4 °C. Cells were resuspended in 250 μ l of propidium iodide solution (40 μ g/ml propidium iodide, Invitrogen; 4 μ g/ml RNase, USBiological life sciences; diluted in PBS) per 1 million cells. Stained cells were kept on ice and rapidly processed on a flow cytometer. All data were collected either on a FACSCanto, LSRII, Fortessa x-20, or a BD FACSCalibur (BD Biosciences, Mississauga, Ontario, Canada). All data was analyzed with FlowJo software (Treestar, Ashland, OR, USA).

Histology

H&E staining was performed on 5 to 7 μm pancreas cuts from paraffin blocks, for two to three non-successive cuts for each mouse. H&E slides were scored for infiltration as previously described (Hillhouse et al. 2013), and according to the following scale: 0 = no infiltration, 1 = peri-insulinitis, 2 = infiltration < 50%, 3 = infiltration > 50%, 4 = complete infiltration.

ELISA

Total IgG was measured by ELISA according to the manufacturer's protocol (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, USA). Serum anti-HEL IgG and IgG1 levels were measured by ELISA on Nunc Maxisorp plates (Thermo Fisher Scientific) coated with 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HEL prepared in NaHCO_3 at pH 9.5, developed with goat anti-mouse IgG-HRP (Biolegend, clone poly4053) or rat anti-mouse IgG1-biotin (Biolegend, clone RMG1-1) followed by avidin-HRP (Biolegend). A reference pool of sera from diabetic and non-diabetic TCR:iHEL mice was set to contain 100 arbitrary units for anti-HEL antibodies or 10 arbitrary units for total IgG antibodies.

Diabetes incidence study

Diabetes incidence was monitored daily in female 3A9 TCR:iHEL mice for overt signs of diabetes (wet cage, hunched posture) and every 2 weeks for urine glucose levels using Diastix (Bayer, Toronto, Ontario, Canada) starting at 8 to 12 weeks of age. After two successive positive Diastix tests, overt diabetes is confirmed by blood glucose levels higher than 17 mmol/l. The age of diabetes onset is set at the first detection of elevated urine glucose levels. The mice were sacrificed within 1 week of detection of high blood glucose or when they reached more than 28 weeks of age. At culling, tail DNA was collected to verify the genotype of the mouse. The serum was collected and the pancreas was conserved in formalin for at least 48 h at room temperature before being sent for paraffin inclusion.

Pathway analysis

Genes lists (and MGI ID) from *Idd2* (chromosome 9:29.6–50.3 Mb) and *Idd13* (chromosome 2:114.0–156.1 Mb) were retrieved by the Genes and Markers Query search tool from MGI (Eppig et al. 2015). MGI ID were submitted to DAVID bioinformatics database (Huang et al. 2009a, b). To rescue some unmapped genes (via MGI ID) that did not match with the DAVID database, we sent two lists of unmapped genes to DAVID to get their DAVID ID. MGI and DAVID ID lists were submitted to DAVID and were merged for each locus. *Mus musculus* genome was specified as background. A third list

was built combining all genes from *Idd2* and *Idd13* (*Idd2/13*) loci. All olfactory genes (beginning with “Olf”) were removed from gene lists as they are expected to have little impact on immunological processes. Olfactory genes represent 21% of genes from *Idd2* locus. For these three gene lists (*Idd2* only, *Idd13* only, *Idd2* and *Idd13* combined), all categories from “disease,” “functional categories,” and “pathways” were selected as well as the subcategories containing “all” from the “gene ontology” category. Functional annotation clustering was performed with default options except for three options: “similarity threshold,” “final group membership,” and “EASE.” They were set to 0.4, 0.6, and 0.05, respectively. Each cluster made by each analysis was named based on the biological processes present in that cluster and compared to the other two analysis results. Highly similar clusters, in the same and/or in different analysis, were grouped under the same biological process. Genes from each biological process produced with the *Idd2/13* genes list were compiled separately and identified as located on chromosome 2 (*Idd13*) or 9 (*Idd2*). DAVID revealed a total of 9 pathways for *Idd2*, 5 for *Idd13*, and 15 for the combined list of *Idd2/13*. One biological process (transferase) present in *Idd2/13* contained only genes from *Idd13* and was excluded from further analysis. The metabolic process was too broad as it comprised almost all of the genes from both loci and this pathway was also discarded for STRING analysis.

STRING analysis

Gene (protein) lists of 13 of the 15 identified biological processes for *Idd2/13* were submitted to STRING analysis individually (Szklarczyk et al. 2015). All associations made by STRING between the input list and their database were manually validated. Only “co-expression,” “experiments,” and “databases” categories were selected for the active prediction methods. Confidence score was set to 0.15 to retrieve text file results and was set to 0.7 to retrieve pathway interactions images. Only links between genes from *Idd2* and *Idd13* loci were selected for further analysis. At least 50% of all links (between genes from the two loci) had to have a confidence score of at least 0.7 to be selected as a final biological process of interest (Table 5). Two different biological processes (sodium transport and peptides) did not show any interaction between genes from *Idd2* and *Idd13* and were excluded from further investigations.

Western blots

Dry pellets of homogenized spleen from B10.BR, NOD.*H2^k*, NOD.*H2^k-Idd2*, NOD.*H2^k-Idd13*, and NOD.*H2^k-Idd2/13* were resuspended in NuPAGE® LDS Sample Buffer (106 mM Tris-HCl, 141 mM Tris Base, 2% lithium dodecyl sulfate, 10% Glycerol, 0.51 mM EDTA, 0.22 mM SERVA

Blue G250, 0.175 mM Phenol Red) and sonicated at 30% intensity for 10 s three times. Protein concentrations were acquired by NanoDrop Microvolume Spectrophotometer. The proteins were loaded on 12% NuPAGE® gels at 200 V. Migrated proteins were transferred to PVDF membranes, blocked with 5% milk and 3% BSA in Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature. Separate membranes were incubated overnight at 4 °C with mouse anti- α Tubulin (Abcam, ab7291), rabbit anti-RAD51 (BioAcademia, 70-002), and anti-H2AX (Bethyl, A300-082A) antibodies. Following washes with TBS-T, the membranes were incubated with either anti-rabbit or anti-mouse-Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature. Chemiluminescence was acquired on an Azure c600 (Azure Biosystems). Quantification and normalization of the protein bands were performed on ImageJ.

Statistical analysis

Statistical significance was determined using one-way ANOVA with Bonferroni post-HOC test for differences between more than two groups and a paired or unpaired Student *t* test was used when testing for significant difference between two groups, as appropriate.

Funding information This work was supported by a grant from the Canadian Diabetes Association (OG-3-13-4018) to SL. SL holds a Senior scholarship and RC holds studentship both from Fonds de recherche du Québec-Santé, and VMD holds a studentship from l'Université de Montréal. MK received a doctoral fellowship from the Cole Foundation. AO is the Canada Research Chair (Tier 2) in Genome Stability and Hematological Malignancies. Work in the AO laboratory was supported by a Transition Grant from the Cole Foundation and an internal Operating Fund from the Sir Mortimer B. Davis Foundation of the Jewish General Hospital.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Akkaraju S, Ho WY, Leong D, Canaan K, Davis MM, Goodnow CC (1997) A range of CD4 T cell tolerance: partial inactivation to organ-specific antigen allows nondestructive thyroiditis or insulinitis. *Immunity* 7:255–271

Anderson MS, Bluestone JA (2005) THE NOD MOUSE: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23:447–485

Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395–1401

Berti M, Vindigni A (2016) Replication stress: getting back on track. *Nat Struct Mol Biol* 23:103–109

Bluestone JA, Auchincloss H, Nepom GT, Rotrosen D, St Clair EW, Turka LA (2010a) The immune tolerance network at 10 years: tolerance research at the bedside. *Nat Rev Immunol* 10:797–803

Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G (2010b) Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464:1293–1300

Boutros R, Lobjois V, Ducommun B (2007) CDC25B involvement in the centrosome duplication cycle and in microtubule nucleation. *Cancer Res* 67:11557–11564

Bugler B, Schmitt E, Aressy B, Ducommun B (2010) Unscheduled expression of CDC25B in S-phase leads to replicative stress and DNA damage. *Mol Cancer* 9:29

Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L (2003) Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc* 35:2479–2480

Collin R, Dugas V, Pelletier AN, Chabot-Roy G, Lesage S (2014) The mouse *idd2* locus is linked to the proportion of immunoregulatory double-negative T cells, a trait associated with autoimmune diabetes resistance. *J Immunol* 193:3503–3512

Concannon P, Rich SS, Nepom GT (2009) Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360:1646–1654

Driver JP, Serreze DV, Chen YG (2011) Mouse models for the study of autoimmune type 1 diabetes: a NOD to similarities and differences to human disease. *Semin Immunopathol* 33:67–87

Dugas V, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Hillhouse EE, Lesage S (2010) Implication of the CD47 pathway in autoimmune diabetes. *J Autoimmun* 35:23–32

Dugas V, Chabot-Roy G, Beauchamp C, Guimont-Desrochers F, Hillhouse EE, Liston A, Lesage S (2013) Unusual selection and peripheral homeostasis for immunoregulatory CD4⁽⁻⁾ CD8⁽⁻⁾ T cells. *Immunology* 139:129–139

Dugas V, Liston A, Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Pelletier AN, Beauchamp C, Hardy K, Lesage S (2014) *Idd13* is involved in determining immunoregulatory DN T-cell number in NOD mice. *Genes Immun* 15:82–87

Duncan B, Nazarov-Stoica C, Surls J, Kehl M, Bona C, Casares S, Brumeanu TD (2010) Double negative (CD3⁺ 4⁻ 8⁻) TCR alpha beta splenic cells from young NOD mice provide long-lasting protection against type 1 diabetes. *PLoS One* 5:e11427

Elledge SJ (1996) Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274:1664–1672

Eppig JT, Blake JA, Bult CJ, Kadin JA, Richardson JE (2015) The Mouse Genome Database (MGD): facilitating mouse as a model for human biology and disease. *Nucleic Acids Res* 43:D726–D736

Ford MS, Chen W, Wong S, Li C, Vanama R, Elford AR, Asa SL, Ohashi PS, Zhang L (2007) Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol* 37:2234–2241

Garner-Hamrick PA, Fisher C (1998) Antisense phosphorothioate oligonucleotides specifically down-regulate *cdc25B* causing S-phase delay and persistent antiproliferative effects. *Int J Cancer* 76:720–728

Genin A, Desir J, Lambert N, Biervliet M, Van Der Aa N, Pierquin G, Killian A, Tosi M, Urbina M, Lefort A, Libert F, Pirson I, Abramowicz M (2012) Kinetochores KMN network gene *CASC5* mutated in primary microcephaly. *Hum Mol Genet* 21:5306–5317

Ghosh S, Palmer SM, Rodrigues NR, Cordell HJ, Heame CM, Cornall RJ, Prins JB, McShane P, Lathrop GM, Peterson LB, Wicker LS, Todd JA (1993) Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nat Genet* 4:404–409

He KM, Ma Y, Wang S, Min WP, Zhong R, Jevnikar A, Zhang ZX (2007) Donor double-negative Treg promote allogeneic mixed chimerism and tolerance. *Eur J Immunol* 37:3455–3466

Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S (2010) Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4⁻CD8⁻ T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 88:771–780

- Hillhouse EE, Collin R, Chabot-Roy G, Guyon MJ, Tessier N, Boulay M, Liscourt P, Lesage S (2013) Nearby construction impedes the progression to overt autoimmune diabetes in NOD mice. *J Diabetes Res* 2013:620313
- Hillhouse EE, Liston A, Collin R, Desautels E, Goodnow CC, Lesage S (2016) TCR transgenic mice reveal the impact of type 1 diabetes loci on early and late disease checkpoints. *Immunol Cell Biol* 94:709–713
- Ho WY, Cooke MP, Goodnow CC, Davis MM (1994) Resting and anergic B cells are defective in CD28-dependent costimulation of naive CD4+ T cells. *J Exp Med* 179:1539–1549
- Huang d W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37:1–13
- Huang d W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57
- Kramer A, Mailand N, Lukas C, Syljuasen RG, Wilkinson CJ, Nigg EA, Bartek J, Lukas J (2004) Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat Cell Biol* 6:884–891
- Lam MH, Liu Q, Elledge SJ, Rosen JM (2004) Chk1 is haploinsufficient for multiple functions critical to tumor suppression. *Cancer Cell* 6:45–59
- Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, Mertens D, Ansorge W, Hoffmann I (1998) The cdc25B phosphatase is essential for the G2/M phase transition in human cells. *J Cell Sci* 111(Pt 16):2445–2453
- Lang J, Bellgrau D (2004) Animal models of type 1 diabetes: genetics and immunological function. *Adv Exp Med Biol* 552:91–116
- Lesage S, Hartley SB, Akkaraju S, Wilson J, Townsend M, Goodnow CC (2002) Failure to censor forbidden clones of CD4 T cells in autoimmune diabetes. *J Exp Med* 196:1175–1188
- Liston A, Hardy K, Pittelkow Y, Wilson SR, Makaroff LE, Fahrer AM, Goodnow CC (2007) Impairment of organ-specific T cell negative selection by diabetes susceptibility genes: genomic analysis by mRNA profiling. *Genome Biol* 8:R12
- Liston A, Lesage S, Gray DHD, O'apostrophe; Reilly LA, Strasser a, Fahrer AM, Boyd RL, Wilson J, Baxter AG, Gallo EM. (2004) Generalized resistance to thymic deletion in the NOD MouseA polygenic trait characterized by defective induction of Bim. *Immunity* 21:817–830
- Lutzmann M, Grey C, Traver S, Ganier O, Maya-Mendoza A, Ranisavljevic N, Bernex F, Nishiyama A, Montel N, Gavois E, Forichon L, de Massy B, Mechali M (2012) MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell* 47:523–534
- Lyons PA, Hancock WW, Denny P, Lord CJ, Hill NJ, Armitage N, Siegmund T, Todd JA, Phillips MS, Hess JF, Chen SL, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS (2000) The NOD Idd9 genetic interval influences the pathogenicity of insulinitis and contains molecular variants of Cd30, Tnfr2, and Cd137. *Immunity* 13:107–115
- Ma Y, He KM, Garcia B, Min W, Jevnikar A, Zhang ZX (2008) Adoptive transfer of double negative T regulatory cells induces B-cell death in vivo and alters rejection pattern of rat-to-mouse heart transplantation. *Xenotransplantation* 15:56–63
- Maiorano D, Cuvier O, Danis E, Mechali M (2005) MCM8 is an MCM2-7-related protein that functions as a DNA helicase during replication elongation and not initiation. *Cell* 120:315–328
- McAler MA, Reifsnnyder P, Palmer SM, Prochazka M, Love JM, Copeman JB, Powell EE, Rodrigues NR, Prins JB, Serreze DV et al (1995) Crosses of NOD mice with the related NON strain. A polygenic model for IDDM. *Diabetes* 44:1186–1195
- McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, Jin T, Sobecks R, Bolwell B, Maciejewski JP (2008) Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 141:170–178
- Park J, Long DT, Lee KY, Abbas T, Shibata E, Negishi M, Luo Y, Schimenti JC, Gambus A, Walter JC, Dutta A (2013) The MCM8-MCM9 complex promotes RAD51 recruitment at DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol Cell Biol* 33:1632–1644
- Patil M, Pabla N, Dong Z (2013) Checkpoint kinase 1 in DNA damage response and cell cycle regulation. *Cell Mol Life Sci* 70(21):4009–4021
- Pearce RB, Formby B, Healy K, Peterson CM (1995) Association of an androgen-responsive T cell phenotype with murine diabetes and Idd2. *Autoimmunity* 20:247–258
- Pelletier AN, Lesage S (2013) The Idd13 congenic interval defines the number of merocytic dendritic cells, a novel trait associated with autoimmune diabetes susceptibility. *J Autoimmun* 43:70–77
- Petermann E, Woodcock M, Helleday T (2010) Chk1 promotes replication fork progression by controlling replication initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:16090–16095
- Peterson DA, DiPaolo RJ, Kanagawa O, Unanue ER (1999) Quantitative analysis of the T cell repertoire that escapes negative selection. *Immunity* 11:453–462
- Prochazka M, Leiter EH, Serreze DV, Coleman DL (1987) Three recessive loci required for insulin-dependent diabetes in nonobese diabetic mice. *Science* 237:286–289
- Ratiu JJ, Racine JJ, Hasham MG, Wang Q, Branca JA, Chapman HD, Zhu J, Donghia N, Philip V, Schott WH, Wasserfall C, Atkinson MA, Mills KD, Leeth CM, Serreze DV (2017) Genetic and small molecule disruption of the AID/RAD51 axis similarly protects nonobese diabetic mice from type 1 diabetes through expansion of regulatory B lymphocytes. *J Immunol* 198:4255–4267
- Serreze DV, Bridgett M, Chapman HD, Chen E, Richard SD, Leiter EH (1998) Subcongenic analysis of the Idd13 locus in NOD/Lt mice: evidence for several susceptibility genes including a possible diabetogenic role for beta 2-microglobulin. *J Immunol* 160:1472–1478
- Serreze DV, Prochazka M, Reifsnnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH (1994) Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 180:1553–1558
- Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J, Syljuasen RG, Lundin C, Bartek J, Helleday T (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 7:195–201
- Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP, Kuhn M, Bork P, Jensen LJ, von Mering C (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43:D447–D452
- Taylor SS, McKeon F (1997) Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89:727–735
- Vallee RB, Varma D, Dujardin DL (2006) ZW10 function in mitotic checkpoint control, dynein targeting and membrane trafficking: is dynein the unifying theme? *Cell Cycle* 5:2447–2451
- Varma D, Dujardin DL, Stehman SA, Vallee RB (2006) Role of the kinetochore/cell cycle checkpoint protein ZW10 in interphase cytoplasmic dynein function. *J Cell Biol* 172:655–662
- Wallet MA, Flores RR, Wang Y, Yi Z, Kroger CJ, Mathews CE, Earp HS, Matsushima G, Wang B, Tisch R (2009) MerTK regulates thymic selection of autoreactive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4810–4815
- Wicker LS, Clark J, Fraser HI, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Healy B, Howlett S, Hunter K, Rainbow D, Rosa RL, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB (2005) Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice. *J Autoimmun* 25(Suppl):29–33
- Wicker LS, Todd JA, Peterson LB (1995) Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13:179–200

- Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ, Zhang L (2003) Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol* 171:134–141
- Young KJ, Yang L, Phillips MJ, Zhang L (2002) Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood* 100:3408–3414
- Zhang D, Zhang W, Ng TW, Wang Y, Liu Q, Gorantla V, Lakkis F, Zheng XX (2011) Adoptive cell therapy using antigen-specific CD4⁺CD8⁻ T regulatory cells to prevent autoimmune diabetes and promote islet allograft survival in NOD mice. *Diabetologia* 54:2082–2092
- Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, He KM, Garcia B, Madrenas J, Zhong R (2006) Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, fas-fas ligand-independent pathway. *J Immunol* 177:6920–6929
- Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L (2000) Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 6:782–789
- Zucchelli S, Holler P, Yamagata T, Roy M, Benoist C, Mathis D (2005) Defective central tolerance induction in NOD mice: genomics and genetics. *Immunity* 22:385–396