

Université de Montréal

Étude génétique et fonctionnelle des
Interferon-producing Killer Dendritic Cells

par

Fanny Guimont-Desrochers

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor, Ph.D.
en microbiologie et immunologie

Décembre 2012

© Fanny Guimont-Desrochers, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse est intitulée :

Étude génétique et fonctionnelle des *Interferon-producing Killer Dendritic Cells*

Présentée par :
Fanny Guimont-Desrochers

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr John Stagg, président-rapporteur
Dre Sylvie Lesage, directeur de recherche
Dr Martin Guimond, membre du jury
Dre Silvia Vidal, examinateur externe
Dr Denis Claude Roy, représentant du doyen de la FES

RÉSUMÉ

L'idée qu'une cellule puisse effectuer la cytolysse de cellules transformées, comme une cellule *Natural Killer* (NK), tout en ayant la capacité de présenter des antigènes, comme une cellule dendritique (DC), peut sembler fantaisiste. Cependant, de telles cellules furent bel et bien identifiées chez la souris en 2006. Ces cellules, nommées *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* (IKDC), furent l'objet d'une caractérisation extensive qui révéla leur énorme potentiel immunologique. La combinaison de fonctions associées à des cellules NK et à des DC a doté les IKDC d'un pouvoir antitumoral remarquable. D'ailleurs, il a été démontré que les IKDC sont plus efficaces que les cellules NK pour limiter la croissance tumorale. Ainsi, suite à leur découverte, les IKDC ont suscité beaucoup d'intérêt.

Cependant, une controverse émergea sur la nature des IKDC. Plusieurs groupes indépendants tentèrent de reproduire les expériences attestant les fonctions de DC des IKDC, sans y parvenir. De plus, des études additionnelles révélèrent que les IKDC possèdent des similitudes très importantes avec les cellules NK. Ces observations ont mené la communauté scientifique à suggérer que les IKDC sont des cellules NK en état d'activation (aNK).

Malgré cette controverse, les caractéristiques antitumorales des IKDC sont si uniques et considérables qu'il est primordial de poursuivre l'étude de ces cellules. Pour y arriver, il est essentiel de déterminer la nature des IKDC et de mettre fin à ce débat. Par la suite, il sera important d'identifier des façons de cibler spécifiquement les IKDC pour permettre leur usage dans le cadre de thérapies antitumorales. Ainsi, l'objectif de cette thèse est de définir l'identité des IKDC, puis de déterminer les facteurs génétiques responsables de la régulation de ces cellules.

Nous avons démontré que les IKDC ne sont pas des cellules aNK, contrairement à ce qui avait été suggéré. Nous avons constaté que les IKDC prolifèrent activement et possèdent un phénotype unique, des caractéristiques associées à des cellules NK très immatures. Afin de déterminer si les IKDC peuvent acquérir un phénotype mature, nous avons effectué des expériences de transfert adoptif. Suite à leur injection *in vivo*, les IKDC acquièrent un phénotype de cellules matures, mais étonnamment, elles se différencient aussi en cellules NK.

Ainsi, nous avons révélé que les IKDC sont un intermédiaire dans la différenciation des cellules NK. En parallèle, nous avons démontré que la proportion d'IKDC varie grandement entre des souris de fond génétique différent, indiquant que des facteurs génétiques sont impliqués dans la régulation de ces cellules. Nous avons alors effectué une analyse génétique qui a révélé que les IKDC sont régulées par des facteurs génétiques compris dans une région distale du chromosome 7. Les résultats présentés dans cette thèse constituent une avancée importante pour la recherche sur les IKDC. Ils ont permis de définir la nature des IKDC et d'identifier un intervalle génétique impliqué dans la régulation de ces cellules. Ces découvertes sont des connaissances précieuses pour l'identification des IKDC chez l'Homme et la création de nouvelles thérapies dans la lutte contre le cancer.

Mots-clés : *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* (IKDC), *Cellules Natural Killer* (NK), Cellules dendritiques (DC), Immunogénétique

ABSTRACT

The idea that a cell could kill transformed cells, like a *Natural Killer* (NK) cell, all the while exhibiting also the capacity to present antigens to T cells, like a *Dendritic Cell* (DC), may seem farfetched. However, in mice, a cell presenting these specific properties was identified in 2006. These cells were named *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* (IKDC) and extensive studies revealed that they were endowed with an important immunological potential. Indeed, the fact that IKDCs exhibit properties of both DC and NK cells conferred them with an exceptional anti-tumor potential. Notably, on a per cell basis, the *in vivo* anti-tumor activity of IKDCs is more efficient than NK cells. Therefore, following their identification, IKDCs showed great therapeutic promise.

However, a debate on the cell lineage origin of IKDCs emerged. Several independent groups could not replicate the finding that IKDCs showed functional antigen-presentation properties similar to DCs. Also, additional studies revealed that IKDCs are very similar to NK cells. These and other observations led the scientific community to believe that IKDCs were activated NK cells.

Despite this controversy, IKDCs clearly exhibit a unique and outstanding anti-tumor potential, highlighting the relevance to further explore these cells. We must first close the debate regarding the lineage origin of IKDCs. We subsequently need to identify a means to specifically target IKDCs to facilitate their use in novel anti-tumor therapies. Thus, the objective of my thesis is first, to define the identity of IKDCs and second, to determine the genetic factors implicated in the regulation of these cells.

For the first objective, we demonstrated that IKDCs do not represent activated NK cells, as previously suggested. We show that IKDCs are highly proliferative and exhibit a unique phenotype associated with very immature NK cells. In an attempt to verify if IKDCs could acquire a mature phenotype, we conducted an adoptive transfer experiment. We found that, after adoptive transfer, IKDCs adopt a mature phenotype, but also surprisingly differentiate into NK cells. These findings indicate that IKDCs represent an intermediate in NK-cell differentiation. For the second objective, we demonstrated that the IKDC proportion

was highly variable between strains of different background origins, indicating that these cells are regulated by genetic factors. A genetic study revealed that genetic factors in distal arm of chromosome 7 associate with the proportion of IKDCs. The results presented in this thesis represent an important breakthrough for the research on IKDCs. They allowed to define the cell lineage origin of IKDCs and to identify a genetic region involved in the regulation of this cell type. These discoveries are valuable knowledge for the identification of human IKDCs and the development of novel anti-tumor therapies.

Keywords : Interferon-producing Killer Dendritic Cells (IKDC), Natural Killer (NK) cells, Dendritic cells (DC), Immunogenetics

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRE	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
REMERCIEMENTS	xv
CHAPITRE 1	
Introduction	1
1.1 Mise en contexte	1
1.2 Les cellules <i>Natural Killer</i> (NK)	2
1.2.1 Le rôle des cellules NK.....	2
1.2.2 La différenciation des cellules NK	6
1.2.3 Les sous-types de cellules NK	8
1.2.4 Les fonctions des cellules NK	11
1.2.4.1 La production de cytokines	12
1.2.4.2 L'activité cytotoxique des cellules NK	13
1.3 Les cellules dendritiques (DC).....	19
1.3.1 Le rôle des DC	19
1.3.2 La différenciation des DC.....	20
1.3.3 Les sous-types de DC	23
1.3.4 Les fonctions des sous-types de DC	25

1.3.4.1 La présentation antigénique et la production de cytokines.....	25
1.4 Les <i>Interferon-producing Killer Dendritic Cells</i> (IKDC)	29
1.4.1 Les cellules hybrides de cellules NK et de DC.....	29
1.4.2 L'identification des IKDC	30
1.4.3 Le rôle des IKDC	30
1.4.4 La différenciation des cellules IKDC	31
1.4.5 La fonction des IKDC.....	33
1.4.5.1 La production de cytokines	33
1.4.5.2 L'activité cytotoxique.....	34
1.4.5.3 La présentation antigénique.....	36
1.4.6 La controverse sur l'identité des IKDC	38
1.5 Les études génétiques	40
1.5.1 Généralités	40
1.5.2 Étude de liaison : Marche à suivre.....	40
1.5.2.1 Le choix des lignées de souris parentales.....	43
1.5.2.2 La création de souris congéniques.....	44
1.5.2.2.1 Exemple de souris congénique : la souris NOD.Lc7	45
1.5.2.3 Identification du gène	46
Raisonnement, hypothèse et objectifs	47

CHAPITRE 2

Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK cell differentiation	48
2.1 Présentation de l'article et contribution personnelle.....	48
2.2 Abstract.....	50
2.3 Introduction.....	51
2.4 Materials and methods	54
2.5 Results.....	57
2.6 Discussion.....	62

2.7 Acknowledgments.....	67
2.8 References.....	68
2.9 Figures.....	71

CHAPITRE 3

Genetic characterization of interferon-producing killer dendritic cells.....	86
3.1 Présentation de l'article et contribution personnelle.....	86
3.2 Abstract.....	88
3.3 Introduction.....	89
3.4 Materials and methods.....	91
3.5 Results.....	92
3.6 Discussion.....	95
3.7 Acknowledgments.....	97
3.8 References.....	98
3.9 Figures.....	101

CHAPITRE 4

Discussion.....	106
4.1 Les IKDC : Que sont-ils?.....	106
4.1.1 Des cellules NK activées.....	109
4.1.2 Un sous-type de cellules NK.....	112
4.2 Les IKDC : Quels facteurs génétiques les régulent?.....	118
4.3 Modèle.....	130
4.4 Conclusion.....	131

BIBLIOGRAPHIE..... 133

ANNEXES xvii

Annexe 1 : L'injection d'IKDC chez des souris NOD-*scid* *IL2rg*^{-/-}
génère plus de cellules NK dans la rate, après 6 jours

<i>in vivo</i> , que l'injection de cellules NK	xvii
Annexe 2 : La proportion d'IKDC est réduite chez les modèles murins prédisposés au développement de tumeurs	xviii
Annexe 3 : Effet de l'haploïtype des SNPs du chromosome 7 et 19 sur la proportion d'IKDC chez les souris F2	xix
Annexe 4 : La proportion d'IKDC est réduite dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes de la souris NOD.Rag1-/-	xx
Annexe 5 : La survie des IKDC n'est pas affectée chez les IKDC de souris NOD	xxi
Annexe 6 : Représentation schématique du chromosome 7 pour différentes lignées de souris	xxii
Annexe 7 : La proportion d'IKDC est élevée chez la souris NOD.Lc7 et la souris NOR/Lt	xxiii
Annexe 8 : Identification de deux gènes candidats, <i>ITGAD</i> et <i>COX6A2</i> , pour la régulation de la proportion d'IKDC	xxiv

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les facteurs de transcription importants pour la différenciation ou l'homéostasie des DC

Tableau 2 : Les caractéristiques des IKDC associées aux cDC, aux pDC et aux cellules NK.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des intermédiaires connus de la différenciation des cellules NK.

Figure 2 : Les facteurs de transcription essentiels à la différenciation des cellules NK.

Figure 3 : Les 4 stades de maturation fonctionnelle des cellules NK.

Figure 4 : La régulation dynamique de la fonction effectrice des cellules NK

Figure 5 : Les récepteurs de cellules NK.

Figure 6 : La signalisation par le FasL et le récepteur TRAIL mène à la mort cellulaire.

Figure 7 : Schéma simplifié des étapes de différenciation des DC

Figure 8 : La présentation traditionnelle et la trans-présentation de l'IL-15

Figure 9 : Schéma explicatif d'une étude de liaison

Figure 10 : Méthode de création de souris congéniques.

Figure 11 : Schéma représentant la différenciation des cellules NK et des IKDC.

Figure 12 : Schéma représentant les QTLs associés au cancer dans la région Lc7 et dans les régions orthologues à la région Lc7 chez humain.

Figure 13 : Représentation du profil génétique de la souris NOR/Lt.

Figure 14 : Stratégie de croisement proposée pour évaluer si la mitochondrie fait une empreinte génomique sur le COX6A2.

Figure 15 : Modèle représentant la différenciation des cellules NK. Les lignes hachurées et les points d'interrogation représentent des éléments à confirmer. Les facteurs de

transcription, en mauve, et les gènes, en rouge, importants pour certaines étapes clés de la différenciation des cellules NK sont indiqués.

LA LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADCC : Cytotoxicité dépendante des anticorps
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- aNK : Cellules NK activées
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : Acide ribonucléique messenger
- Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*
- BrdU : Bromodéoxyuridine
- CD : Cluster of differentiation
- cDC : Cellules dendritiques classiques
- CDP : *Common-DC Progenitor*
- CLP : *Common Lymphoid Progenitor*
- CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
- CMP : *Common Myeloid Progenitor*
- COX : C Oxidase
- COX6A2 : *Cytochrome c Oxidase Subunit VIa Polypeptide 2*
- CPA : Cellule présentatrice d'antigène
- CpG ODN : *CpG-oligodeoxynucleotides*
- DC : Cellules dendritiques
- EAE : *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*
- ELP : *Early Lymphoid Progenitor*
- ENU : *Ethyl nitrosourea*
- FasL : *Apoptosis stimulating fragment Ligand*
- Flt3L : *FMS-like tyrosine kinase 3 receptor*
- GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HSC : Cellules souches hématopoïétiques
ICOS-L : *Inducible Costimulator Ligand*
ICSBP : *Interferon (IFN) Consensus Sequence-Binding Protein*
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase
IFN- α : Interféron alpha
IFN- $\alpha\beta$: Interférons de type 1
IFN- γ : Interféron gamma
IKDC : *Interferon-producing Killer Dendritic Cells*
IL : Interleukine
iNK : Cellules NK immatures
ITAMs : *Immunoreceptor Tyrosine- based Activating Motifs*
ITIMs : *Immunoreceptor Tyrosine- based Inhibition Motifs*
ITSM : *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*
Lck : *Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase*
LCMV : Virus de la chorioméningite lymphocytaire
LFA-1 : *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*
LOD : *Logarithm of Odds*
LPS : Lipopolysaccharide
LSK : fraction Sca1⁺c-kit^{high}
LSP : L-Selectin+ Progenitors
MCMV : cytomégalovirus murin
M-CSF : *Macrophage Colony-Stimulating Factor*
MDP : *Macrophage-DC Progenitor*
mNK : Cellules NK matures
MOG : glycoprotéine de myéline d'oligodendrocyte
MPP : *MultiPotent Progenitor*
NK : Cellule *Natural killer*

NKP : *Natural Killer Progenitor*

NKT : *Cellule T Natural killer*

NOD : *Non-Obese Diabetic*

NOR : *Nonobese-resistant*

OT-II : *TCR reconnaissant le complexe OVA-CMH-II*

OVA : *Ovalbumine*

PAMPs : *Pathogen-Associated Molecular Patterns*

PD-1 : *Programmed Death 1*

pDC : *Cellules dendritiques plasmacytoïde*

PD-L1 : *Programmed cell Death 1 Ligand*

poly I:C : *Polyinosinic :polycytidylic acid*

pre-NKP : *pre-Natural Killer Progenitor*

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

QTL : *Quantitative trait locus*

SAP : *SLAM-Associated Protein*

shRNA : *Short hairpin RNA*

SLAM : *Signalling Lymphocytic Activation Molecule*

SNPs : *Single Nucleotide Polymorphisms*

Syk : *Spleen tyrosine kinase*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

Th : *T helper*

TNF : *Tumour Necrosis Factor*

TLR : *Toll-Like Receptor*

TRAIL : *Tumor Necrosis Factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*

Treg : *Lymphocytes T régulateurs*

ZAP-70 : *Zeta-chain-associated protein kinase 70*

LES REMERCIEMENTS

Je veux remercier ma directrice de recherche, Dre Sylvie Lesage, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire pour ce qui ne devait être qu'un stage d'été, mais qui s'est finalement poursuivi en étude de doctorat. Tu m'as initiée à la recherche scientifique et m'as transmis ta passion pour cet univers. Tu m'as offert un projet de recherche passionnant qui m'a poussée à développer mes idées et à faire preuve de créativité. Merci d'avoir été présente et compréhensive durant toutes ces années. Grâce à toi, je suis maintenant une chercheuse accomplie.

Je souhaite remercier tous mes collègues de laboratoire. Vous avez été des compagnons formidables. Vous m'avez encouragée, vous m'avez fait rire, vous m'avez rendu service. Merci à Claudine qui m'a aidée dans mes premiers moments au laboratoire. Tu as été une collègue formidable et tu es maintenant une amie précieuse. Merci à Véronique qui a été d'un soutien inestimable pendant toutes mes années de doctorat. Tu as toujours été d'une grande écoute et tu m'as grandement aidée autant au niveau scientifique que personnel. Un merci particulier à Erin, Geneviève, Adam et Marycruz avec qui j'ai passé des moments formidables. J'espère un jour avoir la chance de retravailler à vos côtés.

Je me dois de remercier les gens qui ont participé de loin ou de près aux travaux présentés dans cette thèse. Merci au personnel animalier, particulièrement Marie-Josée et Fany. Vous avez toujours pris le temps de m'aider ou de me conseiller avec beaucoup de gentillesse. Merci d'avoir veillé sur la santé de mes petites souris avec autant d'attention. Merci à Martine et Nathalie pour tous les tris cellulaires que vous avez effectués et tous les moments où vous êtes venus à mon secours en raison d'un cytomètre problématique. Merci à tous les coauteurs de mes articles. Merci à tous les chercheurs et étudiants du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. J'ai bien aimé vous côtoyer pendant toutes ces années.

Je veux remercier du fond du cœur mon copain Gabriel. Tu m'as encouragée tout au long de mon doctorat et surtout tu m'as permis de m'y consacrer pleinement sans rien demander en retour. Tu me donnes la force de réaliser tous mes rêves et de surmonter tous les obstacles. Tu es une personne exceptionnelle et je suis privilégiée de t'avoir dans ma vie.

Finalement, je désire remercier ma famille et mes amis. Un gros merci à mes parents, Jocelyne et Denis, qui m'ont toujours encouragée à faire ce qui me passionne et à poursuivre mes rêves. Je suis fière d'être votre fille. Merci à Jocelyne et Serge pour la révision minutieuse de ma thèse. Un merci particulier à ma belle-mère, Line, qui a toujours été de bon conseil et qui s'est assurée que je profite aussi de la vie même pendant les moments stressants de mes études. Merci aussi à mes amis. Merci d'avoir été là dans les bons et les moins bons moments de mon doctorat. Votre amitié me fait sentir comme si je n'étais plus enfant unique.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte

Le corps humain est protégé des microbes et des cellules transformées par un système de protection élaboré nommé système immunitaire. Ce système est composé de plusieurs types de cellules qui collaborent entre elles pour tenter d'éliminer les agents indésirables. Parmi elles, les cellules *Natural Killer* (NK) s'avèrent être des combattants redoutables qui détectent les premiers signes d'infections ou de transformation tumorale et éliminent par cytolysse les cellules contaminées. À leur côté, les cellules dendritiques (DC) profitent des particules de cellules contaminées relâchées par la cytolysse pour les apprêter et les présenter aux lymphocytes T afin qu'ils amorcent une réponse immunitaire spécifique. Ensemble, les cellules NK et les DC participent activement à la protection contre les agents infectieux.

En 2006, une cellule qui possède le phénotype et les fonctions des cellules NK et des DC a été identifiée et nommée *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* (IKDC)¹. Le potentiel fonctionnel incroyable procuré par la combinaison des caractéristiques de cellules NK et de DC nous a amenés à nous intéresser aux IKDC. Dans cette introduction de thèse, nous passerons d'abord en revue ce qui est connu sur les cellules NK et les DC. Par la suite, nous décrirons ce qui a été découvert sur les IKDC depuis leur identification. Enfin, nous verrons brièvement les avantages d'effectuer une étude génétique pour caractériser une population cellulaire et nous décrirons la démarche à suivre pour y arriver.

1.2 Les cellules *Natural Killer* (NK)

1.2.1 Le rôle des cellules NK

Les cellules NK ont d'abord été identifiées comme de larges lymphocytes granulaires capables d'éliminer spontanément et sans activation préalable des cellules tumorales en culture². Ces lymphocytes effecteurs, aux caractéristiques différentes des autres lymphocytes, ont par la suite été reconnus comme une lignée cellulaire distincte et ils furent nommés cellules NK³. Les cellules NK ont la lourde tâche de scruter leur entourage à la recherche de cellules stressées ou transformées. Le cas échéant, les cellules NK vont, d'une part, tenter d'éliminer rapidement par cytolyse cette cellule indésirable et, d'autre part, prévenir les autres acteurs du système immunitaire du danger par une relâche rapide et importante de cytokines et chémokines. En vertu de ces fonctions, les cellules NK participent activement à la première ligne de défense du système immunitaire. Ainsi, la contribution des cellules NK est importante dans plusieurs contextes immunologiques, tels qu'au cours d'un cancer, d'infections à des pathogènes, de maladies auto-immunes et durant la grossesse.

Tel que mentionné précédemment, les cellules NK ont d'abord été décrites pour leur capacité à effectuer la cytolyse de cellules tumorales *in vitro*. Par la suite, c'est l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour ne plus avoir de cellules NK ou traitées avec un anticorps éliminant les cellules NK, qui a véritablement permis d'établir que ces cellules sont importantes pour l'élimination des cellules tumorales *in vivo*. En effet, l'injection de cellules tumorales chez des souris déficientes en cellules NK résulte en une croissance incontrôlée des cellules tumorales et le développement de métastases^{4,5}. De manière intéressante, c'est le même scénario chez l'homme. Il y a une augmentation significative de l'incidence de leucémie chez les personnes possédant des cellules NK dysfonctionnelles⁶. Outre un rôle direct des cellules NK dans l'élimination tumorale par leur pouvoir cytotoxique, les cellules NK peuvent aussi stimuler le potentiel fonctionnel d'autres acteurs du système immunitaire. Par exemple, les cytokines relâchées par les cellules NK activent les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques aux antigènes tumoraux, ce qui augmente le pouvoir fonctionnel de ces

lymphocytes T et permet un rejet plus efficace⁷. De plus, les cellules NK ont aussi un rôle dans l'immunosurveillance tumorale. L'immunosurveillance tumorale est un concept encore aujourd'hui controversé qui est basé sur le fait que le système immunitaire reconnaît les cellules précurseurs de tumeur et les élimine avant même que celles-ci se développent en cancer cliniquement apparent^{8,9}. Bien que l'immunosurveillance tumorale ne soit pas un concept accepté de tous^{10,11}, plusieurs observations indiquent que les cellules tumorales utilisent des mécanismes pour échapper à cette surveillance et que ces mécanismes visent les cellules NK¹¹⁻¹³. Un de ces mécanismes d'évasion est l'*immunoediting*, soit la sélection de variants tumoraux d'immunogénicité réduite^{12,14}. En effet, le système immunitaire peut parvenir malgré lui, en tentant d'éliminer les cellules tumorales, à sculpter l'immunogénicité des cellules tumorales et ainsi permettre l'émergence de cellules tumorales d'immunogénicité réduite. Tout récemment, il a été démontré que les cellules NK ont la capacité de faire de l'*immunoediting* de cellules cancéreuses en l'absence d'immunité acquise¹³. Un autre mécanisme utilisé par les cellules tumorales pour échapper à la reconnaissance immunitaire est l'*immunosubversion*, soit la suppression active du système immunitaire¹¹. Entre autres, l'étude de souris déficientes en récepteurs fonctionnels de cellules NK a mis en lumière la capacité des tumeurs à modifier, en présence de cellules NK, l'expression de leurs ligands pour les récepteurs de cellules NK afin d'échapper à la reconnaissance immunitaire^{15,16}. Aussi, les cellules tumorales augmentent la quantité de *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β) actif dans l'environnement tumoral ce qui a pour effet d'inhiber profondément la fonction des cellules NK¹⁷⁻²⁰. Donc, les cellules NK ont le rôle d'identifier et d'éliminer directement les cellules tumorales par cytolyse et indirectement par l'activation de divers acteurs du système immunitaire.

Les cellules NK jouent un rôle fondamental dans le contrôle d'infections par plusieurs types de virus, tels que le virus de l'herpès, de l'influenza ou le virus Coxsackie²¹⁻²³. À titre d'exemple, des souris déficientes en cellules NK sont davantage prédisposées au cytomegalovirus murin (MCMV) alors qu'au contraire, des souris ayant reçu un transfert adoptif de cellules NK deviennent résistantes²⁴⁻²⁶. Aussi, un défaut au niveau de l'activité des cellules NK rend les souris plus sujettes à une infection au MCMV^{27,28}. De manière

intéressante, l'étude de la réponse des cellules NK au MCMV a révélé l'existence de cellules NK mémoires²⁹. Chez la souris C57BL/6, les cellules NK exprimant le récepteur Ly49H peuvent reconnaître la glycoprotéine virale m157 exprimée sur les cellules infectées par le MCMV. Ceci permet aux cellules NK d'identifier les cellules infectées et d'être responsables de la protection contre le MCMV³⁰⁻³³. Spécifiquement, au cours d'une infection au MCMV, il y a expansion clonale des cellules NK Ly49H⁺ pour combattre l'infection, mais il a aussi été observé que ces cellules persistent à long terme *in vivo*^{29,34}. Advenant une seconde exposition au virus MCMV, ces cellules NK Ly49H⁺ persistantes sont capables de répondre à l'agent infectieux de manière beaucoup plus vigoureuse et importante qu'au cours de la première exposition, ce qui confère à ces cellules des caractéristiques de cellules mémoires²⁹. En accord avec ces résultats, il a été démontré que les cellules NK Ly49C-I⁺ préalablement exposées à un haptène sont capables d'induire une réaction d'hypersensibilité de contact lorsqu'elles sont transférées dans une souris exposée au même haptène³⁵. De plus, il a été observé que des cytokines inflammatoires, telles que l'IL-12 et l'IL-18, peuvent induire des cellules NK mémoires *in vitro*³⁶. L'ensemble de ces résultats indique que les cellules NK sont capables d'effectuer des réponses mémoires spécifiques à l'antigène et sont ainsi dotées d'un potentiel fonctionnel et thérapeutique encore plus important que prévu. Donc, les cellules NK sont très importantes pour le contrôle de plusieurs types d'infections virales. La fonction des cellules NK dans l'élimination de microbes autres que les virus est peu connue³⁷. Il semblerait que les cellules NK peuvent être impliquées dans certaines infections bactériennes et parasitaires par une activation indirecte. En effet, la liaison des *Toll-Like Receptor* (TLR) et des *Pattern Recognition Receptor* (PRR) exprimés sur les monocytes et les DC avec leurs ligands sur les bactéries et les parasites engendre une réponse inflammatoire. Cette réponse permet aux cellules NK de s'activer et de produire une grande quantité d'interféron gamma (IFN- γ) qui augmente la phagocytose, par les macrophages, des pathogènes extracellulaires et des cellules infectées^{38,39}.

En plus de participer à l'élimination des infections, les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunorégulation et le contrôle d'immunopathologie. En effet, un traitement avec un anticorps éliminant les cellules NK accélère le développement d'une encéphalite chez

les souris infectées avec le virus de Theiler⁴⁰. Aussi, les cellules NK peuvent faire la cytolyse de macrophages trop activés permettant de diminuer l'intensité de la réponse immune en cours⁴¹. Ainsi, les cellules NK permettent d'éliminer les pathogènes indésirables, tout en étant capables de limiter l'étendue de la réaction immunitaire et potentiellement l'inflammation, pour maintenir l'intégrité des tissus. Puisque les cellules NK répondent rapidement et avec beaucoup d'intensité aux stimuli, que ce soit des pathogènes ou des cytokines, ces cellules ont besoin d'être soigneusement régulées pour ne pas causer de dommages aux tissus sains et mener à de l'auto-immunité. Ainsi, selon les circonstances, les cellules NK peuvent prévenir ou promouvoir le développement de maladies auto-immunes. L'élimination des cellules NK chez un modèle murin de sclérose en plaque, l'*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* (EAE), a conduit à une augmentation de la sévérité de la maladie et à des rechutes^{42,43}. Pour empêcher le développement d'auto-immunité les cellules NK peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T auto-réactifs et elles peuvent produire diverses cytokines *T Helper* de type 2 (Th2), afin de contrebalancer les cytokines pro-inflammatoires Th1⁴⁴⁻⁴⁶. Par contre, tel que mentionné précédemment, les cellules NK peuvent aussi promouvoir le développement d'auto-immunité. Il a été démontré dans un modèle murin de myasthénie de grave, que les cellules NK induisent une réponse Th1 qui facilite la production d'autoanticorps. D'ailleurs, l'élimination des cellules NK durant la phase d'activation de cette maladie permet de prévenir son apparition⁴⁷. Aussi, les cellules NK éliminent les cellules β du pancréas chez un modèle murin de diabète auto-immun induit par un virus⁴⁸. Ces données indiquent que selon le contexte, les cellules NK peuvent empêcher ou faciliter le développement de maladies auto-immunes.

Finalement, les NK possèdent un rôle de tolérance au cours de la grossesse. Les cellules prédominantes au site d'implantation du placenta chez la souris et l'humain sont les cellules NK^{49,50}. Ces cellules NK produisent des facteurs angiogéniques, comme le facteur de croissance endothélial vasculaire, qui participent à l'implantation adéquate du placenta et à la fonction adéquate de celui-ci^{51,52}.

1.2.2 La différenciation des cellules NK

Les premières étapes d'engagement dans la lignée NK et le développement subséquent sont des processus qui ne sont pas encore totalement élucidés. Cependant, les résultats actuels portent à croire que la différenciation des cellules NK se déroule de manière séquentielle, avec plusieurs étapes qui peuvent se chevaucher et qui sont définies par l'acquisition et la perte de certains récepteurs de surface (Figure 1)⁵³. La différenciation débute dans la moelle osseuse avec les cellules souches hématopoïétiques (HSC). Les HSC se différencient en *Multipotent Progenitor* (MPP) qui eux, génèrent les *Common Lymphoid Progenitor* (CLP) et les *Common Myeloid Progenitor* (CMP)^{54,55}. Il a été démontré que la première étape de différenciation spécifique à la lignée NK, c'est-à-dire associée avec la perte d'un potentiel de différenciation en cellules T, en cellules B et en DC, débute avec les *pre-Natural Killer Progenitor* (pre-NKP)⁵⁶. Les pre-NKP sont définies par le phénotype suivant : $\text{Lin}^- \text{c-kit}^- \text{Flk2}^- \text{CD27}^+ \text{CD244}^+ \text{IL-7R}\alpha^+ \text{CD122}^-$ et ont permis de déterminer que l'interleukine (IL)-15 n'est pas nécessaire à l'engagement dans la différenciation spécifique à la lignée NK⁵⁶. Par la suite, les pre-NKP vont se différencier en cellules *Natural Killer Progenitor* (NKP) caractérisées par l'expression de l'IL-2R β (CD122). Le CD122 fait partie du complexe de l'IL-15R et permet, en association avec l'IL-15R α et l'IL-2R γ_c , de répondre à l'IL-15, qui est essentielle pour le développement des cellules NK⁵⁷⁻⁶⁰. Les cellules NK vont conserver l'expression de CD122 tout au long de leur existence puisque la signalisation par l'IL-15 est aussi importante pour l'homéostasie des cellules NK⁵⁸. En effet, les souris déficientes en IL-15 ou en récepteurs à l'IL-15 n'ont pas de cellules NK^{59,61,62}. Les NKP vont ensuite acquérir l'expression du marqueur NK1.1 et du complexe CD94/NKG2 pour devenir des cellules NK immatures (iNK)⁵³. Les cellules NKP et des cellules iNK peuvent être isolées d'autres sites que la moelle osseuse, indiquant que plusieurs sites semblent participer à la différenciation des cellules NK ou que ces cellules ont la capacité de recirculer. C'est au stade immature que les cellules NK amorcent un processus appelé éducation⁶³. Au cours de ce processus, les cellules NK expriment de manière aléatoire et diversifiée des récepteurs spécifiques pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) et testent la liaison pour ces récepteurs. Les cellules iNK ayant eu au moins un de leur récepteur inhibiteur engagé par des molécules du CMH-I dans l'environnement où se produit leur éducation, réussiront à développer l'entière de leur

compétence fonctionnelle et sont appelées cellules NK éduquées⁶⁴. Ces cellules NK sont maintenant aptes à répondre aux stimuli par leurs récepteurs activateurs, tout en étant tolérantes au soi. Cet état est appelé *licensing* ou *disarming model*^{65,66}. Les cellules NK qui expriment des récepteurs du soi n'ayant pas été engagés par des molécules du CMH-I, ne développent pas leurs compétences fonctionnelles, réagissent peu aux signaux activateurs et sont appelées hyporéactives (du terme anglais *hyporesponsive*)⁶⁷. Progressivement, les cellules NK éduquées et les cellules NK hyporéactives vont faire l'acquisition de plusieurs récepteurs de la lignée NK, tels que le marqueur CD49b, et devenir matures (mNK)⁶⁸. Une voie de différenciation alternative des cellules NK a été identifiée dans le thymus^{69,70}. Les cellules NK générées du thymus diffèrent de celles obtenues de la moelle osseuse, car elles dépendent de GATA-3 et de l'IL-7R α (CD127) pour leur homéostasie⁶⁹. De plus, ces cellules NK sont peu cytotoxiques, produisent beaucoup de cytokines et migrent préférentiellement aux ganglions lymphatiques. Bien que la moelle osseuse soit un organe important pour la différenciation des cellules NK, le foie semble aussi y participer. En effet, à l'âge de deux semaines, le foie des souris contient des cellules NK fonctionnellement matures alors que la rate n'en contient que vers l'âge de 8 semaines. Des études sur l'ontogénie des cellules NK ont suggéré que les cellules NK dans le foie se développent indépendamment de la moelle osseuse et de manière RAG indépendante⁷¹.

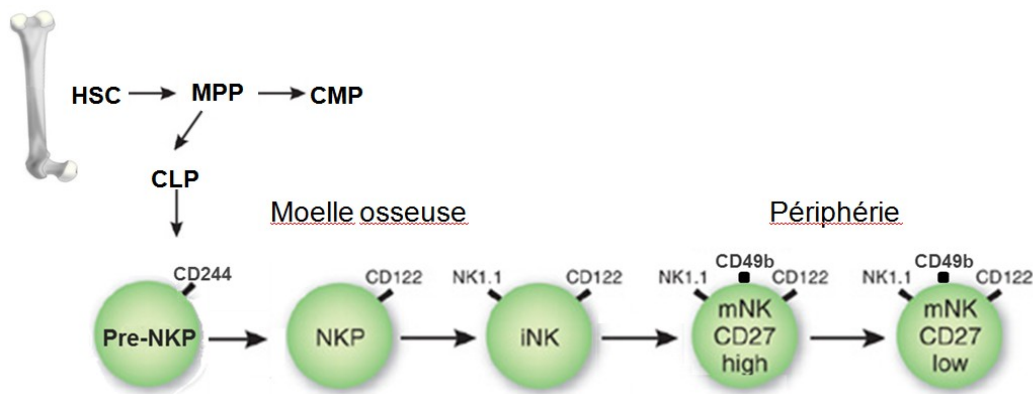


Figure 1 : Représentation des intermédiaires connus de la différenciation des cellules NK. Inspiré de⁷².

Plusieurs facteurs de transcription ont été associés au développement des cellules NK. Entre autres, l'absence d'Ets-1, d'Id2, d'Ikaros et de PU.1 chez les cellules NKP ainsi que la perte de Gata-3, en IRF-2 et en T-bet chez les cellules iNK, résultent en une différenciation incomplète ou aberrante des cellules NK⁷³⁻⁷⁹(Figure 2). Chez les cellules mNK, le MEF, le MITF et le CEBP- γ n'affectent pas le nombre ou le répertoire des récepteurs, mais la fonction⁸⁰⁻⁸². Une altération au niveau des cytokines peut grandement affecter le développement et la survie des cellules NK. Les souris déficientes en chaîne gamma commune (γ c), nécessaire pour la transmission du signal de plusieurs cytokines dont l'IL-2, l'IL-4, l'IL-7, l'IL-9, l'IL-15 et l'IL-21, n'ont pas de cellules NK^{83,84}. L'étude de souris déficientes pour certaines de ces cytokines a révélé que l'IL-15 et l'IL-2 sont parmi les plus importantes pour l'homéostasie des cellules NK^{58,85}.

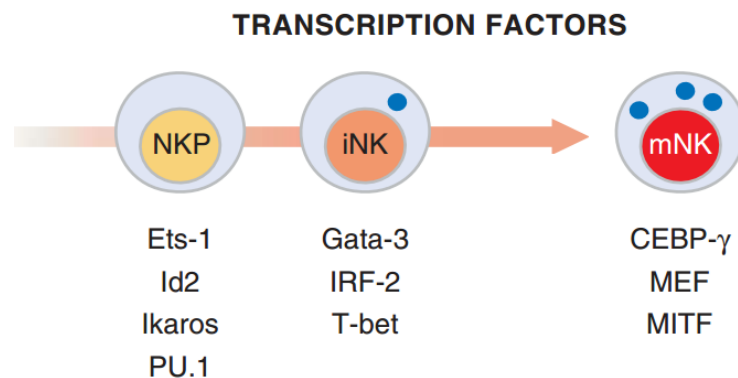


Figure 2 : Les facteurs de transcription essentiels à la différenciation des cellules NK. Tiré de⁸⁶.

1.2.3 Les sous-types de cellules NK

Les cellules NK ont passé à travers différentes étapes de maturation et d'éducation pour finalement devenir des cellules matures. La plupart d'entre elles ont quitté la moelle osseuse pour venir s'établir en périphérie et exercer leur fonction de sentinelle du système immunitaire dans les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, tels que la rate, le foie, les poumons et le sang et, dans une moindre mesure, les ganglions lymphatiques, le thymus et la moelle osseuse⁸⁷. Dans la majorité des tissus, les cellules NK représentent de 2 à 10 % des

lymphocytes totaux⁸⁸. Les cellules mNK sont caractérisées par l'expression concomitante de CD49b, NK1.1, CD122 et l'absence de CD3, un marqueur de cellules T, présent sur les cellules NKT. Il est à noter que le marqueur NK1.1 (Nkrp1c) est polymorphique et ne peut être utilisé pour identifier les cellules NK chez certaines souches de souris, dont celles possédant un fond génétique NOD⁸⁹. Les cellules mNK composent une population très hétérogène qui peut être ségréguée en fonction de leur phénotype, leur fonction ou leur localisation. Une façon courante de classifier les cellules NK est par la maturation fonctionnelle. En effet, bien que les cellules mNK soient matures, elles vont passer par des étapes de maturation de leur fonction, telles qu'observées chez les lymphocytes T et les lymphocytes B. Cette maturation fonctionnelle des cellules NK se déroule en plusieurs étapes associées avec un phénotype spécifique et des fonctions particulières.

La maturation fonctionnelle

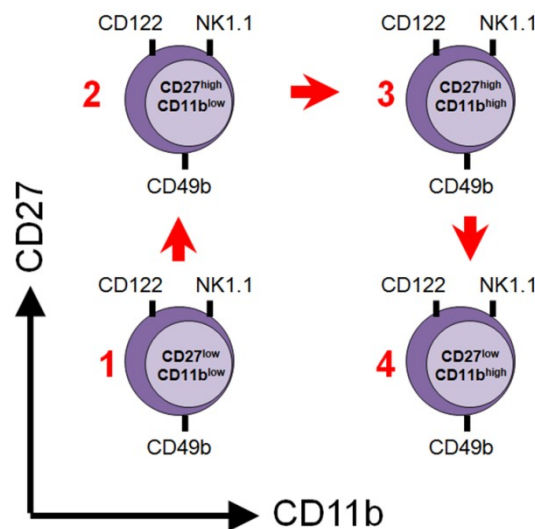


Figure 3 : Les 4 stades de maturation fonctionnelle des cellules NK.

Inspiré de⁹⁰.

La maturation fonctionnelle est définie par l'expression de CD27 et de CD11b et permet d'obtenir quatre stades séquentiels de développement des cellules mNK selon l'ordre suivant : (1)CD11b^{low}CD27^{low} → (2)CD11b^{low}CD27^{high} → (3)CD11b^{high}CD27^{high} →

(4)CD11b^{high}CD27^{low} (Figure 3)⁹⁰. Le premier stade, aussi nommé stade DN, est une étape de maturation fonctionnelle très immature chevauchant probablement les cellules iNK et les mNK. Au cours de ce stade, les cellules NK expriment faiblement CD49b et les récepteurs de la famille des Ly49 et fortement IL-7R (CD127), comme des cellules iNK; cependant, comme des cellules mNK, elles expriment des récepteurs activateurs tels que NKG2D, NK1.1 et NKp46, et des quantités appréciables de granzyme B. De plus, les cellules NK de ce stade possèdent le taux de prolifération le plus rapide des 4 stades, corroborant leur phénotype plus immature et plus près des progéniteurs de NK dans la voie de différenciation⁹⁰. Les cellules NK du deuxième stade sont préférentiellement localisées dans la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Tout comme les cellules NK du premier stade, ces cellules ont un phénotype plutôt immature. Elles ont une faible expression des récepteurs Ly49 et expriment fortement le récepteur de chémokine CXCR3, qui est important pour la migration des cellules NK en réponse à un stimulus inflammatoire⁹¹. Les cellules NK du troisième stade possèdent un seuil d'activation beaucoup plus faible, puisqu'elles répondent plus fortement aux ligands activateurs sur les cellules tumorales et peuvent produire de très grandes quantités de cytokines, telles que de l'IFN- γ et du *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF), lorsqu'elles sont stimulées. Elles sont donc considérées comme les cellules avec le potentiel fonctionnel le plus élevé. Elles sont distribuées de manière homogène dans toutes les niches de cellules mNK. En raison de leur localisation tissulaire et de leur réponse aux cytokines produites par les DC, les cellules de ce stade sont probablement impliquées de manière prédominante dans le *cross-talk* avec les DC⁹². Le quatrième et dernier stade de la maturation fonctionnelle contient des cellules en sénescence répliquative. La majorité des cellules de ce stade expriment fortement les récepteurs inhibiteurs de la famille des Ly49 et le KLRG1, indiquant que ces cellules sont fonctionnellement plus limitées et restreintes⁵³. Il est à noter que le récepteur KLRG1 peut aussi être fortement exprimé ou induit, à la suite d'une stimulation chronique ou de la prolifération⁹³. Les cellules NK du quatrième stade sont majoritairement situées dans le sang, la rate, les poumons et le foie et elles expriment des récepteurs chemo-attractants uniques comme le CX3CR1 ou le S1P₅ qui régulent le recrutement cellulaire au cours de la réponse inflammatoire^{88,94}. Il a été suggéré que les cellules de ce stade jouent le rôle de patrouilleur des tissus non-lymphoïdes. Tout au long des quatre stades de la maturation fonctionnelle, certains marqueurs sont progressivement

acquis/augmentés en expression, tels que le CD43 et les récepteurs Ly49, ou perdus/diminués en expression, tels que l'IL-7R (CD127) et le Ly108, et permettent de suivre de manière plus pointue la maturation fonctionnelle^{53,95,96}. Il est à noter qu'il est aussi possible de diviser les cellules NK en deux populations, soit les cellules NK CD27⁺, fonctionnellement immatures, et les cellules NK CD27⁻, fonctionnellement matures⁹². Cependant, cette méthode de séparation est moins précise. L'utilisation du marqueur CD27 ou de la combinaison des marqueurs CD11b et CD27 permet aussi de détecter des sous-types de cellules NK aux fonctions distinctes chez l'humain^{97,98}. La présence de marqueurs communs chez les cellules NK murines et humaines facilitera le transfert des connaissances de la souris à l'homme.

Il existe aussi des sous-types de cellules NK spécifiques à des environnements particuliers. Par exemple, le foie contient des cellules NK exprimant constitutivement le récepteur de cytotoxicité *Tumor Necrosis Factor* (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) ainsi que de faibles niveaux des marqueurs de maturation de cellules NK, comme les récepteurs Ly49 et le CD11b⁹⁹. De plus, il semblerait que le foie est le site privilégié pour le maintien de cellules NK mémoires caractérisées par l'expression de Thy-1 et CXCR6^{35,100}. Au niveau des muqueuses intestinales, on peut détecter des cellules NK caractérisées par une forte production d'IL-22, l'expression du facteur de transcription ROR γ t, l'absence d'activité cytotoxique et de production d'IFN- γ , et une indépendance à l'IL-15 pour leur développement, contrairement aux NK conventionnels¹⁰¹.

1.2.4 Les fonctions des cellules NK

Bien que les cellules NK soient capables d'exercer une activité fonctionnelle sans activation préalable, l'intensité et la qualité de celle-ci sont largement réduites. En effet, ce n'est qu'à la suite d'une activation des cellules NK que celles-ci exercent leur plein potentiel fonctionnel, soit une activité cytotoxique puissante et une forte production de cytokines⁸⁷. De plus, l'activation a pour effet d'augmenter la taille des cellules NK ainsi que l'expression de plusieurs marqueurs de surfaces, tels que le CD69, le CD44, le FasL, le CD86 et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II)¹⁰²⁻¹⁰⁶. L'activation des cellules NK dépend

des cytokines présentes dans le microenvironnement et des interactions avec les autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T, les DC et les macrophages. L'IL-15 trans-présenté par les DC ou les macrophages, les interférons de type 1 (IFN- $\alpha\beta$), l'IL-12 et l'IL-18 sont des cytokines ayant la capacité d'activer les cellules NK et d'augmenter leur potentiel fonctionnel¹⁰⁷⁻¹¹¹. Une autre cytokine bien connue pour activer les cellules NK est l'IL-2 qui accroît la prolifération, la cytolyse et, dans une certaine mesure, la production de cytokines³. Aussi, le *cross-talk* avec les DC stimule et active les fonctions des cellules NK¹¹². Entre autres, un traitement à l'anti-CD40 induit la production de cytokines Th1 par les CPA (cellules présentatrices d'antigènes), dont font parti les DC, ce qui résulte en une activation indirecte des cellules NK par l'anti-CD40¹¹³. De plus, une activation par le CD40 est associée avec une augmentation de l'expression de IL-15R α par les DC ce qui accroît l'activation des cellules NK via l'IL-15¹¹⁴. Outre les cytokines et l'anti-CD40, les ligands des TLR comme le *Polyinosinic-polycytidylic acid* (poly I:C), un agoniste du TLR3, ou les *CpG-Oligodeoxynucleotides* (CpG ODN), des agonistes du TLR9, ont le pouvoir d'activer les cellules NK^{115,116}. Spécifiquement, le poly I:C active les cellules NK directement via le récepteur de l'IFN α et indirectement en augmentant la trans-présentation de l'IL-15¹¹⁷. Quant à lui, le CpG ODN active les cellules NK de manière similaire à l'anti-CD40, soit en stimulant la production de cytokines Th1 par les DC et les macrophages qui vont par la suite activer les cellules NK^{118,119}. Dans l'ensemble, le pouvoir fonctionnel des cellules NK est grandement influencé par son environnement.

1.2.4.1 Production de cytokines

En accord avec leur rôle de premier répondant, les cellules NK ont la capacité de produire rapidement de grandes quantités de cytokines pour activer la réponse immunitaire. Selon les stimuli présents, elles peuvent entre autres produire de l'IFN- γ , du TNF- α , de l'IL-3, du GM-CSF et du *Granulocyte Colony-Stimulating Factor* (G-CSF)^{27,120,121}. Ces cytokines vont permettre de promouvoir la maturation des DC et d'influencer la polarisation de la réponse Th¹²². Les cellules NK vont aussi produire des cytokines pour diminuer une réponse immunitaire exacerbée. Effectivement, au cours d'une activation trop intense, les cellules NK ont des fonctions immunorégulatrices et peuvent entre autres produire de l'IL-10 pour

diminuer la réponse pathologique¹²³. Certains types de cellules NK sont spécialisés dans la production de cytokines spécifiques à l'environnement où elles se trouvent. En effet, les cellules NK des muqueuses intestinales produisent de l'IL-22 et cette production s'est avérée essentielle pour la protection contre un pathogène intestinal et contre les maladies inflammatoires de l'intestin^{101,124}. Les cellules NK ont aussi la capacité de produire différents types de chémokines qui sont essentielles pour leur colocalisation dans l'environnement inflammatoire avec d'autres acteurs du système immunitaire, comme les DC. Voici quelques exemples de chémokines produites par les cellules NK : MIP-1 α , MIP-1 β , CCL1, RANTES, CCL2 à CCL5, XCL1 et CXCL8^{121,125-127}.

1.2.4.2 L'activité cytotoxique

Les cellules NK inspectent continuellement les cellules qui les entourent pour s'assurer qu'elles sont saines. Pour parvenir à distinguer les cellules saines des cellules transformées, les cellules NK expriment un groupe complexe de récepteurs inhibiteurs et activateurs qui vont lier des ligands différemment exprimés sur les cellules saines et les cellules transformées. C'est l'intégration de tous les signaux reçus par leurs récepteurs inhibiteurs et activateurs pour une cellule cible donnée qui va résulter en un signal de cytolyse ou de tolérance. Ce délicat équilibre entre les signaux inhibiteurs et activateurs permet une régulation dynamique de la fonction des cellules NK (*Dynamic Equilibrium Concept*). Les cellules saines qui expriment des molécules du soi du CMH-I et peu de molécules du soi induites par le stress cellulaire seront épargnées par les cellules NK (Figure 4, A). Par contre, les cellules transformées ayant diminué l'expression des molécules du soi du CMH-I ou augmenté des molécules du soi induites par le stress cellulaire seront cytolysées par les cellules NK (Figure 4, B et C)^{128,129}. La réponse par ces récepteurs est très importante comme le suggère la faculté de certains microorganismes pathogènes intracellulaires à modifier l'expression des ligands pour les récepteurs de cellules NK et échapper à la cytolyse¹³⁰.

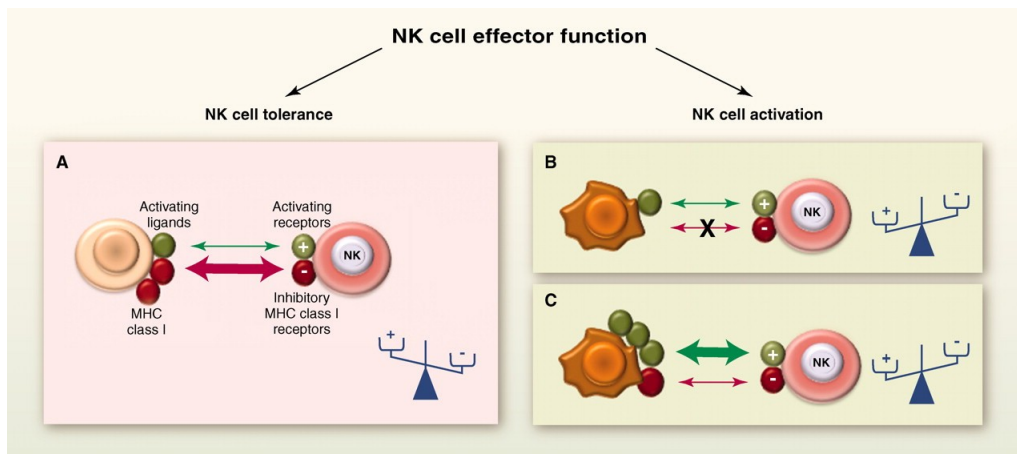


Figure 4 : La régulation dynamique de la fonction effectrice des cellules NK. Tiré de¹²¹.

Les cellules NK expriment au moins un récepteur inhibiteur qui leur a permis de passer à travers le processus d'éducation. Par la suite, les cellules NK utilisent leurs récepteurs inhibiteurs pour évaluer la présence de molécules du soi du CMH-I, qui sont constitutivement exprimées à l'état de base sur les cellules saines, mais perdues lors d'un stress cellulaire. Plusieurs classes de récepteurs inhibiteurs spécifiques pour le CMH-I existent chez la souris, telles que les récepteurs Ly49, le complexe composé de CD94 et NKG2A et autres (Figure 5)¹³¹. L'existence d'une panoplie de récepteurs inhibiteurs différemment exprimés sur les cellules NK participe à la création d'un répertoire de cellules NK diversifié et capable de détecter efficacement la perte d'expression de molécules du soi. Les récepteurs inhibiteurs sont composés d'une portion intracytoplasmique contenant un ou deux motifs *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motifs* (ITIMs)¹³². La liaison des récepteurs inhibiteurs avec leurs ligands du CMH-I recrute à l'intérieur du cytoplasme des cellules NK, les tyrosines phosphatase SHP-1 et SHP-2 au niveau de ces motifs ITIMs et permettent d'envoyer un signal inhibiteur qui a priorité sur les signaux activateurs reçus par les récepteurs activateurs. La façon dont les signaux inhibiteurs interfèrent avec les signaux activateurs n'est pas bien connue, bien que certaines hypothèses aient été suggérées¹³¹. Il existe aussi des récepteurs inhibiteurs qui lient des molécules autres que celles du CMH-I, tels que le récepteur NKR-P1B qui lie Clr-b^{133,134}.

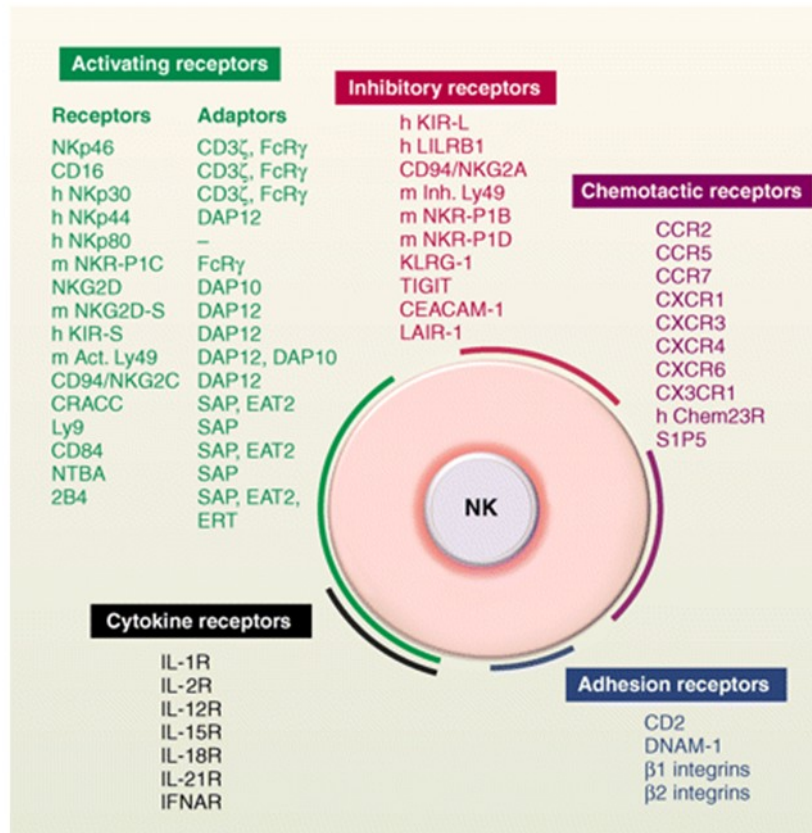


Figure 5 : Les récepteurs de cellules NK. Tiré de¹²¹.

Contrairement aux récepteurs inhibiteurs qui perçoivent la perte de molécules du soi, les récepteurs activateurs détectent des ligands seulement présents sur des cellules transformées ou stressées. Tout comme les récepteurs inhibiteurs, il existe une panoplie de récepteurs activateurs (Figure 5), entre autres, les récepteurs activateurs Ly49, le complexe CD94/NKG2C ainsi que le récepteur NKG2D. Ces récepteurs reconnaissent sur les cellules cibles des molécules du soi induites par le stress cellulaire (ex : RAE1, H60 et MULT1 pour NKG2D), des ligands infectieux n'appartenant pas au soi (ex : m157 encodé par le MCMV et reconnu par Ly49H) et des ligands pour les TLR (ex: VV un membre de la famille des poxvirus liant TLR-2)^{135,136}. Certains récepteurs activateurs transmettent un signal par des motifs *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motifs* (ITAMs), présents sous forme de molécules associées à la partie intra-cytoplasmique du récepteur ainsi que le recrutement de kinases (Syk ou ZAP70). D'autres récepteurs activateurs activent une voie de signalisation par

DAP-12 et des ITAMs ou DAP-10 avec des kinases phosphatidylinositol-3 ou autres. L'ensemble des molécules impliquées dans ces voies de signalisation n'est pas encore totalement élucidé. Il existe un récepteur, le CD244, aussi appelé 2B4, qui peut être inhibiteur ou activateur¹³⁷. La queue cytoplasmique de ce récepteur contient un *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif* (ITSM) qui mène à un signal activateur, s'il recrute la molécule adaptatrice SAP ou à un signal inhibiteur, s'il recrute la molécule adaptatrice ERT¹³⁸. Les avantages d'un récepteur pouvant mener à deux types de signaux ne sont pas bien compris.

Si l'ensemble des signaux émis par les différents récepteurs de la cellule NK résulte en un signal activateur, celle-ci pourra exercer la cytolysse de la cellule cible. Les cellules NK peuvent effectuer la cytolysse par des mécanismes variés et non redondants. Le choix du mécanisme sera influencé par le sous-type et le profil d'expression de récepteurs de la cellule NK¹³⁹. Les cellules NK utilisent dans la plupart des cas la voie de l'exocytose granulaire (perforines/granzymes)¹⁴⁰. Cette voie comprend la perforine qui perce la membrane de la cellule cible pour permettre aux granzymes de rejoindre le cytosol et d'induire la mort cellulaire par le clivage de substrats critiques¹⁴¹. Les cellules NK utilisent aussi des *death-inducing ligands* comme le FasL, le TNF et le récepteur TRAIL pour exercer leur fonction cytolytique. La signalisation par le FasL et le récepteur TRAIL est illustrée dans la Figure 6. Bien que les cellules NK tuent en absence d'anticorps, elles expriment aussi le récepteur de faible affinité CD16, leur permettant de détecter des cellules cibles recouvertes d'anticorps et d'exercer une cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC)¹⁴². L'activité cytotoxique des cellules NK a plusieurs effets sur le cours de la réponse immune. En plus d'éliminer les cellules transformées, celle-ci permet la relâche d'antigènes, ce qui facilite la présentation croisée aux lymphocytes T CD8⁺ et la diminution de la charge antigénique^{143,144}. Les cellules NK sont bien outillées pour contenir les infections et les cellules tumorales avant que les cellules du système immunitaire adaptatif prennent la relève.

Il existe une famille de récepteurs appelés *Signalling Lymphocyte Activation Molecule* (SLAM) capables de réguler la fonction de plusieurs types cellulaires dont les cellules NK. Les cellules NK expriment plusieurs récepteurs SLAM tels que le CD84, le Ly108, le 2B4, le CRACC, le Ly-9 et le CD48, le ligand de 2B4¹⁴⁵. La liaison de ces récepteurs avec leur ligand augmente l'activité fonctionnelle des cellules NK, sauf dans le cas du CD84¹⁴⁵. Cependant, la fonction de ces récepteurs dépend largement de leur capacité à s'associer au niveau de leur domaine cytoplasmique avec des adaptateurs de la famille des *SLAM associated protein* (SAP). Les cellules NK murines expriment les trois adaptateurs connus de la famille des SAP, soit le *Ewing's sarcoma-associated transcrit-2* (EAT-2), le *EAT-2-related transducer* (ERT) et le SAP^{146,147}. En présence d'un adaptateur SAP, les récepteurs de la famille des SLAM exprimés sur la cellule NK envoient des signaux activateurs qui entrent en synergie avec ceux provenant des récepteurs activateurs conventionnels, tels que le NKG2D¹⁴⁸. Les récepteurs SLAM envoient des signaux à la suite de la liaison avec leur ligand, uniquement exprimés sur des cibles cellulaires hématopoïétiques. En l'absence de SAP, les récepteurs de la famille des SLAM s'associent à des effecteurs inhibiteurs, tels que SHIP-1, ce qui résulte en une inhibition de la fonction activatrice des récepteurs activateurs conventionnels engagés¹⁴⁸. En effet, les souris SAP déficientes ont une réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK¹⁴⁹. Étrangement, l'effet des adaptateurs SAP est différent si la cellule NK est en contact avec une cellule cible non-hématopoïétique, donc qui n'exprime pas de ligands pour les récepteurs SLAM. En présence d'une telle cellule cible, les adaptateurs SAP ont un effet inhibiteur sur la réponse de la cellule NK, alors que l'absence d'adaptateurs SAP a un effet activateur^{145,147}. Les mécanismes impliqués dans ce type de réponse ne sont pas encore complètement élucidés. Dans l'ensemble, les récepteurs SLAM jouent le rôle de récepteurs de costimulation puisqu'ils favorisent l'activation déjà initiée par les récepteurs activateurs conventionnels.

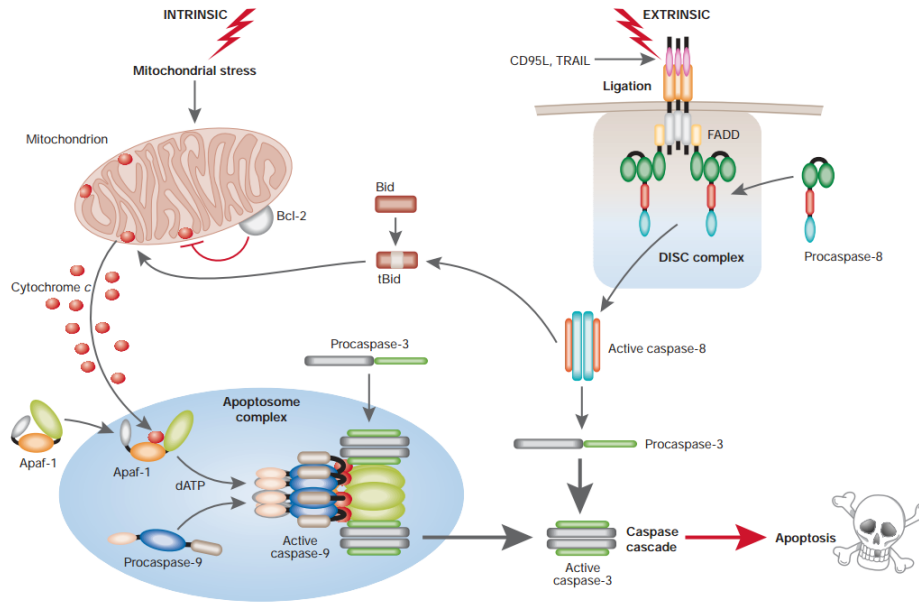


Figure 6 : La signalisation par le FasL (CD95L) et le récepteur TRAIL mène à la mort cellulaire. Tiré de¹⁵⁰.

1.3 Les cellules dendritiques (DC)

1.3.1 Le rôle des DC

Les DC ont été identifiées pour la première fois dans une préparation de cellules mononucléaires adhérentes provenant de la rate. C'est leur morphologie unique, composée de dendrites, qui a permis de les distinguer des autres cellules contenues dans la préparation et d'inspirer leur nom, DC¹⁵¹⁻¹⁵⁴. Par la suite, l'étude de ces cellules a révélé qu'elles étaient dotées d'un rôle central pour le système immunitaire¹⁵⁵. En effet, les DC sont les cellules les plus efficaces pour activer les lymphocytes T naïves, d'où leur nom de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles¹⁵⁶. Les DC sont donc responsables du choix délicat de l'antigène contre lequel le système immunitaire adaptatif va développer une réponse. De plus, les DC produisent divers types de cytokines qui vont influencer le cours de la réponse immunitaire. En plus d'induire de l'immunité, les DC ont un rôle primordial dans l'induction de la tolérance. En effet, les souris déficientes en DC ne sont plus capables d'induire la tolérance des lymphocytes T CD4⁺, ce qui résulte à de l'auto-immunité spontanée et fatale¹⁵⁷. Donc, les DC se situent à mi-chemin entre l'immunité innée et l'immunité acquise et elles jouent un rôle essentiel dans l'initiation de la réponse immunitaire.

Les DC sont très hétérogènes et elles peuvent être séparées en plusieurs sous-types qui possèdent un phénotype distinct et des propriétés fonctionnelles différentes. Ainsi, chaque sous-type de DC est associé à des rôles particuliers. Il y a les DC classiques (cDC), qui comprennent les DC myéloïdes et les DC lymphoïdes, et il y a les DC plasmacytoïdes (pDC). Tout d'abord, les DC myéloïdes sont spécialisées dans l'initiation de réponse Th2 associée à l'immunité humorale^{158,159}. Ces cellules sont donc importantes pour l'immunité contre les parasites extracellulaires, tels que le parasite de la Malaria¹⁶⁰. En favorisant une réponse Th2, les DC peuvent, malgré elles, favoriser une réponse immunitaire indésirable, comme au cours de réactions allergiques. En effet, chez un modèle murin d'inflammation chronique des voies respiratoires, la diminution du nombre de DC myéloïdes favorise la réduction de l'inflammation et de l'hyperréactivité des voies respiratoires¹⁶¹. De leur côté, les DC

lymphoïdes sont spécialisées dans l'initiation de réponse Th1 liée à l'immunité à médiation cellulaire^{158,159}. Ce type de réponses est nécessaire pour éliminer les pathogènes intracellulaires comme les virus ou certains parasites et les cellules tumorales. Les souris déficientes en *Batf3* n'ont plus de DC lymphoïdes (DC CD8 α ⁺ des tissus lymphoïdes et DC CD103⁺ CD11b⁻ des tissus non lymphoïdes), ce qui résulte en une incapacité à générer une réponse T CD8⁺ contre le virus du Nil occidental et contre certains types de tumeurs¹⁶². De manière intéressante, les DC lymphoïdes sont les DC les plus efficaces pour la phagocytose de corps apoptotiques et leur présentation croisée^{163,164}. Cette fonction leur permet d'induire l'immunité contre des particules virales, mais aussi la tolérance aux molécules du soi^{164,165}. Les DC lymphoïdes participent aussi à la présentation antigénique et à l'activation de lymphocytes dans la réponse aux parasites intracellulaires, comme *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Toxoplasma gondii* et *Plasmodium spp*¹⁶⁶. Finalement, les pDC ont un rôle important au cours des infections virales. En l'absence de pDC, les souris infectées avec le MCMV ont une réponse altérée des cellules NK alors que les souris infectées avec le virus de la stomatite vésiculaire ne sont pas capables de recruter efficacement les lymphocytes T CD8⁺ et leur chance de survie est diminuée¹⁶⁷. Les pDC jouent aussi un rôle dans la tolérance. L'élimination des pDC accélère le développement de l'insulite et la progression du diabète chez la souris NOD, un modèle murin de diabète auto-immun¹⁶⁸.

1.3.2 La différenciation des DC

Comme tous les leucocytes, les DC proviennent des HSC de la moelle osseuse. Au cours de l'hématopoïèse, les HSC vont se différencier de manière séquentielle jusqu'à un point de divergence où deux voies de différenciation sont possibles (Figure 7). La première voie comprend le CLP qui a le potentiel de se différencier en lymphocytes B, en lymphocyte T et en cellules NK⁵⁵. La deuxième voie comprend le CMP qui a la capacité de se différencier en monocyte, macrophage, granulocyte, mégacaryocyte et érythrocyte⁵⁴. Les DC ont la particularité d'être les seuls leucocytes à être générés par les deux progéniteurs, soit les CMP et CLP. Cependant, puisque les CMP sont dix fois plus abondants que les CLP, la majorité des DC sont produites par les CMP¹⁶⁹. Les CMP vont par la suite se différencier en *Macrophage-DC Progenitor* (MDP)¹⁷⁰. Le transfert adoptif de MDP permet de générer des macrophages et

des DC, mais pas des polymorphonucléaires, des lymphocytes B, des lymphocytes T ou des cellules NK. Les MDP sont donc plus restrictifs que les CMP, mais peuvent tout de même générer des macrophages. Issu des MDP, le progéniteur spécifique aux DC est le *Common-DC Progenitor* (CDP). Le CDP peut générer des cDC et des pDC, mais pas des monocytes/macrophages¹⁷¹. Avant de générer des DC, les CDP dans la moelle osseuse vont se différencier en précurseurs, les pre-DC. Les pre-DC vont migrer par le système sanguin de la moelle osseuse aux organes lymphoïdes et non-lymphoïdes^{172,173}. Ces précurseurs au renouvellement très rapide ont la capacité de générer des cDC, des tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, mais pas des pDC¹⁷⁴. Dernièrement, un autre précurseur provenant des CDP a été identifié, le *pDC-like Murine Precursor*^{175,176}. Il est caractérisé par un phénotype de pDC, soit CD11c^{low}BST2⁺Siglec-H⁺, mais n'exprime pas CCR9 et le MHC-II. Bien que ce précurseur ait un biais pour générer des pDC, en fonction des facteurs présents dans l'environnement immédiat, il peut se différencier en cDC.

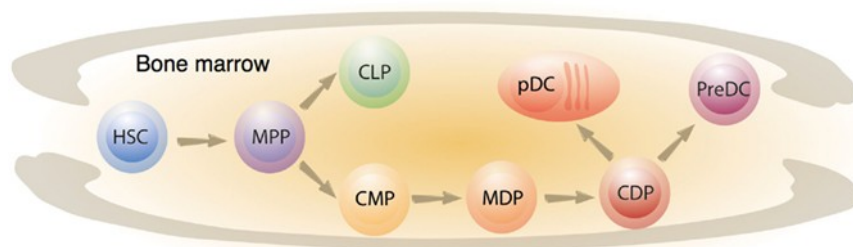


Figure 7 : Schéma simplifié des étapes de différenciation des DC. Tiré de¹⁷⁷.

En condition d'inflammation, les monocytes s'avèrent une source rapide et importante de DC¹⁷⁸. En effet, au cours d'une réaction inflammatoire les DC résidant dans les tissus sont souvent en très petit nombre ou absents et l'augmentation de l'apport de DC provenant de la moelle osseuse peut prendre bien du temps. Puisque les monocytes circulent continuellement dans le sang, ils peuvent rapidement subvenir aux besoins en DC. Cependant, les DC générées de monocytes ont des caractéristiques différentes de celles provenant des organes lymphoïdes¹⁷⁴. Par exemple, les Tip-DCs, générées au cours d'une réponse inflammatoire déclenchée par une infection bactérienne, produisent du TNF et de l'iNOS, efficace contre la

prolifération bactérienne¹⁷⁹. L'apport en DC des monocytes à l'état de base n'est pas bien connu. Contrairement aux précurseurs de DC, les monocytes transférés *in vivo* ne prolifèrent pas et ne sont pas en expansion, il est donc très difficile de déterminer si l'absence de cellules dérivées de monocytes s'explique parce qu'elles n'atteignent jamais le seuil de détection ou par l'absence d'inflammation¹⁸⁰.

Plusieurs facteurs de transcription sont nécessaires pour le développement de la lignée DC ou de certaines sous-populations de DC. Le Tableau 1 illustre l'effet de l'absence de ces facteurs sur les progéniteurs, les différentes populations de DC, les monocytes et les macropages. En plus des facteurs de transcription, divers facteurs de croissance sont essentiels à la différenciation et à l'homéostasie des DC, tels que le *FMS-like tyrosine kinase 3 receptor* (Flt3L), le GM-CSF et le M-CSF. Le Flt3L, qui lie le récepteur Flt3 sur les DC, est produit par les cellules endothéliales, le tissu stromal et les cellules T activées¹⁸¹⁻¹⁸³. Le Flt3L est continuellement produit et des niveaux biologiques sont présents dans le sérum à l'état de base, pour permettre le renouvellement des DC et leur homéostasie. Cependant, au cours de l'inflammation ou d'un stress hématopoïétique, les niveaux de Flt3L sont augmentés grandement pour permettre une production accrue de DC. La voie Flt3-Flt3L est très importante puisque des souris déficientes en Flt3 ou en Flt3L ont une quantité grandement réduite de progéniteurs de DC, de cDC et de pDC^{184,185}. En plus de son rôle important dans le développement, le Flt3L participe à l'homéostasie à l'état de base, en partie en régulant la division des DC matures dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes^{180,186}. Le GM-CSF est un facteur important pour la différenciation de DC générés de progéniteurs hématopoïétiques *in vitro*¹⁸⁷. *In vivo*, le GM-CSF semble important pour les DC CD11b⁺ du derme, mais pas les CD11b⁻¹⁸⁸. Aussi, le GM-CSF est nécessaire pour la production de DC provenant de monocytes en conditions inflammatoires¹⁷². Le M-CSF est connu pour son rôle essentiel dans le développement des macrophages. Il est présent dans le sérum à l'état de base et est augmenté avec l'inflammation¹⁸⁹. Chez les DC, le M-CSF semble important pour certains types de DC, tout comme le GM-CSF. Entre autres, il est important pour les DC CD103⁻CD11b⁺ dans plusieurs tissus, mais pas pour les DC CD103⁺.

	MDP	CDP	Plasmacytoid DC	Classical DC		LC	Monocyte	MΦ
				CD8 ⁺	CD8 ⁻			
<i>PU.1</i> (S1-9)	↓↓↓↓↓ ^a			↓↓↓↓↓ ^b	↓↓↓↓↓		↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓ ^c
<i>Klf4</i> (S10, 11)							↓/↓↓↓↓↓ ^d	↓
<i>Egr1</i> (S12)								↓↓↓↓↓ ^e
<i>Irf8</i> (S13-15)			↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓	↔	↓↓		↓↓↓ ^e
<i>Irf2</i> (S16)				↔	↓↓↓	↓		
<i>Irf4</i> (S17, 18)			↓↓	↔	↓↓↓			
<i>RelB</i> (S19)				↔	↓↓↓↓↓	↔		
<i>Gfi1</i> (S20)	↓↓↓ ^f		↓↓	↓↓	↓↓	↑↑		↑
<i>ID2</i> (S21)			↑	↓↓↓↓↓	↔	↓↓↓↓↓		
<i>E2-2</i> (S22)			↓↓↓↓↓	↔	↔			
<i>Stat3</i> (S23)				↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓			
<i>Stat5</i> (S24)			↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓			
<i>Ikaros</i> (S25)				↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓			
<i>Ikaros DN^g</i> (S25)				↓↓↓↓↓	↓↓↓↓↓			
<i>Ikaros L/L^h</i> (S26)			↓↓↓↓↓	↑	↓			
<i>Xbp1</i> (S27)			↓↓↓	↓↓	↓↓			
<i>Batf3</i> (S28)			↔	↓↓↓↓↓	↔			
<i>Runx3</i> (S29)				↑↑	↓	↓↓↓↓↓		

Tableau 1 : Les facteurs de transcription importants pour la différenciation ou l'homéostasie des DC. Ce tableau illustre l'impact de la déficience de différents facteurs de transcription (colonne de gauche) sur différentes populations cellulaires (rangée du haut). Les flèches rouges et orientées vers le haut représentent une augmentation de la population cellulaire, les flèches vertes et orientées vers le bas indiquent une diminution et les flèches noires et orientées à l'horizontal dénotent aucun changement. La quantité de flèches est proportionnelle à la puissance de l'effet de l'absence du facteur de transcription sur la population cellulaire indiquée. Tiré de¹⁹⁰.

1.3.3 Les sous-types de DC

À la suite de leur différenciation, les DC vont migrer vers les tissus lymphoïdes et non lymphoïdes pour s'y établir. Dans la plupart des tissus, les DC représentent environ 1 % des lymphocytes totaux. Comme il est mentionné précédemment, la population de DC est hétérogène et contient plusieurs sous-types spécialisés. Dans un souci de concision, nous passerons en revue les sous-populations de DC de la rate et discuterons très brièvement des sous-populations dans les autres organes. Dans la rate, les sous-populations majeures de DC comprennent les cDC, c'est-à-dire les DC myéloïdes et lymphoïdes, et les pDC¹⁹¹.

Les DC myéloïdes sont isolées selon le phénotype suivant $CD11c^{high}CD11b^{+}CD8^{-}33D1^{+}$ et peuvent être sous-divisées davantage avec CD4 en deux sous-types, soit $CD4^{-}CD8^{-}CD11c^{high}CD11b^{+}CD8^{-}33D1^{+}$ et $CD4^{+}CD8^{-}CD11c^{high}CD11b^{+}CD8^{-}33D1^{+}$. Les DC myéloïdes sont présentes dans la zone marginale de la rate et vont migrer vers la zone des lymphocytes T, à la suite de l'activation¹⁹². Ces cellules ont un renouvellement très rapide de l'ordre d'environ trois jours. Elles représentent environ 50-60 % des DC de la rate¹⁹³. Récemment identifiées, les DC mérocytiques expriment un phénotype apparenté aux DC myéloïdes : $CD11c^{+}CD11b^{-}/lowCD8\alpha^{-}$ ¹⁹⁴. Les DC lymphoïdes expriment le phénotype suivant : $CD11c^{high}CD8^{+}CD205^{+}$. Elles sont principalement localisées dans la zone des lymphocytes T de la rate¹⁹². Tout comme les DC myéloïdes, les DC lymphoïdes ont un renouvellement très rapide. Les DC lymphoïdes représentent environ 20-25 % des DC de la rate¹⁹³. Les DC lymphoïdes peuvent être sous-divisées selon l'expression de l'intégrine CD103, en DC $CD103^{+}$ et $CD103^{-}$ ¹⁹⁵. Récemment, le marqueur DNGR-1 (CLEC9A) a été identifié comme marqueur spécifique aux DC Batf3 dépendantes, soit les DC lymphoïdes $CD8\alpha^{+}$ des tissus lymphoïdes et les DC lymphoïdes $CD103^{+}CD11b^{-}$ des tissus non lymphoïdes, chez la souris et chez l'homme¹⁹⁶. Le DNGR-1 joue un rôle important dans la détection des cellules mortes et la présentation croisée aux lymphocytes T cytotoxiques¹⁹⁷. De leur côté, les pDC ont d'abord été identifiées comme des monocytes plasmacytoïdes en fonction de leur morphologie similaire aux plasmocytes¹⁹⁸. Elles ont le phénotype suivant : $CD11c^{low}B220^{+}PDCA-1^{+}Siglec-H^{+}$ et sont présentes dans le sang et les tissus lymphoïdes^{199,200}. Contrairement aux cDC, les pDC expriment de faibles niveaux de CMH-II à l'état de base. Ce sont des cellules relativement quiescentes avec une courte demi-vie²⁰¹.

Les sous-types dans les ganglions lymphatiques sont sensiblement les mêmes que dans la rate. De plus, les ganglions lymphatiques peuvent contenir des DC migratoires $CD11c^{int}MHCII^{high}Langerin^{+}CD40^{high}$ qui viennent transférer aux DC lymphoïdes résidentes des ganglions capables de présentation croisée, les antigènes qu'elles ont capturés en périphérie²⁰². Les DC des tissus non lymphoïdes, tels que le foie, les poumons et les reins contiennent des DC $CD103^{+}CD11b^{+}$ et $CD103^{-}CD11b^{high}$ ¹⁸⁰. Finalement, la peau contient des DC $CD103^{+}$ et $CD103^{-}$, mais aussi des cellules de Langerhans. Les cellules de Langerhans

sont quelque peu différentes des autres DC. Elles ne sont pas originaires des pre-DC, elles sont Flt3 indépendantes et ont la capacité de s'autorenouveler. Elles expriment un fort niveau de CMH-II, même à l'état de base.

1.3.4 Les fonctions des sous-types de DC

Les DC inspectent constamment leur environnement à la recherche de particules à capter et à apprêter pour initier une réponse immunitaire antigène spécifique. Puisque les DC sont les CPA professionnelles du système immunitaire, elles sont parfaitement bien équipées pour capturer, apprêter, transporter et présenter des antigènes aux lymphocytes T naïfs. En parallèle, elles sont aussi capables d'orienter la réponse des lymphocytes T naïfs qu'elles vont activer par la production de diverses cytokines.

1.3.4.1 La présentation antigénique et la production de cytokines

Les DC immatures englobent continuellement des particules et des molécules de leur environnement par différents mécanismes, tels que la macropinocytose constitutive, l'endocytose par des récepteurs et la phagocytose²⁰³. La grande majorité des particules ingérées par les DC sont des molécules du soi qui ne provoqueront pas de réponse ou qui mèneront à de la tolérance immune. Cependant, au cours d'une infection, les particules capturées expriment des *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) qui sont détectés par les PRR sur les DC. Cette liaison déclenchera une cascade de signalisation qui mènera à la maturation des DC. La maturation implique des changements morphologiques et fonctionnels dramatiques, tels que l'acidification des lysosomes pour optimiser l'apprêtement de l'antigène, l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation et du CMH, ainsi que la production de cytokines²⁰⁴. L'ensemble de ces changements va favoriser la présentation antigénique aux lymphocytes T et, dans une plus grande mesure, le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative. La maturation des DC peut aussi être déclenchée par la liaison du CD40 sur les DC²⁰⁵. De plus, les cellules NK activées peuvent induire l'activation mais aussi la maturation des DC directement ou en synergie avec des signaux microbiens²⁰⁶. Le ratio de cellules NK par rapport aux DC immatures dictera l'effet du cross-talk entre ces

deux types cellulaires. En effet, un petit ratio de cellules NK-DC immatures (1:5) mènera à la maturation des DC alors qu'un grand ratio de cellules NK-DC immatures (5:1) résultera à la cytolyse des DC immatures par les cellules NK²⁰⁷. Il est à noter que la présence de cytokines pro-inflammatoires va favoriser l'activation des DC, mais pas leur maturation. L'activation va augmenter les capacités fonctionnelles des DC, mais l'absence de maturation les empêchera d'activer fortement et efficacement les lymphocytes T²⁰⁸. En effet, puisque les DC immatures expriment peu de CMH II et pas de molécules de costimulation, la présentation antigénique peut mener à de l'anergie et confère aux DC immatures un phénotype plutôt tolérogène^{209,210}. Les DC matures vont ensuite migrer aux ganglions lymphatiques et rejoindre les zones T par l'expression de la chémokine CCR7, pour présenter l'antigène aux lymphocytes T. Les cytokines produites par les DC sont aussi très importantes dans le déclenchement et l'orientation de la réponse immunitaire. Les DC immatures produisent généralement peu de cytokines. Par contre, avec la maturation, les différentes sous-populations de DC déclenchent leur production de cytokines qui sont bien différentes d'une sous-population à une autre.

Les DC myéloïdes sont spécialisées dans la présentation d'antigènes par la voie exogène qui utilise la machinerie du CMH-II¹⁵⁸. Les particules englobées sont transportées aux endosomes, puis aux lysosomes qui contiennent des enzymes hydrolytiques et ont un pH très bas, permettant la dégradation des particules en peptides antigéniques. Ces peptides antigéniques sont par la suite montés sur une molécule de CMH-II et le complexe qui en résulte est déplacé vers la membrane cytoplasmique, pour permettre la présentation antigénique aux lymphocytes T CD4⁺. Les DC myéloïdes matures ont la capacité de produire de l'IL-10 et du TNF- α qui vont favoriser la génération de lymphocytes T CD4⁺ Th2 associée à une réponse immunitaire humorale²¹¹. De leur côté, les DC mérocytiques sont capables de reverser l'anergie des lymphocytes T périphériques¹⁹⁴. Chez la souris NOD, les DC mérocytiques reversent l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ et stimulent les lymphocytes T CD4⁺ auto-réactifs envers les îlots de Langerhans du pancréas¹⁹⁴. Les DC mérocytiques sont donc responsables du bris de tolérance menant au diabète auto-immun.

Les DC lymphoïdes sont spécialisés dans la présentation d'antigènes par la voie endogène qui nécessite le CMH-I¹⁵⁸. Cette voie vise à présenter des antigènes présents à l'intérieur de la cellule, tels que ceux produits par un virus en répllication, pour activer les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Les antigènes au sein de la cellule sont d'abord dégradés par le protéasome, puis transportés par la protéine TAP dans le réticulum endoplasmique. Dans le réticulum endoplasmique, les peptides antigéniques sont montés sur une molécule de CMH-I, puis le complexe est amené à la membrane cytoplasmique. Les peptides antigéniques sur une molécule de CMH-I sont présentés aux lymphocytes T CD8⁺. Les DC lymphoïdes peuvent aussi effectuer de la présentation croisée²¹². Il a été démontré que ce sont les DC lymphoïdes CD103⁺ qui ont ce potentiel et non les CD103⁻¹⁹⁵. La présentation croisée utilise deux voies différentes pour le chargement des peptides sur le CMH I, la voie cytosolique et la voie vacuolaire. Selon la voie cytosolique, les antigènes capturés par phagocytose qui seraient normalement amenés aux lysosomes sont bifurqués du phagosome au protéasome pour être dégradés²¹³. Ensuite, les antigènes dégradés sont amenés au réticulum endoplasmique, ou alternativement réimportés au phagosome, où ils sont chargés sur des molécules de CMH I, puis le complexe formé par les antigènes dégradés et le CMH I sera exporté à la surface cellulaire^{214,215}. Selon la seconde voie, la voie vacuolaire, les antigènes capturés par phagocytose sont dégradés en peptides directement dans le phagosome et chargés sur le CMH I au même endroit et le complexe est ensuite exporté à la surface²¹⁶. La présentation croisée permet donc de présenter des antigènes exogènes aux lymphocytes T CD8⁺. De ce fait, la réponse *in vivo* des lymphocytes T CD8⁺ contre le virus herpès simplex 1, le virus influenza et le virus vaccinia, est généralement déclenchée par la présentation d'antigènes par les DC lymphoïdes et, dans une moindre mesure, par les autres types de DC²¹⁷. Les DC lymphoïdes matures sont spécialisées dans la production d'IL-12, une cytokine qui permet d'induire la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1 producteur d'IFN- γ . Ainsi, par l'induction de cellules Th1, les DC lymphoïdes favorisent les réponses immunes à médiation cellulaire²¹¹. Les DC lymphoïdes sont aussi capables de produire de petites quantités d'IFN- γ qui favoriseront le développement et le maintien de la réponse Th1²¹⁸. Aussi, les DC lymphoïdes peuvent produire la cytokine anti-inflammatoire TGF- β importante pour la conversion de cellules T en lymphocytes Treg²¹⁹.

Comme toutes les DC, les pDC expriment le CMH-I et II, ce qui leur permettent de présenter des antigènes par la voie endogène et exogènes²²⁰. De plus, elles peuvent faire de la présentation croisée des antigènes. Cependant, il a été démontré que les pDC capturent, appréhendent et chargent les antigènes sur les molécules de CMH de façon moins efficace que les cDC²²¹. Ces caractéristiques confèrent aux pDC à l'état de base une activité tolérogène²²². En effet, à la suite du contact des lymphocytes T avec des pDC présentant des antigènes à l'état de base, les lymphocytes T ne prolifèrent pas et acquièrent une activité régulatrice²²³. De plus, les pDC peuvent exprimer de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO), du *Inducible Costimulator Ligand* (ICOS-L), et/ou du *Programmed Death 1 Ligand* (PD-L1), important pour le développement des Treg et la suppression des cellules auto-réactives^{223,224}. Au cours d'une infection, l'activation des pDC augmente l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation, tel qu'observé chez les cDC, ce qui accroît leur pouvoir de stimulation. Il est à noter que la régulation de l'expression du CMH II est différente chez les pDC et les cDC. L'expression du CMH II est régulée par le *MHC class II transactivator* (CIITA) lui-même régulé par trois promoteurs distincts le pI, le pIII et le pIV²²⁵. Chez les pDC, c'est le promoteur pIII qui régule l'expression du CIITA alors que chez les cDC, c'est le promoteur pI, ce qui explique sans doute les différences observées au niveau du pouvoir de présentation et de stimulation antigénique entre les deux types de DC²²⁶. De ce fait, les pDC activées par les CpG ODN ou par un contact avec le virus de l'influenza augmentent l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation et peuvent ainsi stimuler et permettre l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ *in vivo*²²⁷. De plus, les pDC expriment des récepteurs pour détecter les pathogènes et leur permettent de produire des cytokines. Effectivement, l'expression du TLR-7 et du TLR-9 leur permet de détecter l'ARN et l'ADN viral et de répondre rapidement par la production de grandes quantités d'IFN- α ²²⁷. Cette production rapide permet de diminuer la réplication virale. Les pDC demeurent relativement flexibles dans leur production de cytokines. En fonction de leur stade de maturation et de la nature et la concentration de l'antigène, elles peuvent promouvoir une réponse Th1 ou une réponse Th2²²⁷.

1.4 Les *Interferon-producing Killer Dendritic Cells* (IKDC)

1.4.1 Les cellules hybrides de cellules NK et de DC

Depuis 1996, plusieurs groupes de recherche ont démontré que divers types de DC peuvent avoir des fonctions de cellules tueuses. Entre autres, l'équipe du Dr Shortman a identifié des DC FasL⁺CD8⁺ qui induisent l'apoptose de lymphocytes T CD4 par une interaction Fas/FasL²²⁸. Aussi, il a été démontré que des cellules de Langerhans stimulées par le CD40, expriment un Fas-L fonctionnel leur permettant de tuer des cellules Jurkat, une lignée immortalisée de cellules T²²⁹. De plus, des DC générées de culture de moelle osseuse et mises en présence de CTLA4Ig, une molécule qui bloque la costimulation par les molécules B7-CD28, peuvent induire la cytolyse de cellules T alloactivées²³⁰. Bien que plusieurs sous-types différents de DC soient capables d'effectuer la cytolyse, leur pouvoir cytotoxique se limite aux lymphocytes T. En 2002, le groupe de Von Herrath a identifié la première cellule hybride de cellules NK et de DC ayant la capacité de faire la cytolyse de cibles de cellules NK. C'est en tentant d'élucider le mécanisme responsable de la prévention du diabète auto-immun chez le modèle murin de diabète induit RIP-LCMV et traité à l' α -CD40, que le groupe de Von Herrath a identifié une nouvelle population hybride CD11c⁺CD49b⁺ tolérogène qu'ils ont nommée *bitypic* NK/DC²³¹. L'étude fonctionnelle des *bitypic* NK/DC a révélé que ces cellules produisent une grande quantité d'IFN- γ , qu'elles possèdent un impressionnant pouvoir cytotoxique contre les lignées cellulaires tumorales YAC-1 et RMAS et qu'elles peuvent apprêter et présenter l'ovalbumine (OVA). Quelques années plus tard, le groupe de DeMatteo identifia des cellules hybrides similaires qu'ils ont nommé NKDC. Les NKDC expriment CD11c⁺NK1.1⁺ et sont présentes dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes à l'état de base²³². Comme les cellules *bitypic* NK/DC, les NKDC peuvent produire beaucoup d'IFN- γ , effectuer la cytolyse de cibles de cellules NK et activer les lymphocytes T naïfs. De façon intéressante, le groupe de DeMatteo est parvenu à démontrer, avec une seule expérience, que les NKDC peuvent tuer les cellules YAC-1 chargées avec OVA, acquérir, apprêter et présenter OVA, pour finalement induire efficacement la prolifération de lymphocytes T OT-II spécifiques à OVA. Dans la même expérience, ils ont démontré à l'aide d'un *transwell*

qu'OVA est acquis par les NKDC, après qu'ils aient effectué la cytolysse des cellules YAC-1 chargées avec OVA, et non par une relâche spontanée d'OVA dans le milieu. De plus, ils ont établi que la production d'IFN- γ par les NKDC peut être grandement augmentée en présence de CpG ODN et d'IL-4 (par une boucle autocrine par l'IL-12). Donc, l'ensemble de ces résultats indique que les cellules *bitypic* NK/DC et NKDC sont parfaitement outillées pour avoir un rôle dans plusieurs contextes immunologiques, comme au cours d'infections virales ou bactériennes. D'ailleurs, le groupe de DeMatteo a récemment démontré l'importance des cellules NKDC dans la réponse immune contre la bactérie *Listeria monocytogenes*²³³.

1.4.2 L'identification des IKDC

En 2006, un groupe de recherche fit l'étonnante découverte d'une population cellulaire qui exprimait des marqueurs de cellules NK et de pDC qu'ils nommèrent IKDC^{1,234}. Les IKDC firent l'objet d'une caractérisation extensive qui leur a valu d'être considérée avec attention par la communauté scientifique, par rapport aux autres cellules hybrides de cellules NK et de DC mentionnées plus haut. Comme les cellules NK, les IKDC expriment une panoplie de marqueurs cellulaires associés à la lignée NK, elles produisent une grande quantité d'IFN- γ et elles possèdent une activité cytotoxique envers les lignées cellulaires sensibles aux cellules NK. Comme les pDC, les IKDC expriment un phénotype CD11c^{low}B220⁺, elles produisent de l'IFN- α (ceci fut invalidé par la suite^{218,235}) et présente l'antigène aux lymphocytes T. L'ensemble de ces caractéristiques permettent aux IKDC de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité acquise.

1.4.3 Le rôle des IKDC

En raison de leurs diverses fonctions, les IKDC possèdent un potentiel immunologique très important. Il n'est donc pas surprenant que ces cellules se soient révélées importantes dans plusieurs contextes immunologiques. Cependant, il va sans dire que c'est le rôle antitumoral des IKDC qui a été le plus étudié. Tout d'abord, il a été démontré que les IKDC sont responsables de l'effet antitumoral obtenu par un traitement au *Mésilate* d'*imatinib* avec IL-

²³⁴. En effet, le transfert adoptif d'IKDC stimulées au *Mésilate d'imatinib* avec IL-2 chez des souris *Rag2^{-/-} Il2rg^{-/-}* ayant un mélanome établi, a permis d'inhiber fortement la croissance tumorale, alors que les cellules NK n'eurent aucun effet. À la suite de ces résultats prometteurs, le rôle antitumoral des IKDC fut évalué avec d'autres types de tumeurs ou de souris. Notamment, l'injection d'IKDC dérivées de la moelle osseuse a permis de diminuer la croissance tumorale d'un rhabdomyosarcome induit chez des souris C57BL/6 et des souris *beige*, de manière dose-dépendante²³⁶⁻²³⁸. Outre leur fonction antitumorale importante, les IKDC jouent un rôle dans la réponse antivirale, mais ne semblent pas essentielles à l'élimination des virus. Chez des souris infectées aux virus de l'influenza, les IKDC favorisent la réponse antivirale en présentant des antigènes de virus aux lymphocytes T CD8⁺²³⁹. Par contre, un traitement avec un anticorps α -NK1.1 qui permet d'éliminer les IKDC (et les cellules NK), n'a eu aucun effet sur l'élimination du virus de l'influenza des poumons²³⁹. De manière intéressante, des cellules possédant un phénotype similaire aux IKDC chez l'homme, semblent induites par une infection au virus de l'immunodéficience humaine²⁴⁰. Les IKDC semblent aussi impliquées dans la prévention de maladies auto-immunes. Une étude récente a associé les IKDC à la protection contre l'EAE. Des IKDC traitées avec un agent tolérogène (de la glycoprotéine de myéline d'oligodendrocyte (MOG) fusionnée génétiquement avec la protéine s1 de rétrovirus (nommé MOG-ps1)) puis injectées chez des souris préalablement induites à l'EAE, sont capables de diminuer significativement le score clinique de l'EAE, donc de protéger contre la maladie²⁴¹. Cette étude aux résultats très intéressants est la première à démontrer un rôle des IKDC dans la prévention de maladies auto-immunes. D'ici quelques années, il sera intéressant de voir si les IKDC seront éventuellement associées à d'autres maladies auto-immunes comme le diabète de type 1.

1.4.4 La différenciation des IKDC

La différenciation des IKDC n'est pas très bien connue. Cependant, le progéniteur des IKDC a été identifié. En effet, il a été démontré que les *L-Selectin+ Progenitors* (LSP), des progéniteurs primitifs qui proviennent de HSC et qui sont contenus dans la fraction Sca1⁺c-kit^{high} (LSK) de la moelle osseuse, sont capables de générer une grande quantité d'IKDC²⁴². Malgré le fait que ces progéniteurs génèrent beaucoup d'IKDC, ils ne sont pas exclusivement

capables de se différencier en IKDC. En effet, les progéniteurs LSP ont antérieurement été décrits pour leur capacité à générer des lymphocytes T, des pDC et, dans une moindre mesure, des cellules NK²⁴²⁻²⁴⁴. Comme dans le cas de bien d'autres cellules, le développement des IKDC peut être influencé par les niveaux d'hormones. De ce fait, un traitement à l'œstrogène diminue la différenciation des IKDC de la moelle osseuse, ce qui peut avec le temps faire chuter leur nombre^{242,245}.

Le développement des IKDC est fortement apparenté à celui des cellules NK. Comme pour les cellules NK, le développement des IKDC est strictement dépendant de l'IL-15 et des autres cytokines qui transmettent un signal par la chaîne γc ^{103,235,246}. De plus, les souris déficientes en Id2, un facteur de transcription important pour le choix de différenciation en cellules NK, sont dépourvues de cellules NK, mais aussi d'IKDC, ce qui indique l'importance de ce répresseur de transcription pour le développement des IKDC^{76,242}. En accord avec leurs propriétés de DC, les IKDC expriment l'*Interferon (IFN) Consensus Sequence-Binding Protein* (ICSBP) et RelB, deux facteurs de transcription critiques pour le développement des DC, le premier pour les pDC et le second pour les DC myéloïdes^{242,247,248}. Étonnamment, beaucoup de facteurs nécessaires pour la différenciation des pDC ou des DC ne sont pas essentiels au développement des IKDC. Par exemple, le nombre d'IKDC est peu affecté chez les souris déficientes en Flt3L, alors que les pDC sont grandement réduites²³⁵. Aussi, les IKDC n'expriment pas PU.1, un facteur de transcription impliqué dans l'hématopoïèse et exprimé chez les DC et les pDC, ni Spi-B, essentiel au développement des pDC^{242,246}. De plus, contrairement au pDC, le ligand du récepteur Notch, *delta-like 1*, n'affecte pas la formation d'IKDC²⁴². Donc, les IKDC proviennent d'un progéniteur primitif non exclusif et elles dépendent, tout au long de leur différenciation, de facteurs majoritairement associés à la lignée NK.

La distribution des IKDC dans l'organisme ressemble à celle des cellules NK. Les IKDC se logent majoritairement dans la rate, le foie et la moelle osseuse, mais elles peuvent aussi se trouver, dans une moindre mesure, dans les ganglions lymphatiques, le thymus, les

poumons et l'intestin^{1,87}. Les IKDC représentent environ 0,15 % des lymphocytes totaux¹. Les IKDC sont caractérisées par l'expression concomitante de marqueurs de DC et de cellules NK. Il est nécessaire d'utiliser au moins trois marqueurs pour les identifier spécifiquement. Comme les pDC, les IKDC expriment CD11c^{low}B220⁺, tout en arborant des marqueurs de cellules NK, tels que CD49b ou CD122¹. Puisque les IKDC expriment fortement B220, ceci indique qu'elles sont différentes des *bitypic* NK/DC qui n'expriment pas ce marqueur^{1,231,234}.

1.4.5 La fonction des IKDC

1.4.5.1 La production de cytokines

Les IKDC ont la capacité de produire diverses cytokines qui pourront influencer le cours de la réponse immune. Par exemple, la quantité colossale d'IFN- γ produite par les IKDC s'avère importante et, même dans certains cas, essentielle pour l'effet antitumoral de ces cellules^{234,249}. La production de cette cytokine peut être déclenchée par différents stimuli. En effet, il avait initialement été démontré que les IKDC produisaient de l'IFN- γ après une activation avec de l'IL-15 et de l'IL-12, mais nous savons maintenant que IL-12, IL-15 et l'IL-18 ou une combinaison de ces différentes cytokines peut activer cette production^{1,218,235}. Ces cytokines semblent agir en synergie pour la production d'IFN- γ et semblent aussi avoir une certaine redondance, puisque les IKDC issues d'une souris IL12p40^{-/-} peuvent produire des quantités appréciables d'IFN- γ ²⁵⁰. En plus des cytokines, certains facteurs comme les CPG ODN et le poly I:C, des agonistes de TLR, peuvent activer la production d'IFN- γ ^{218,249}. D'ailleurs, une étude a démontré que la signalisation par les TLR est requise pour la production d'IFN γ par les IKDC²⁵⁰. En plus des cytokines exogènes et des agonistes de TLR, la production d'IFN- γ peut être induite par des cellules tumorales, et ce de manière proportionnelle à la quantité de cellules tumorales et dépendantes du récepteur NKG2D^{234,236}. D'ailleurs, ce n'est que les cellules tumorales et non les tissus sains qui permettent d'activer cette production de cytokines. Le contact avec des fibroblastes infectés au MCMV favorise aussi la production d'IFN- γ , mais il permet surtout la coproduction d'IFN- γ et d'IL-12 par les

IKDC, alors que les NK ne produisent que de l'IFN- γ et les DC que de l'IL-12, attestant du caractère hybride des IKDC²⁵⁰.

Outre l'IFN- γ , il a été démontré que les IKDC peuvent produire de l'IL-12, du TNF- α et de l'IFN- α ^{1,235}. Cependant, la production d'IFN- α fut invalidée puisqu'aucun groupe de recherche n'a été capable de reproduire cette observation^{218,235}. Il a été suggéré que la préparation d'IKDC utilisée pour tester la production d'IFN- α ait été contaminée par des pDC, grandes productrices d'IFN- α ²¹⁸. Les IKDC sont tout de même de très bonnes productrices de cytokines et elles s'avèrent même, dans bien des cas, plus efficaces que les cellules NK²³⁴. Il a même été proposé que les IKDC soient définies, non comme des cellules hybrides ou un sous type de DC, mais comme un sous-groupe de cellules NK spécialisées dans la production de cytokines, comme les cellules NK CD56^{bright} chez l'homme^{235,251}.

1.4.5.2 L'activité cytotoxique

Les IKDC ont la capacité de faire la cytolysse de cibles cellulaires associées aux cellules NK, par exemple de cellules tumorales ou infectées par un virus. En effet, les IKDC ont initialement été décrites pour leur capacité à induire la cytolysse d'une lignée cellulaire de lymphome murin, les YAC-1, et d'une lignée cellulaire exprimant une protéine de MCMV, les Ba/F3-m157, à la suite de leur activation avec des CpG ODN¹. L'activité cytotoxique des IKDC est dépendante de l'expression de NKG2D, un récepteur activateur des cellules NK²³⁴. Il fut aussi démontré par la suite que TRAIL est essentiel aux IKDC pour faire la lyse *in vitro* ou *in vivo* d'une lignée cellulaire de mélanome, les B16F10²³⁶. Donc, contrairement aux NK qui utilisent surtout la relâche de perforine et de granzyme pour tuer une cellule cible, les IKDC utilisent une voie TRAIL-dépendante²⁵². Malgré le fait que les publications initiales aient obtenu un potentiel cytotoxique seulement à la suite de l'activation des IKDC, il semblerait que des IKDC fraîchement isolées possèdent une activité cytotoxique notable²⁴⁶. Il est à noter que nous en connaissons peu sur le système de reconnaissance des cellules tumorales par les IKDC. Par contre, puisque leur activité cytotoxique est dépendante de NKG2D et de TRAIL, il est probable que l'expression de ligands pour ces deux récepteurs sur

les cellules tumorales est nécessaire à l'activité cytolytique des IKDC, mais aussi à leur identification.

C'est en présence d'IL-15 que l'activité cytotoxique des IKDC est à son apogée. L'IL-15 est une cytokine essentielle pour la différenciation et l'homéostasie des cellules NK⁶². Un transfert hydrodynamique du gène de l'IL-15 humain permet l'expression transitoire de cette cytokine pour 48 h, ce qui est suffisant pour induire l'expansion des IKDC, l'augmentation du niveau d'expression de TRAIL sur les IKDC et, par le fait même, l'amplification de l'activité cytotoxique des IKDC²⁵³. De plus, l'effet antitumoral des IKDC activées au *Mésilate d'imatinib* avec IL-2 est abrogé chez les souris déficientes en IL-15, indiquant l'importance de l'IL-15 pour l'activité cytotoxique des IKDC²⁵⁴. Particulièrement, il a été démontré que c'est la trans-présentation de l'IL-15 qui stimule l'activité des IKDC. Le récepteur multimérique de l'IL-15 est composé de deux sous-unités signalétiques, soit l'IL-2R β (CD122) et IL-2R γ , ainsi que de la chaîne spécifique de haute affinité, l'IL-15R α , exprimé sur une CPA qui a peu ou pas d'effet sur la signalisation de la cytokine (Figure 8). Le rôle de l'IL-15R α est de trans-présenter l'IL-15 qui s'y est lié, aux sous-unités signalétiques sur la membrane d'une cellule juxtaposée, telle qu'une IKDC²⁵⁵. La plupart du temps, ce sont des monocytes ou des DC qui trans-présentent, car ce sont les plus grands producteurs d'IL-15^{255,256}. La trans-présentation est stimulée par la présence d'IFN- $\alpha\beta$ dans le milieu²⁵⁷. Malgré que les IKDC ne semblent pas dépendre du Flt3L pour leur survie²³⁵, un traitement au Flt3L permet d'augmenter la quantité de DC et par le fait même la quantité de cellules capables de trans-présenter l'IL-15 et ainsi d'accroître la survie et la prolifération des cellules NK1.1⁺ (exprimé sur les cellules NK et les IKDC)^{258,259}. Les IKDC mises en culture avec des cellules murines stromales qui trans-présentent l'IL-15, nommées cellules MS-5, adoptent plusieurs caractéristiques intéressantes qui vont favoriser directement et indirectement leur potentiel antitumoral. En effet, les IKDC stimulées avec les cellules MS-5, appelés IKDC15, répondent avec plus intensité à l'IFN- α et à l'IL-2, leur permettant d'augmenter l'expression de CCL2 et CCR2, des cytokines importantes pour migrer vers le site tumoral²⁵⁴. Aussi, les cellules MS-5 favorisent l'expansion des IKDC15. De plus, les IKDC15 peuvent répondre au TLR-3 et 4 et augmenter l'expression de TRAIL, de FasL et de perforine/granzyme, mais conservent une activité cytotoxique

TRAIL-dépendante²⁵². Il est à noter que les caractéristiques énoncées précédemment ne sont pas observées chez les cellules NK stimulées de la même façon, c'est-à-dire avec des cellules MS-5. Cependant, les IKDC15 perdent l'expression du CMH-II, ainsi que leur capacité à présenter l'antigène. Donc, la trans-présentation de l'IL-15 « autorise » (du terme anglais *license*) les IKDC à avoir un potentiel cytotoxique accru au profit de la perte de leur activité de CPA²⁵².

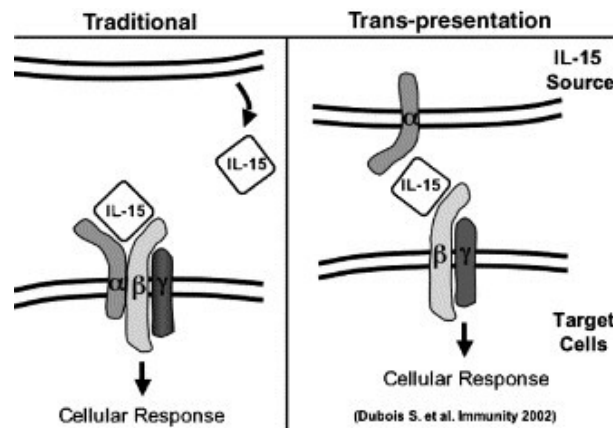


Figure 8 : La présentation traditionnelle et la trans-présentation de l'IL-15. Tiré de²⁶⁰.

À l'inverse des IKDC15, les IKDC dans les ganglions périphériques n'ont pas d'activité cytotoxique. En lien avec cette observation et d'autres évidences, il a été proposé que les IKDC de la rate ou au niveau du site tumoral possèdent un potentiel cytotoxique puis, à la suite de la prise d'un antigène, migrent aux ganglions périphériques et perdent ce pouvoir cytolytique, pour présenter cet antigène aux lymphocytes T¹. Ainsi, les cytokines et la localisation tissulaire influencent grandement l'activité des IKDC

1.4.5.3 La présentation antigénique

Les IKDC ont été initialement décrites pour leur capacité à exercer une activité cytotoxique tout en étant aussi capables de présenter l'antigène. Effectivement, les IKDC en présence du peptide ou de la protéine OVA sont capables d'induire la prolifération de lymphocytes T à un niveau similaire à celui induit par les pDC¹. De plus, en comparant la

capacité de présentation antigénique *in vivo* des IKDC de la rate et des ganglions, il a été observé que seules les IKDC provenant de ganglions sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T. D'ailleurs, c'est dans les ganglions lymphatiques et non dans la rate, qu'une majorité d'IKDC exprime le CMH-II et les molécules de costimulation, CD80 et CD86¹. Cependant, la capacité des IKDC à présenter un antigène a été remise en question. En effet, contrairement aux résultats initiaux, il a été démontré que des IKDC en culture avec le peptide ou la protéine OVA ne sont pas capables d'induire la prolifération de lymphocytes T naïfs²⁴⁶. Aussi, la même absence de stimulation a été observée en utilisant un modèle d'antigène tumoral (CHO-OVA), d'antigène viral (virus de l'influenza) ou d'antigène de parasite (malaria). De plus, le niveau d'expression du CMH-II est très faible sur les IKDC et peut seulement être légèrement augmenté avec du LPS, du poly I:C, de l'IL-4 et de l'IFN- γ , des stimuli de l'expression du CMH-II connus²⁴⁶. Malgré ces résultats, plusieurs groupes ont poursuivi leurs recherches et ont pu démontrer par la suite que les IKDC étaient bel et bien outillées pour effectuer de la présentation antigénique. Effectivement, il a été démontré que le niveau de CMH-II est augmenté sur les IKDC en culture avec de l'IL-15 et de l'IL18, ainsi qu'à la suite d'un contact avec des fibroblastes infectés par le MCMV^{246,250}. Aussi, une analyse du transcriptôme des IKDC a révélé que ces cellules expriment des gènes associés à la machinerie de présentation et d'apprêtement des antigènes²⁵⁰. Ces résultats discordants laissent croire que ce potentiel antigénique est très sensible aux conditions de culture et d'activation des IKDC. Les données récentes sur la capacité antigénique des IKDC indiquent que ces cellules peuvent présenter et cross-présenter des antigènes tumoraux fraîchement cytolysés, mais pas des antigènes solubles²³⁷. Ces résultats démontrent l'importance du concept de *licensing* des IKDC. Effectivement, il semblerait que les IKDC n'ont pas de capacité de présentation antigénique, sauf en présence d'une cible tumorale qui va les « autoriser » à présenter des antigènes tumoraux. Précisément, c'est la lyse des cellules tumorales qui permet ce *licensing* puisque l'utilisation d'anticorps anti-TRAIL et anti-NKG2D empêchent les IKDC d'acquérir cette capacité de présentation antigénique. De plus, le simple contact des IKDC avec les cellules tumorales augmente leur expression du CMH-II, par l'activation de la production autocrine d'IFN- γ , et accroît leur expression des molécules de costimulations²⁶¹.

Il a été démontré que les *licensed* IKDC, c'est-à-dire les IKDC « autorisées » à présenter des antigènes, expriment le marqueur de surface CD11b²⁶¹. Ces IKDC CD11b sont capables de présenter et de cross-présenter des antigènes tumoraux. Il semblerait que celles-ci acquièrent et apprêtent les antigènes tumoraux par un récepteur au mannose. Donc, les IKDC semblent spécialisées dans la cytolysse de cellules tumorales et la présentation subséquente d'antigènes tumoraux. Il n'a pas été défini si les IKDC peuvent aussi être « autorisées » par des cellules cibles infectées par un virus ou autres. Cependant, il a récemment été démontré qu'après avoir effectué la cytolysse de cellules cibles infectées au MCMV, les IKDC acquièrent les caractéristiques d'une CPA et présentent des antigènes viraux aux lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs²⁵⁰. Pour conclure, il a été suggéré que les IKDC pourraient s'avérer très bénéfiques pour leur hôte en raison de leur habilité à rapidement présenter les antigènes de cellules transformées qu'elles ont cytolysées²⁵⁰. Ainsi, contrairement aux DC qui sont dépendantes de leur coopération avec des cellules tueuses, telles que les cellules NK, pour obtenir des débris cellulaires à présenter, les IKDC peuvent agir seules et très rapidement, permettant de restreindre la propagation de l'infection ou des cellules transformées. Les IKDC sont donc parfaitement outillées pour faire de l'immunosurveillance tumorale.

1.4.6 La controverse sur l'identité des IKDC

La ressemblance fonctionnelle et phénotypique des IKDC avec les cellules aNK est frappante. En effet, les cellules aNK produisent une quantité très élevée de cytokines et possèdent une activité cytotoxique accrue, des caractéristiques associées aux IKDC⁸⁷. De plus, plusieurs marqueurs de surfaces nécessaires à l'identification des IKDC, comme le B220 et le CD11c, sont acquis avec l'activation *in vitro* des cellules NK¹⁰³. Ainsi, trois groupes de recherche indépendants ont mis en doute le caractère hybride des IKDC et ont proposé que les IKDC soient considérées comme des cellules appartenant à la lignée NK^{103,235,246}. Effectivement, en plus de ressembler profondément aux cellules aNK, les IKDC dépendent majoritairement de facteurs associés à la lignée NK, comme l'IL-15 et l'Id2, et non à la lignée des DC, tels que le FLT3L et le PU.1^{235,242,246}. Aussi, la capacité antigénique des IKDC fut longtemps mise en doute et demeure controversée, ainsi que leur niveau d'expression du CMH-II et des molécules de costimulation. De plus, une vaste étude transcriptomique a révélé

une ressemblance saisissante entre le transcriptôme des IKDC et celui des cellules NK, et peu de similitude avec celui des pDC²⁶². Il a donc été généralement accepté par la communauté scientifique que les IKDC ressemblent davantage aux cellules NK qu'aux pDC. Cependant, le caractère même des IKDC demeure controversé, à savoir si ces cellules sont des aNK, un sous-type de cellule NK ou autre.

1.5 Les études génétiques

1.5.1 Généralités

Depuis plusieurs années, les études génétiques ont permis d'identifier des régions génétiques, nommées loci, ou même des gènes précis impliqués dans la prédisposition à plusieurs maladies, telles que les maladies auto-immunes et le cancer. Par exemple, 2 *Quantitative trait loci* (QTLs), c'est-à-dire 2 loci associés à un trait quantitatif comme la prédisposition au cancer, associés au cancer des ovaires, ont été identifiés par des études génétiques²⁶³. Aussi, ces études génétiques s'avèrent utiles pour identifier les gènes impliqués dans la régulation de populations cellulaires à l'état de base. Entre autres, il a été démontré par une analyse génétique que des segments génétiques au niveau des chromosomes 1 et 2 sont impliqués dans la régulation du nombre de cellules NKT²⁶⁴. De plus, le même type d'études a permis de constater qu'un polymorphisme au niveau du gène de l'IL-15 affecte l'activité des cellules NK²⁶⁵. Ces régions génétiques ou ces gènes identifiés améliorent la compréhension de la régulation de ces populations et permettent la création de cibles thérapeutiques.

1.5.2 Étude de liaison : Marche à suivre

Les études de liaison (du terme anglais *Linkage Analysis*) ont pour objectif d'identifier des régions génétiques responsables de la régulation d'un phénotype comme par exemple, la régulation de la proportion d'une population cellulaire. Ce type d'étude génétique s'appuie sur le choix de deux souches de souris parentales pour lesquelles le phénotype d'intérêt s'exprime de façon différente. Par exemple, la souris A possède beaucoup de cellules à l'étude alors que la souris B en possède peu. Plus cet écart de phénotype est grand, plus la puissance statistique sera élevée et l'identification de loci sera facilitée. L'étude débute avec le croisement de ces deux souches parentales qui diffèrent pour le phénotype du trait à l'étude, pour créer des souris F1. Ces souris F1 sont ensuite intercroisées pour produire une génération F2. Les souris de la génération F2 ont la particularité d'être constituées d'une mosaïque de gènes provenant des deux souches parentales et ce sont celles-là qui sont étudiées dans l'analyse génétique (Figure

9). La quantité nécessaire de souris F2 pour l'analyse génétique dépend de la force de l'effet sur le phénotype conféré par le locus, ou de chacun des loci impliqués dans la régulation du trait, ainsi que de la taille de ce ou de ces loci²⁶⁶. Généralement, une centaine de souris F2 est générée. Pour chacune des souris F2, le phénotype du trait à l'étude sera évalué et corrélé aux régions génétiques provenant de chacune des souches parentales. Le génotype est déterminé par la détection des *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). On teste normalement environ 300 SNPs répartis dans tout le génome. Spécifiquement, on identifie le polymorphisme, soit associé au fond génétique de la souris A ou de la souris B, au niveau d'un nucléotide, à plusieurs endroits éloignés et stratégiques dans le génome. Cela revient à faire 300 réactions PCR pour différents segments du génome. Ensuite, en se basant sur le principe que l'ADN est donné en bloc, on extrapole le polymorphisme des régions connexes à ces différents nucléotides pour obtenir le polymorphisme de toutes les régions génétiques du génome des souris F2. La corrélation entre le phénotype et le génotype des souris F2 est effectuée par des méthodes d'analyses statistiques complexes. Brièvement, on calcule le *Logarithm of Odds* (LOD) score de chaque SNP²⁶⁷. Le LOD score est une valeur logarithmique qui représente la probabilité que la région génétique du SNP étudié soit liée au phénotype du trait à l'étude. Plus la valeur de LOD score est élevée et plus grande est la probabilité que la région génétique régule le phénotype²⁶⁸. Ainsi, ce type d'étude génétique permet d'identifier un locus ou des loci impliqués dans la régulation d'un phénotype donné, comme la régulation de la proportion d'une population cellulaire donnée. Par la suite, l'utilisation de souris congéniques pour le locus ou les loci identifié(s) permet de valider les résultats obtenus.

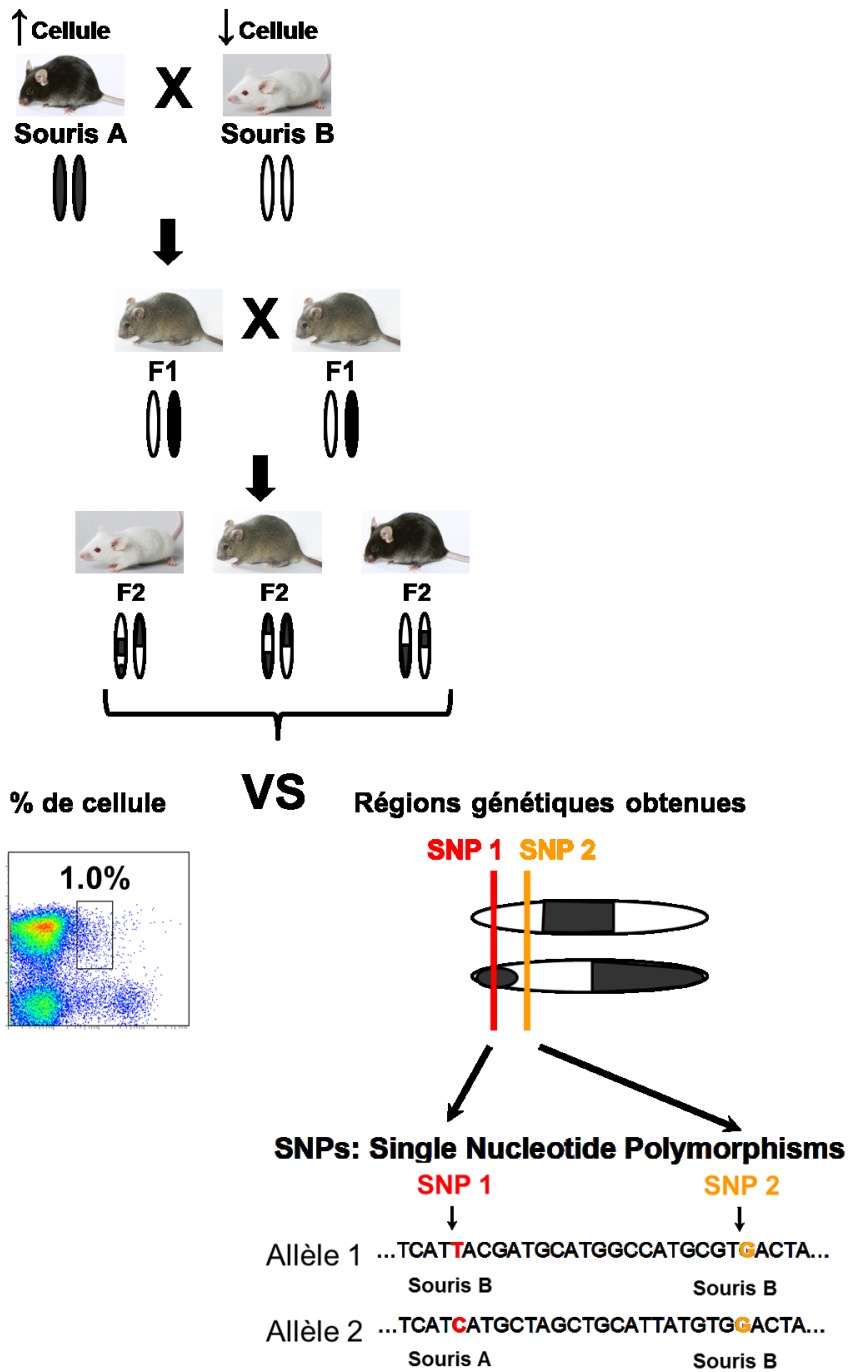


Figure 9 : Schéma explicatif d'une étude de liaison

1.5.2.1 Le choix des lignées de souris parentales

Le choix des deux lignées parentales utilisées pour l'étude génétique est très important. Il est primordial que le phénotype du trait à l'étude soit le plus différent possible entre les deux lignées, pour permettre un bon pouvoir statistique. De plus, l'utilisation de souches de souris pour lesquelles des souris congéniques sont déjà disponibles, permet de faciliter et surtout d'accélérer grandement la validation des résultats de l'étude. Un modèle bien intéressant pour ce dernier point est la souris *Non-Obese Diabetic* (NOD) qui développe spontanément le diabète auto-immun²⁶⁹. En effet, puisque le diabète est une maladie multigénique très complexe, plusieurs études génétiques cherchent à identifier les régions génétiques impliquées dans la prédisposition à cette maladie. Par le fait même, un grand nombre de souris NOD congéniques ont été créées pour identifier ou valider des régions génétiques et certaines de ces souris demeurent encore disponibles. Au moins 21 régions génétiques associées au diabète auto-immun ont été identifiées à l'aide de croisements entre des souris NOD et des souches de souris résistantes au diabète auto-immun²⁷⁰. La plupart du temps, ces souris congéniques sont issues de souris NOD prédisposées au diabète auto-immun et de souris C57BL/6 résistantes à la maladie. Comme les souris NOD, plusieurs souris C57BL/6 congéniques sont aussi disponibles²⁷¹.

La souris NOD a été initialement créée par des chercheurs japonais qui tentaient de développer une souche de souris prédisposée au développement de cataractes²⁷². Cependant, ils réalisèrent que leurs souris avaient des symptômes étranges qui furent par la suite associés au développement d'un diabète auto-immun. En effet, les souris NOD développent un diabète auto-immun spontané qui a d'ailleurs plusieurs des caractéristiques de celui observé chez l'homme. Cependant, l'incidence de la maladie est bien plus élevée chez les souris femelles, environ 60-80 %, comparativement à 20-30 % chez les souris mâles, ce qui n'est pas observé chez l'homme^{273,274}. Le diabète se déclare chez les souris femelles vers l'âge de 12 à 14 semaines et légèrement plus tard chez les souris mâles. Par contre, des infiltrats de cellules immunitaires peuvent déjà être observés autour des îlots de Langerhans du pancréas (peri-insulite) vers l'âge de 3 à 4 semaines et une infiltration importante des îlots (insulite), chez

presque toutes les souris femelles et mâles confondues, à 10 semaines²⁶⁹. Donc, les premières étapes vers le développement du diabète se manifestent tôt dans la vie de la souris NOD.

Comme chez l'homme, la prédisposition au diabète auto-immun chez la souris NOD est complexe et contrôlée par plusieurs régions génétiques. L'élément essentiel et celui contribuant le plus à la prédisposition, chez la souris NOD, est son CMH unique nommé H-2^{275,276}. Cet haplotype de CMH n'exprime pas de molécule I-E et sa molécule I-A contient une substitution d'acide aminé dans la chaîne β qui affecte grandement le répertoire des peptides présentés par cet allèle^{277,278}. Plusieurs études ont démontré que de modifier ce CMH ou encore d'introduire un nouveau CMH, tel le H-2^k chez la souris NOD.H2^k, permet de prévenir le développement de l'insulite et du diabète^{275,279,280}. Les NOD.H2^k sont particulièrement intéressantes pour les études génétiques puisqu'elles possèdent le fond génétique de la souris NOD, mais ne développent plus de diabète qui pourrait venir interférer avec les données génétiques obtenues²⁸¹.

1.5.2.2 La création de souris congéniques

Les souris congéniques sont des souris qui possèdent le fond génétique d'une souris receveuse A, mais avec un intervalle génétique provenant d'une souris donneuse B (figure 10)²⁸². Par exemple, la souris NOD.H2^k est une souris NOD congénique pour le CMH de la souris AKR (CMH H-2^k) tout comme la souris B10.Br qui est une souris C57BL/6 congénique pour ce même CMH H-2^k^{281,283}. Les souris congéniques sont créées par rétrocroisements répétés de souris F1 avec la souris receveuse, jusqu'à l'obtention d'une progéniture arborant l'allèle de la souris donneuse, au locus d'intérêt, avec le fond génétique de la souris receveuse. Ces souris sont ensuite croisées entre elles pour obtenir des souris congéniques homozygotes.

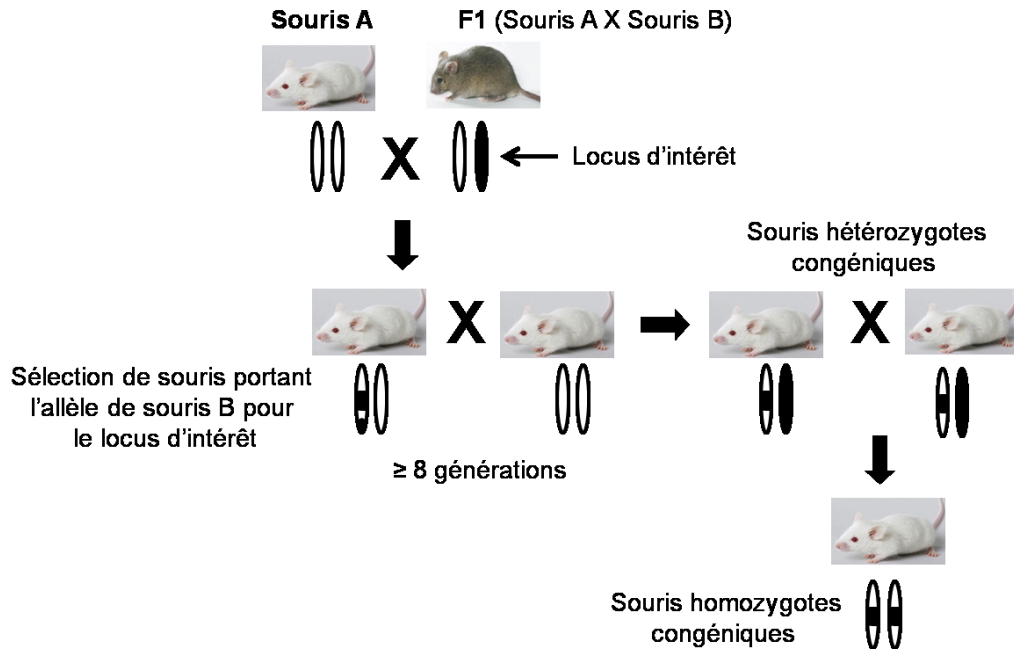


Figure 10 : Méthode de création de souris congéniques.

1.5.2.2.1 Exemple de souris congénique : la souris NOD.Lc7

La souris NOD.Lc7, anciennement nommée NOD.DR-4, est un autre exemple de souris congénique²⁸⁴. Elle est issue d'un croisement entre la souris NOD prédisposée au diabète auto-immun et la souris C57L résistante. Elle a été créée dans le but de générer des souris NOD homozygotes H-2^{g7} congéniques qui contiendraient le moins de gènes de fond génétique C57L, tout en étant résistantes au diabète auto-immun. En sélectionnant les souris homozygotes H-2^{g7}, on s'assure que les souris ont la capacité de développer le diabète auto-immun et que c'est la présence de gènes de résistance et non la perte de gènes de prédisposition, qui cause la résistance. La souris NOD.Lc7 possède un intervalle génétique d'environ 20cM de gènes de souris C57L au niveau de la région distale du chromosome 7 (D7Mit253 à D7Mit15), ainsi qu'un court intervalle au niveau du chromosome 19 (D19Mit19) qui a été ramené à un fond NOD, suite à la première publication sur ces souris^{284,285}. Au niveau de leur phénotype, les souris NOD.Lc7 développent une infiltration généralisée des îlots de Langerhans et de l'insulite invasive, mais elles parviennent tout de même à maintenir leurs cellules β et la production d'insuline²⁸⁴. Effectivement, les cellules β de la souris

NOD.Lc7 semblent protégées du développement du diabète auto-immun en raison d'une prolifération augmentée, d'une mort cellulaire diminuée et d'une résistance aux stress oxydatif²⁸⁶. La capacité des cellules β et des mécanismes de tolérance, non encore déterminés, semblent importants pour la résistance des souris NOD.Lc7, puisque celles-ci contiennent des lymphocytes T diabétogéniques. En effet, l'injection de cellules T de souris NOD.Lc7 âgées et non diabétiques chez des souris NOD, induit le diabète auto-immun alors que des cellules T de souris NOD âgées et non diabétiques n'ont pas la capacité d'induire le diabète chez les souris NOD.Lc7²⁸⁴. Outre leur phénotype de résistance au diabète, on en connaît peu sur les souris NOD.Lc7.

1.5.2.3 Identification du gène

En plus de permettre de valider les résultats des études génétiques, les souris congéniques sont des outils intéressants pour faciliter l'identification du gène à l'intérieur du locus identifié par l'étude génétique. Les souris congéniques nous permettent aussi d'évaluer l'effet d'un locus génétique et ces conséquences, sans la contribution des autres loci²⁷¹. Les souris congéniques sont donc particulièrement essentielles dans les cas où le phénotype étudié est régulé de façon multigénique.

Advenant l'existence d'une souris congénique qui permet de valider le locus identifié par l'étude génétique, mais qui contient un intervalle génétique beaucoup plus grand que le locus, la création de souris sous-congéniques peut s'avérer intéressante. Ces souris sont créées par le rétrocroisement de souris congéniques jusqu'à l'obtention de recombinaisons dans le locus d'intérêt. La création de souris sous-congéniques est facilitée chez les souris congéniques qui possèdent un locus très long, puisque les chances de recombinaisons sont proportionnelles à la longueur du segment génétique²⁸⁷. Aussi, si plus d'un gène dans le locus régule le phénotype, la création de souris sous-congéniques permettra de vérifier l'apport de chacun. Par contre, il est possible qu'en réduisant davantage l'intervalle génétique, le ou les gènes régulant le phénotype soient exclus.

Raisonnement, hypothèse et objectifs

Les IKDC ont été abondamment décrites pour leur pouvoir antitumoral exceptionnel. De ce fait, ces cellules s'avèrent des candidats particulièrement intéressants pour le développement de nouvelles thérapies dans la lutte contre le cancer. Pour parvenir à utiliser efficacement et adéquatement ces cellules, il est primordial de trouver une façon de les cibler spécifiquement. De plus, puisque ces cellules sont très fragiles et meurent facilement, il serait préférable de pouvoir les manipuler *in vivo*. Cependant, il est ardu de définir une population cellulaire quand l'identité de cette population est remise en question. En effet, depuis leur identification, la nature des IKDC a été un sujet controversé, notamment en raison de leur grande similitude avec les cellules aNK et leur manque de caractéristiques communes avec les DC. Malgré les embûches tendues par une telle controverse, les caractéristiques antitumorales des IKDC sont si uniques et considérables, qu'il est primordial de poursuivre l'étude de ces cellules. En tenant compte de ces considérations, nous émettons l'hypothèse suivante :

« Une approche génétique en collaboration avec des études de caractérisation biologique permettra d'identifier le ou les facteurs génétiques responsables de la régulation des IKDC »

Les objectifs principaux de la thèse sont :

- ❖ Définir la relation développementale entre les IKDC et les cellules NK.
- ❖ Identifier les facteurs génétiques responsables de la régulation des IKDC.

CHAPITRE 2: ARTICLE 1

2.1 Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK cell differentiation

Fanny Guimont-Desrochers, Geneviève Boucher, Zhongjun Dong, Martine Dupuis, André Veillette, Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *Blood* **119**, 4349-4357 (2012)

Ma contribution à cet article est majeure. J'ai grandement contribué au design expérimental avec l'aide de la Dre Sylvie Lesage. J'ai effectué l'ensemble des manipulations techniques. Geneviève Boucher a analysé les résultats de micropuces. Les Dr Zhongjun Dong et André Veillette ont proposé de vérifier les récepteurs de la famille des SAP sur les IKDC. Martine Dupuis a mis au point l'expérience de cycle cellulaire. J'ai participé activement à l'analyse des résultats, à leur interprétation, à la création des figures, à la rédaction de l'article et à la réponse aux réviseurs. J'évalue ma participation à 90 %.

Cet article est important pour la thèse puisqu'il permet de mettre fin au débat concernant la nature des IKDC. Tout d'abord, les résultats présentés démontrent par des expériences *in vivo* que les IKDC ne sont pas des cellules NK activées. De plus, ils mettent en évidence le phénotype immature et la prolifération active des IKDC. Finalement, il y est démontré par des études de transfert adoptif que les IKDC sont des précurseurs de cellules mNK.

Redefining interferon-producing killer dendritic cells as a novel intermediate in NK cell differentiation

Fanny Guimont-Desrochers^{1,2}, Geneviève Boucher³, Zhongjun Dong⁴, Martine Dupuis², André Veillette⁴, Sylvie Lesage^{1,2}

¹Department of Microbiology and Immunology, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

²Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Montreal, Quebec H1T 2M4, Canada.

³Bioinformatics Platform; Institute for Research in Immunology and Cancer, University of Montreal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada.

⁴Laboratory of Molecular Oncology, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Quebec H2W 1R7, Canada.

2.2 Abstract

The cell lineage origin of interferon-producing killer dendritic cells (IKDC), which exhibit prominent anti-tumoral activity, has been subject to debate. Although IKDC were first described as a cell type exhibiting both pDC and NK cell properties, the current view reflects that IKDC merely represent activated NK cells expressing B220, which were thus renamed B220⁺ NK cells. Herein, we further investigate the lineage relationship of B220⁺ NK cells with regards to other NK cell subsets. We surprisingly find that, upon adoptive transfer, B220⁻ NK cells did not acquire B220 expression, even in the presence of potent activating stimuli. These findings strongly argue against the concept that B220⁺ NK cells are activated NK cells. Moreover, we unequivocally demonstrate that B220⁺ NK cells are highly proliferative and differentiate into mature NK cells upon *in vivo* adoptive transfer. Additional phenotypic, functional and transcriptional characterizations further define B220⁺ NK cells as immediate precursors to mature NK cells. The characterization of these novel attributes to B220⁺ NK cells will guide the identification of their ortholog in humans, contributing to the design of potent cancer immunotherapies.

Keywords: Natural Killer cells, Differentiation, Tumor Immunity

2.3 Introduction

NK cells are large granular lymphocytes that were first described for their capacity to spontaneously eliminate tumour cells and virus-infected cells without prior sensitization [1]. These functions are mediated via an array of Ig-like and C-type lectin receptors delivering both activating and inhibitory signals [1]. In addition to their cytotoxic activity, NK cells rapidly produce vast amounts of cytokines, such as IFN- γ , as well as other cellular mediators including chemokines. NK cells thus act as an important first line of defence in the early control of virus infection, in tumour immunosurveillance and in immunoregulation.

The differentiation of NK cells from hematopoietic stem cells in the bone marrow is incompletely understood, but is thought to occur in a sequential manner involving multiple stages of development based on phenotype, function and turnover [2]. The first committed NK cell precursor (NKP) is characterized by CD122⁺ expression in the absence of the expression of other lineage markers [3], although a pre-NKP cell lacking CD122 expression has recently been characterized as a NK cell committed progenitor preceding NKP in the differentiation stages [4]. NKP subsequently give rise to immature NK (iNK) cells which express CD122 along with NK1.1 and CD94/NKG2. As iNK cells differentiate further, they undergo education to achieve their full functional competence and they acquire CD49b expression to finally become mature NK (mNK) cells [2]. These CD49b⁺ mNK cells still compose a heterogeneous cell population which may be segregated according to their phenotype, function and tissue distribution. Indeed, functional maturation of CD49b⁺ mNK cells proceeds along 4 stages from the CD11b⁻CD27⁻ to the CD11b⁻CD27⁺ then to the CD11b⁺CD27⁺ and finally to the CD11b⁺CD27⁻ subset [5]. Several other markers are acquired along this differentiation process, including CD43, CD94-NKG2 and Ly49 receptors [5-7]. Finally, upon activation, mNK cells gain the expression of additional activation markers, namely CD69, CD44, FasL, CD86 and MHC II [8-12]. In addition, activated mNK cells increase in size and show heightened functional properties such as an enhanced cytolytic potential and increased ability to produce cytokines [2].

Notably, activated mNK cells demonstrate a striking phenotypic resemblance to the interferon-producing killer dendritic cells (IKDC), which were initially described as a hybrid cell type exhibiting properties of both mNK cells and plasmacytoid dendritic cells (pDC) [13, 14]. Indeed, as for mNK cells, IKDC expressed various mNK cell markers, including CD49b, they produced vast amounts of IFN- γ , they showed prominent *in vitro* cytolytic activity and they were more efficient than mNK cells at eliminating tumours *in vivo* [13, 14]. By analogy to pDC, IKDC exhibited a CD11c^{low}B220⁺ phenotype, they were shown to produce IFN α as well as present antigen to T cells. Yet, the pDC properties associated with IKDC were readily debated. For one, mNK cells exhibit low levels of CD11c [15], while the expression of B220 and MHC II can be up-regulated on mNK cells, at least upon *in vitro* activation [9, 12]. Secondly, several groups could not replicate the finding that IKDC produced IFN α [16-19], suggesting that the IKDC preparation in the original studies [13] may have been contaminated with pDC. Finally, three independent groups demonstrated that cells exhibiting the IKDC phenotype were part of the NK lineage and challenged the idea that these cells also exhibit DC properties [9, 16-18]. Together, these groups demonstrated that, as for mNK cells, IKDC were dependent on IL-15 for their differentiation, exhibited spontaneous cytotoxic activity towards target cells and produced vast amounts of IFN- γ upon stimulation. Of relevance, they also demonstrated that, as opposed to pDC, IKDC were independent of Flt-3L for their differentiation and did not express PU.1. Moreover, both mNK cells and IKDC were dependent on Id2 for differentiation [19] and the antigen presentation potential of IKDC to T cells was also challenged [9, 16]. Together, these observations prompted a redefinition of IKDC as an NK cell subset rather than a pDC/NK cell hybrid cell type. Consequently, cells carrying the IKDC phenotype are now more commonly referred to as activated B220⁺ NK cells [18]. Nevertheless, the exact lineage relationship of B220⁺ NK cells, which arguably present with the most efficient anti-tumoural potential relative to other mNK cell subsets [14, 16, 20-22], has yet to be determined.

Herein, we address the biological relationship between B220⁺ NK cells and mNK cells. We demonstrate that mNK cells do not acquire B220 expression *in vivo*, even in the presence of activating stimuli. Rather, we demonstrate that B220⁺ NK cells are immediate precursors to

mNK cells. Thus, this study reveals a new role for B220⁺ NK cells as an intermediate in the differentiation of mNK cells *in vivo*.

2.4 Materials and Methods

Mice

Eight- to 12 week-old mice were used for all the experiments. C57BL/6 mice were purchased from the Jackson Laboratory. B6.SJL and B6.Rag1^{-/-} mice were maintained at the Maisonneuve-Rosemont Hospital housing facility (Montreal, Canada). Studies were approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee and overseen by the Canadian Council for Animal Protection.

Antibodies

The following antibodies were purchased from Biolegend: CD3ε (17A2), CD19 (6D5), CD11c (N418), B220 (RA3-6B2), CD49b (DX5), CD122 (5H4), CD11b (M1/70), CD27 (LG.3A10), NKp46 (29A1.4), CD2 (RM2-2), CD69 (H1.2F3), CD45.1 (A20), CD45.2 (104). NK1.1 (PK136) was obtained from BD Biosciences. Antibodies against SAP and SLAMs (CD84, CRACC, 2B4, Ly108) and CD43 (S7) were produced in the laboratory.

Cell preparation and flow cytometry

Spleens were mechanically disrupted through a 70-µm sterile cell strainer (BD Biosciences) and treated with NH₄Cl. 2.4G2 was added prior to staining with specific antibodies. Data was acquired using a LSRII flow cytometer (BD Biosciences) or FACS Calibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Tree Star). Dead cells, doublets and autofluorescence were electronically excluded during the analysis. CD19⁺ and CD3⁺ were also excluded to analyze NK cells in C57BL/6 mice. Intracellular staining for SAP was performed using BD Biosciences CytotfixCytoperm Kit. Cell sorting was performed on the FACS Aria III. B220⁺ NK cells were gated as CD11c^{low} B220⁺ CD49b⁺ cells, CD27⁺ NK cells as CD11c^{-low} B220⁻ CD49b⁺ CD27⁺, and CD27⁻ NK cells as CD11c^{-low} B220⁻ CD49b⁺ CD27⁻. Cell purities were routinely above 90%.

Adoptive transfer

B6.SJL (CD45.1) sorted spleen cells were adoptively transferred into C57BL/6 (CD45.2) mice or B6.Rag1^{-/-} (CD45.2) mice through tail vein injections. *In vivo* activation of NK cells was achieved with intraperitoneal (i.p.) injections of either 200µg/mouse of poly I:C (Sigma) or 100µg of anti-CD40 antibody in mice weighing 25g (Bio X Cell, clone FGK45) 24h following cell injections. Cells were analyzed 5 or 15 days post-transfer, 18h, 3 days and 5 days after poly I:C injection or 40h, 3 days and 5 days after anti-CD40 treatment.

Cytotoxic assay

For ⁵¹Cr release lysis assay, 5 000 target YAC-1 cells were incubated at 37 °C for 1.5h with 50µCi of sodium chromate (Perkin-Elmer) and washed prior to the addition of effector cells at varying ratios. B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK effector cells were sorted from the spleen of mice injected with poly I:C 18h earlier. Effector and target cells were incubated together for 4h at 37 °C. All effector/target cell ratios were conducted in duplicate or triplicate.

BrdU incorporation

Mice were injected i.p. with 1mg of BrdU (Aldrich) on day 0 and given 1g/L of BrdU in the drinking water, which was replaced every 3 or 4 days. Cells were fixed, permeabilized, treated with DNase (Sigma-Aldrich) and stained with anti-BrdU antibody (BD Biosciences).

Measurement of cell cycle

10 000 total CD49b⁺ cells and 10 000 B220⁺, CD27⁺ or CD27⁻ NK cells from C57BL/6 mice were sorted directly in modified Krishan buffer (0.1% sodium citrate (Sigma), 0.3% NP-40 (MP Biomedicals), 0.05 mg/ml propidium iodide (BD Biosciences), and 0.02 mg/ml RNase A (US Biological)[23, 24], vigorously vortexed and incubated on ice for 15min prior to data acquisition at low speed using a FACS Calibur (BD Biosciences).

Transcriptome profiling

Spleen cells from 8-10 B6.Rag1^{-/-} mice were stained and B220⁺ NK cells were sorted on FACS Aria III according to the following phenotype, namely CD11c^{low} B220⁺ CD122⁺, while CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets were sorted based on B220⁻CD11c^{-low}CD122⁺ phenotype and are further separated according to CD27 expression. Upon sorting, cells were immediately

centrifuged and resuspended in Trizol reagent (Applied Biosystems). RNA was extracted using Qiagen RNeasy kit (Qiagen). Microarray experiments were performed using Illumina Mouse Whole Genome Expression BeadChips version 2.0 which contain 50-mer probes targeting 42,282 transcripts. Probe data was exported from Illumina BeadStudio as raw data and screened for quality. Gene expression data was analyzed using Bioconductor packages (<http://www.bioconductor.org/>) and R statistical language (www.r-project.org). Bioconductor *limma* package was used to log₂-transform, quantile-normalize and filter the probe intensities [25]. A filter was applied to filter out probes with low expression and with insufficient variation in expression across all samples tested. Probes retained after this filtering process presented average intensities and variation greater than the median intensity and the median standard variation across all probes in all samples. Probe data was converted to gene data by averaging intensities when more than one probe was associated with a given gene. The resulting matrix showing genes as rows and samples as columns was used as input for linear modeling using the method available in *limma* which uses a moderated t-statistic to assess significance [25]. Two contrasts were evaluated (CD27⁺ vs B220⁺, CD27⁻ vs B220⁺) and *p* values from the resulting comparison were adjusted for multiple testing according to the method of Benjamini and Hochberg to control the false discovery rate. In addition to the moderated t-statistic, *limma* provides the moderated F-statistic which combines the t-statistics for all the contrasts into an overall test of significance for a given gene [25]. Genes presenting an adjusted p-value lower than 0.05 for this test and a fold-change greater than 1.5 or lower than -1.5 in one of the two conditions were kept for clustering analysis. Hierarchical clustering was performed in R and using TMeV software on z-transformed data (euclidean distance with complete linkage) [26]. Enrichment analysis was performed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [27]. Microarray data have been deposited at the National Center for Biotechnology Information GEO repository under accession number GSE34237, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

2.5 Results

B220 does not define an activation marker on mNK cells *in vivo*

We argued that, if B220⁺ NK cells (formerly known as IKDC) occur *in vivo* as a result of NK cell activation, the spontaneous occurrence of B220⁺ NK cells in uninfected mice should be derived *in vivo* from a mature NK cell subset responding to endogenous signals. To test this hypothesis, we sorted B220⁻ mNK cells according to CD27 expression, namely CD27⁺ and CD27⁻ NK cells, from a B6.SJL (CD45.1) mouse and transferred each of these mNK cell subsets into C57BL/6 (CD45.2) recipient mice (Figure 1a). We opted to select mNK cell subsets based on CD27 expression because it defines distinct functional maturation stages in both mouse and human [28-30]. Five days post-transfer, we found that both mNK cell subsets had maintained their original cell surface phenotype, although the CD27⁺ NK cells had begun to down-regulate CD27 expression (Figure 1b), in agreement with their known differentiation process [5]. The differentiation of CD27⁺ NK cells was most evident at 15 days post-transfer, where most of the transferred mNK cells exhibited a CD27⁻ phenotype and had up-regulated CD43 expression (Figure 1c) [5, 6]. Surprisingly, neither the CD27⁺ nor the CD27⁻ transferred NK cells up-regulated B220 within the 15 day time-frame, a timeline corresponding to the half-life of NK cells [31]. As only a low proportion of B220⁺ NK cells is detectable in the spleen of C57BL/6 mice, we opted to evaluate whether the detection of B220 acquisition by mNK cells would be more sensitive in B6.Rag1^{-/-} mice, wherein we find a sizeable proportion of B220⁺ NK cells as a consequence of the absence of T and B cells (supplemental Figure 1). Notwithstanding, as for C57BL/6 mice, neither CD27⁺ nor CD27⁻ NK cells were found to up-regulate B220 upon transfer into B6.Rag1^{-/-} mice (Figure 1d, e). These results suggest that neither CD27⁺ nor CD27⁻ mNK cells spontaneously acquire B220 expression *in vivo* during steady-state conditions, even if B220⁺ NK cells can be readily identified in the lymphoid organs.

As described by others [9], mNK cells are able to acquire B220 expression upon *in vitro* culture with IL-2 stimulation (supplemental Figure 2). Moreover, a higher proportion of B220-expressing cells of total NK cells can be found upon *in vivo* stimulation (supplemental Figure

3) [9]. Thus, it has been proposed that mNK cells acquire B220 expression upon activation. To investigate this possibility, we transferred sorted B220⁻ mNK cells expressing either CD27⁺ or CD27⁻ from a B6.SJL mouse into C57BL/6 mice, which were subsequently injected with polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) or PBS. Both mNK cell subsets were efficiently activated upon poly I:C treatment as evidenced through the up-regulation of CD69 at the peak of the response (Figure 2c, bold), relative to PBS injections (Figure 2c, filled). Yet, neither mNK subset up-regulated B220 expression (Figure 2a, b and supplemental Figure 5 a, b), whereas B220⁺ NK cells maintained a high level of B220 expression upon poly I:C treatment (supplemental Figure 4a, b). Moreover, as anti-CD40 treatment in Rag-deficient mice has also been shown to activate mNK cells [32, 33], we transferred B6.SJL CD27⁺ and CD27⁻ mNK cells into B6.Rag1^{-/-} mice and injected the recipient mice with anti-CD40 or PBS. Again, both mNK cell subsets exhibited an activated phenotype upon *in vivo* treatment with anti-CD40 (Figure 2f, bold) compared with PBS-treated mice (Figure 2f, filled), yet neither CD27⁺ nor CD27⁻ NK cells presented with an up-regulation of B220 expression (Figure 2d, e and supplemental Figure 5c, d), while B220⁺ NK cells maintained B220 expression in these conditions (supplemental Figure 4c, d). Taken together, these results suggest that both CD27⁺ and CD27⁻ NK cells do not acquire B220 expression *in vivo*, either during steady state conditions or upon poly I:C and anti-CD40 activation, and further suggest that B220⁺ NK cells are specifically increased in the spleen upon *in vivo* activation.

B220⁺ NK cells exhibit a more immature phenotype than CD27⁺ NK cells

B220⁺ NK cells are present at variable frequency within various lymphoid organs, including the thymus, spleen, lymph nodes and bone marrow [13, 34, 35]. In order to confirm the NK cell lineage origin of these B220⁺ cells, we investigated the *ex vivo* expression of various markers associated with the NK lineage in comparison with CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets (Figure 3a). All three subsets exhibited a similar phenotype with regards to the expression of markers associated with the NK lineage, including NK1.1, NKp46 and CD122. Likewise, the signalling lymphocytic activation molecule (SLAM)-associated protein (SAP), the SLAM-related receptors, CD84, CRACC and 2B4, as well as the NK cell adhesion molecule, CD2, were not differentially expressed among the three NK cell subsets. However, CD69 was expressed at low level on both B220⁺ NK cells and the CD27⁺ NK cell subset, while it was

absent from the CD27⁻ NK cell subset (Figure 3a). B220⁺ NK cells also expressed high levels of CD27 and low levels of CD11b relative to total mNK cells (Figure 3b). B220⁺ NK cells may thus be more closely related to the CD27⁺, as opposed to the CD27⁻ NK cell subset. Finally, we determined the expression level of CD43 and Ly108, where Ly108 is a membrane glycoprotein of the SLAM family that, as opposed to CD43, is down-regulated with NK cell maturation [6, 36, 37]. As expected, CD43 expression was highest and Ly108 was lowest on the most functionally mature CD27⁻ NK cell subset relative to the CD27⁺ NK cell subset (Figure 3c). In contrast, B220⁺ NK cells exhibited the lowest level of CD43 and the highest level of Ly108 in comparison to both CD27⁺ and CD27⁻ NK cells, as observed in both C57BL/6 and B6.Rag1^{-/-} mice (Figure 3c). This result suggests that B220⁺ NK cells may represent a less differentiated mNK cell subset. Together, the phenotypic characterization of B220⁺ NK cells relative to CD27⁺ and CD27⁻ NK cells hinted that B220⁺ NK cells are indeed of the NK cell lineage, but appear to be a rather less differentiated mNK cell subset that may precede CD27⁺ NK cells in the differentiation pathway.

B220⁺ NK cells are immediate precursors to mNK cell subsets

To determine whether B220⁺ NK cells are able to functionally mature *in vivo*, we performed *in vivo* transfer experiments with sorted B220⁺ NK cells (Figure 4a). Five days after transfer in a C57BL/6 mouse, only 18% of B220⁺ NK cells had maintained a high level of B220 expression (Figure 4b, top). Moreover, whereas B220⁺ NK cells are mostly CD27⁺ and CD43⁻ (Figure 3b, c), nearly half of the transferred B220⁺ NK cells had lost CD27 expression and acquired CD43 expression in agreement with functional maturation (Figure 4b, top). This phenotype was further accentuated with time, such that at 15 days post-transfer, fewer than 10% of B220⁺ NK cells retained B220 expression and had begun to lose CD11c expression (Figure 4b, bottom). By 25 days post-transfer, all B220⁺ NK cells had completely lost B220 expression and exhibited a CD11c^{neg/low}CD11b⁺CD27⁻ phenotype (supplemental Figure 6) [15]. Of note, the phenotypic changes in B220⁺ NK cells upon *in vivo* transfer were not attributed to antibody ligation of B220 (data not shown). Similar results were obtained upon transfer of B220⁺ NK cells in B6.Rag1^{-/-} mice, where most cells had lost B220 expression and at least a quarter of the cells acquired a most functionally mature CD11b⁺CD27⁻ mNK cell phenotype, along with higher levels of CD43 (Figure 4c). In summary, upon transfer, B220⁺ NK cells rapidly lose

B220 expression and acquire phenotypic characteristics of more mature NK cells. These results strongly suggest that B220⁺ NK cells precede B220⁻ mNK cells in the NK cell maturation pathway. Moreover, a continuous BrdU-labelling experiment demonstrated that B220⁺ NK cells presented with the highest level of incorporation of BrdU at any given time point, followed by CD27⁺ and subsequently CD27⁻ NK cells (Figure 5a). The high cycling potential of B220⁺ NK cells is supported by their larger cell size, as depicted by the forward scatter histograms (Figure 5b). Together, these data support a model wherein B220⁺ NK cells represent an immediate precursor to B220⁻ mNK cell subsets and, thus, precede CD27⁺ NK cells in at least one differentiation pathway.

The transcriptome profiles present B220⁺ NK cells as a rapidly dividing distinct NK cell subset with close homology to CD27⁺ NK cells

B220⁺ NK cells differ only modestly in phenotype from CD27⁺B220⁻ mNK cells (Figure 3). To further delineate the relationship between B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cells, we subjected the three cell subsets to a transcriptome analysis. We opted to isolate B220⁺ NK cells from the spleen of B6.Rag1^{-/-} mice as the proportion of B220⁺ NK cells was significantly enhanced relative to C57BL/6 mice, facilitating their isolation (Figure 6a, supplemental Figure 1). For sake of comparison, CD27⁺ and CD27⁻ NK cells were also isolated from B6.Rag1^{-/-} mice (Figure 6a). The Rag-deficiency did not affect mNK cell function, as demonstrated by their ability to efficiently lyse YAC-1 cells (Figure 6b). A hierarchical cluster analysis of the differentially expressed genes demonstrated a close relationship between B220⁺ NK cells and CD27⁺ NK cells, where the transcriptome profile of CD27⁻ NK cells diverged considerably from the two other subsets (Figure 6c, d). These results confirm that B220⁺ NK cells are more closely related to CD27⁺ NK cells than CD27⁻ NK cells. Moreover, and as expected, all three subsets exhibited a similar level of mRNA expression for genes associated with the NK lineage, in agreement with the protein expression profile depicted in Figure 3 (supplemental Figure 7a). In addition, the mRNA expression profile of CD27, CD69, Ly108, CD11b and CD43 followed their expected pattern of expression within the respective subsets (Figure 3 and supplemental Figure 7b).

To discern the specific transcriptome profile of B220⁺ NK cells relative to both CD27⁺ and CD27⁻ NK cells, we subsequently performed a DAVID functional enrichment analysis of genes included in clusters VI and VII, wherein B220⁺ NK cells present with a higher level of specific mRNA expression relative to both CD27⁺ and CD27⁻ NK cells. The DAVID analysis highlighted enrichment in genes associated with cell cycle and microtubule organization (Figure 7a). Cell cycle analyses confirmed that B220⁺ NK cells are indeed actively cycling with a greater proportion of cells present in S phase (Figure 7b). Together, these data present B220⁺ NK cells as an actively dividing cell subset preceding the CD27⁺ and CD27⁻ subsets in the differentiation of mNK cells.

2.6 Discussion

In the present study, we redefine B220⁺ NK cells (formerly IKDC) as a novel intermediate in NK cell differentiation. Indeed, we find that upon, *in vivo* transfer, B220⁺ NK cells rapidly lose B220 expression. In contrast, neither CD27⁺ nor CD27⁻ NK cell acquired B220 expression upon *in vivo* transfer, even in the presence of potent activating stimuli, suggesting that B220⁺ NK cells do not arise from the activation of mNK cells. Using the CD45 allotypic marker for cell tracking, we were further able to demonstrate that B220⁺ NK cells adopted an mNK cell phenotype and underwent functional maturation upon *in vivo* transfer. Moreover, we show that B220⁺ NK cells are actively cycling, a characteristic associated with precursor cell populations. Together these results indicate that B220⁺ NK cells are immediate precursor to CD27⁺ NK cells.

Previous reports have suggested that B220⁺ NK cells compose cells of the NK lineage presenting with few, if any, properties in common with the DC lineage [9, 16, 18]. Similarly, we find that B220⁺ NK cells exhibit phenotypic properties similar to both CD27⁺ and CD27⁻ NK subsets. Indeed, B220⁺ NK cells express the NK cell pan-specific marker, NKp46, along with comparable levels of intracellular SAP relative to both mNK subsets, for which the expression has not been observed in DC [38]. In addition, B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cells exhibit a similar level of expression of various SLAM proteins, namely CD84, CRACC and 2B4. Furthermore, the transcriptome profile of B220⁺ NK cells is highly homologous to the CD27⁺ NK cell subset, such that CD27⁺ NK cells exhibit a greater homology to B220⁺ NK cells than to CD27⁻ NK cells. Together, these findings further support the view that B220⁺ NK cells exhibiting the IKDC phenotype are indeed part of the NK lineage, in agreement with previous reports [9, 16, 18].

Yet, the exact lineage relationship of B220⁺ NK cells in relation with other mNK cell subsets had not been extensively examined. It had been proposed that B220 on NK cells merely reflect an activated phenotype [9], as *in vitro* activation of B220⁻ NK cells leads to an up-regulation of B220 expression. We further investigated whether B220 expression discerned a unique NK

cell subset or whether its expression correlated with NK cell activation. Surprisingly, we found that B220⁺ NK cells do not define activated mNK cells *in vivo*. Neither the CD27⁺ nor the CD27⁻ NK cell subset acquired B220 expression upon *in vivo* transfer in steady-state conditions. In addition, B220 expression was not enhanced upon transfer of mNK subsets in Rag1^{-/-} mice, where Rag-deficiency allows a low level of homeostatic proliferation of NK cells [39]. Finally, *in vivo* activation of transferred mNK cell subsets either with poly I:C, which activates mNK cells both directly through IFN α R and indirectly through enhancing the transpresentation of IL-15 [40], or with anti-CD40 treatment [32, 33] still did not promote B220 expression on CD27⁺ and CD27⁻ NK cells. This contrasts with previous *in vivo* experiments wherein a high proportion of B220⁺ NK cells was detected upon activation with either poly I:C or CpG [9]. The discrepancy between these results may be explained by the fact that, in the latter experiment, the effect of poly I:C or CpG was analyzed on total endogenous NK cells, which include a substantial proportion of endogenous B220⁺ NK cells. Indeed, upon adoptive transfer of B220⁺ NK cells, we found that both poly I:C and anti-CD40 treatments enabled B220⁺ NK cells to retain high levels of B220 expression. It is thus possible that *in vivo* stimulation with either poly I:C or CpG might have allowed for the accumulation of endogenous B220⁺ NK cells, as opposed to inducing B220 expression on B220⁻ mNK cells. In agreement with this postulate, we find that, upon activation, the proportion of B220⁺ cells is globally enhanced on total endogenous mNK cells, but not on the transferred B220⁻ NK cells. Still, our results do not preclude the fact that in other inflammatory settings, such as in viral or bacterial infections, mNK cells may be able to up-regulate B220 expression. Nonetheless, our results support the view that B220 may be used as a reliable marker to identify B220⁺ NK cells, in steady state conditions and upon poly I:C or anti-CD40 stimulation, the latter representing two distinct potent modes of NK cell activation.

As B220⁺ NK cells are part of the NK lineage and as B220 expression on NK cells does not reflect the activation status of mNK cells, we aimed to determine the role of B220⁺ NK cells relative to other mNK subsets. We exploited an *in vivo* system because *in vitro* assays for NK cells most often rely on the use of specific cytokines, such as IL-2 and IL-15, which may modulate the expression of various markers including B220 [9, 22]. First and foremost, we demonstrated that B220⁺ NK cells exhibit an immature phenotype relative to mNK cells, in

that they presented with a very low level of CD43 expression and a high level of Ly108. Moreover, upon *in vivo* transfer, we found that B220⁺ NK cells rapidly acquire characteristics of mNK cell subsets, including up-regulation of CD11b and CD43 expression along with a decrease in CD27 expression and complete loss of B220. The rapid turnover of B220⁺ NK cells relative to mNK cells was further supported by the rate of incorporation of BrdU on a population level. Cell precursor populations are often characterized by a high level of cell division. Accordingly, B220⁺ NK cells are highly proliferating, as depicted by their larger cell size, by the enrichment of genes associated with cell cycle in the DAVID analysis and by the highest proportion of cells in S phase in the cell cycle profile. We, thus, define B220⁺ NK cells as rapidly cycling cells relative to mNK cells and immediate precursors to CD27⁺ NK cells in at least one differentiation pathway.

Immune cell types are most often named with regards to the function they exhibit rather than their phenotype. More importantly, B220 expression can be acquired on NK cells upon *in vitro* culture and a low proportion of CD49b⁻ iNK cells also express B220 [9]. As such, the name “B220⁺ NK cell” is imprecise. Thus, we propose to rename B220⁺ NK cells according to their functional attributes, noting the rapidly cycling nature of B220⁺ NK cells as well as their precursor relationship to CD27⁺ NK cells. Consequently, by homology to pre-B cells and pre-DC [41, 42], we suggest that B220⁺ NK cells could be referred to as pre-mNK cells, defined phenotypically as CD3⁻ CD19⁻ CD49b⁺ CD122⁺ NKp46⁺ CD11c^{low} B220⁺ CD27⁺ CD11b^{low} cells, in relation to its mNK cell lineage.

Where do pre-mNK cells fit along the NK cell maturation pathway? The first step in NK cell differentiation occurs in the bone marrow, where NKP cells are thought to differentiate into iNK cells. Interestingly, a low proportion of iNK cells express B220 [9]. We suggest that B220 expression by iNK cells occurs en route to becoming a B220⁺ pre-mNK cell. Indeed, pre-mNK cells express CD49b, in agreement with a more mature NK cell phenotype than CD49b⁻ iNK cells, thus placing pre-mNK cells downstream of iNK cells in at least one of the NK cell differentiation pathways. The pre-mNK cells then differentiate into B220⁻CD27⁺ NK cells and subsequently into the CD27⁻ NK cell subset. A notable argument against a direct route from NKP to iNK to pre-mNK to mNK cells comes from the study of bone marrow

progenitors, where mNK cells and pre-mNK cells were shown to arise from different bone marrow progenitors [19]. Indeed, Welner et al showed that pre-mNK cells, which they referred to as IKDC, were efficiently generated from L-selectin⁺ lymphoid progenitors (LSP), whereas NK cells were efficiently produced from LSP, early lymphoid progenitors (ELP) and common lymphoid progenitors (CLP) [19]. However, most recently, a parallel pathway of thymic NK cell differentiation has been described [43, 44]. It is, thus, possible that ELP and CLP migrate to the thymus and generate thymic-derived CD127⁺ NK cells, while LSP would generate pre-mNK cells. In that regard, it should be noted that CD11b⁻CD27⁻ NK cells may be of thymic origin as they are shown to precede the CD11b^{low}CD27⁺ phenotype in the functional maturation pathway, express CD127 and appear to be absent in B6.Rag1^{-/-} mice (Figure 3b) [5, 44]. Moreover, Fathman et al [4] have recently shown that intrathymic injection of NKP, or even earlier NK committed precursors termed pre-NKP, does not yield mNK cells, further supporting two distinct differentiation pathways for NK cells; a thymic-dependent and a thymic-independent pathway. Additional mouse models, wherein NK cell differentiation is impeded at different stages, are needed to decipher the sequential steps of NK cell differentiation, as well as to define the molecular underpinnings of this differentiation process. To that effect, an accumulation of B220⁺ NK cells has been documented in three different gene-targeted mouse models, including Gata3-, Tbet- and Bcl11b-deficient mice [45, 46]. The exact pathway by which these and other transcription factors promote the accumulation of pre-mNK cells remains to be defined.

In addition to gene-targeted mouse models, we have previously shown that the proportion of pre-mNK cells is regulated, at least in part, by genetic polymorphisms encoded within the distal region of mouse chromosome 7 [34]. Of interest, five mouse cancer QTLs (<http://tumor.informatics.jax.org>) and at least five of the QTLs linked to the most frequent human cancers are syntenic to this same distal region of mouse chromosome 7 [47-49]. As pre-mNK cells exhibit a prominent anti-tumoural potential [14, 20, 21], it is tempting to speculate that genes defining the proportion of pre-mNK cells also contribute towards defining cancer susceptibility. Indeed, on a per cell basis, the *in vivo* anti-tumoural activity of pre-mNK cells is more efficient than mNK cells [14, 16, 20-22], likely due to the fact that, as an immediate precursor population, pre-mNK cells can generate a vast number of mNK cells.

Alternatively, pre-mNK cells may themselves exhibit a unique and prominent anti-tumoural potential. Additional studies are required to fully grasp the anti-tumoural potential of pre-mNK cells, which may have broad applications in the application of cancer immunotherapy.

2.7 Acknowledgments

The authors wish to thank Ms. Guyon and the animal house staff for curating the mouse colonies and Dr. Labrecque, Dr. Guimond and Ms. Hillhouse for critical review of the manuscript. FGD is a recipient of a CIHR PhD scholarship, SL holds a CHIR New Investigator scholarship. AV is funded by CIHR and CCSRI. SL is funded by the Foundation of the Maisonneuve-Rosemont Hospital and NSERC.

2.8 References

1. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.
2. Huntington ND, Vosshenrich CA, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(9):703-14.
3. Rosmaraki EE, Douagi I, Roth C, Colucci F, Cumano A, Di Santo JP. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* 2001; 31(6):1900-9.
4. 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.
5. 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.
6. Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 2002; 3(6):523-8.
7. Yu J, Wei M, Mao H, *et al.* CD94 defines phenotypically and functionally distinct mouse NK cell subsets. *J Immunol* 2009; 183(8):4968-74.
8. Moretta A, Poggi A, Pende D, *et al.* CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* 1991; 174(6):1393-8.
9. Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, Goff OR, Corcuff E, Mandelboim O, Di Santo JP. CD11cI α B220 $^{+}$ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 2007.
10. Montel AH, Bochan MR, Hobbs JA, Lynch DH, Brahmi Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol* 1995; 166(2):236-46.
11. Sague SL, Tato C, Pure E, Hunter CA. The regulation and activation of CD44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24(5):301-9.
12. Nakayama M, Takeda K, Kawano M, Takai T, Ishii N, Ogasawara K. Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4 $^{+}$ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(45):18360-5.
13. Chan CW, Crafton E, Fan HN, *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006; 12(2):207-13.
14. Taieb J, Chaput N, Menard C, *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12(2):214-9.
15. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005; 6(6):600-7.
16. Caminschi I, Ahmet F, Heger K, *et al.* Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* 2007.

17. Vremec D, O’Keeffe M, Hochrein H, Fuchsberger M, Caminschi I, Lahoud M, Shortman K. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 2007; 109(3):1165-73.
18. Blasius AL, Barchet W, Cella M, Colonna M. Development and function of murine B220+CD11c+NK1.1+ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* 2007.
19. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun XH, Kee BL, Kincade PW. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDC) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kitHiCD62L+ lymphoid progenitors. *Blood* 2007.
20. 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. *J Immunol* 2008; 181(9):6654-63.
21. Himoudi N, Yan M, Bouma G, *et al.* Migratory and antigen presentation functions of IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* 2009; 69(16):6598-606.
22. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, *et al.* Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions. *J Immunol* 2008; 180(12):7887-97.
23. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975; 66(1):188-93.
24. McDivitt RW, Stone KR, Craig RB, Palmer JO, Meyer JS, Bauer WC. A proposed classification of breast cancer based on kinetic information: derived from a comparison of risk factors in 168 primary operable breast cancers. *Cancer* 1986; 57(2):269-76.
25. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3:Article3.
26. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, *et al.* TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006; 411:134-93.
27. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4(5):P3.
28. Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, *et al.* CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol* 2008; 180(6):3739-45.
29. Silva A, Andrews DM, Brooks AG, Smyth MJ, Hayakawa Y. Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *Int Immunol* 2008; 20(4):625-30.
30. Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 2006; 176(3):1517-24.
31. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J Immunol* 2004; 172(2):864-70.
32. Uhlig HH, McKenzie BS, Hue S, *et al.* Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity* 2006; 25(2):309-18.
33. Zhang M, Yao Z, Dubois S, Ju W, Muller JR, Waldmann TA. Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(18):7513-8.
34. Guimont-Desrochers F, Cappello ZJ, Chagnon M, McDuffie M, Lesage S. Cutting edge: Genetic characterization of IFN-producing killer dendritic cells. *J Immunol* 2009; 182(9):5193-7.

35. Rolink A, ten Boekel E, Melchers F, Fearon DT, Krop I, Andersson J. A subpopulation of B220+ cells in murine bone marrow does not express CD19 and contains natural killer cell progenitors. *J Exp Med* 1996; 183(1):187-94.
36. Peck SR, Ruley HE. Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* 2000; 52(1-2):63-72.
37. Zhong MC, Veillette A. Control of T lymphocyte signaling by Ly108, a signaling lymphocytic activation molecule family receptor implicated in autoimmunity. *J Biol Chem* 2008; 283(28):19255-64.
38. Veillette A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6(1):56-66.
39. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med* 2003; 197(8):967-76.
40. Beuneu H, Deguine J, Bouvier I, Di Santo JP, Albert ML, Bousso P. A dual role for type I IFNs during polyinosinic-polycytidylic acid-induced NK cell activation. *J Immunol* 2011; 187(5):2084-8.
41. Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:595-621.
42. Naik SH, Sathe P, Park HY, *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007; 8(11):1217-26.
43. Luther C, Warner K, Takei F. Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127+ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways. *Blood* 2011; 117(15):4012-21.
44. Vosshenrich CA, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villeger SI, *et al.* A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* 2006; 7(11):1217-24.
45. Li L, Leid M, Rothenberg EV. An Early T Cell Lineage Commitment Checkpoint Dependent on the Transcription Factor Bcl11b. *Science* 2010; 329(5987):89-93.
46. Vosshenrich CA, Samson-Villeger SI, Di Santo JP. Distinguishing features of developing natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 2005; 17(2):151-8.
47. Easton DF, Eeles RA. Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* 2008; 17(R2):R109-15.
48. Chung CC, Magalhaes WC, Gonzalez-Bosquet J, Chanock SJ. Genome-wide association studies in cancer--current and future directions. *Carcinogenesis* 2010; 31(1):111-20.
49. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(23):9362-7.

2.9 Figures

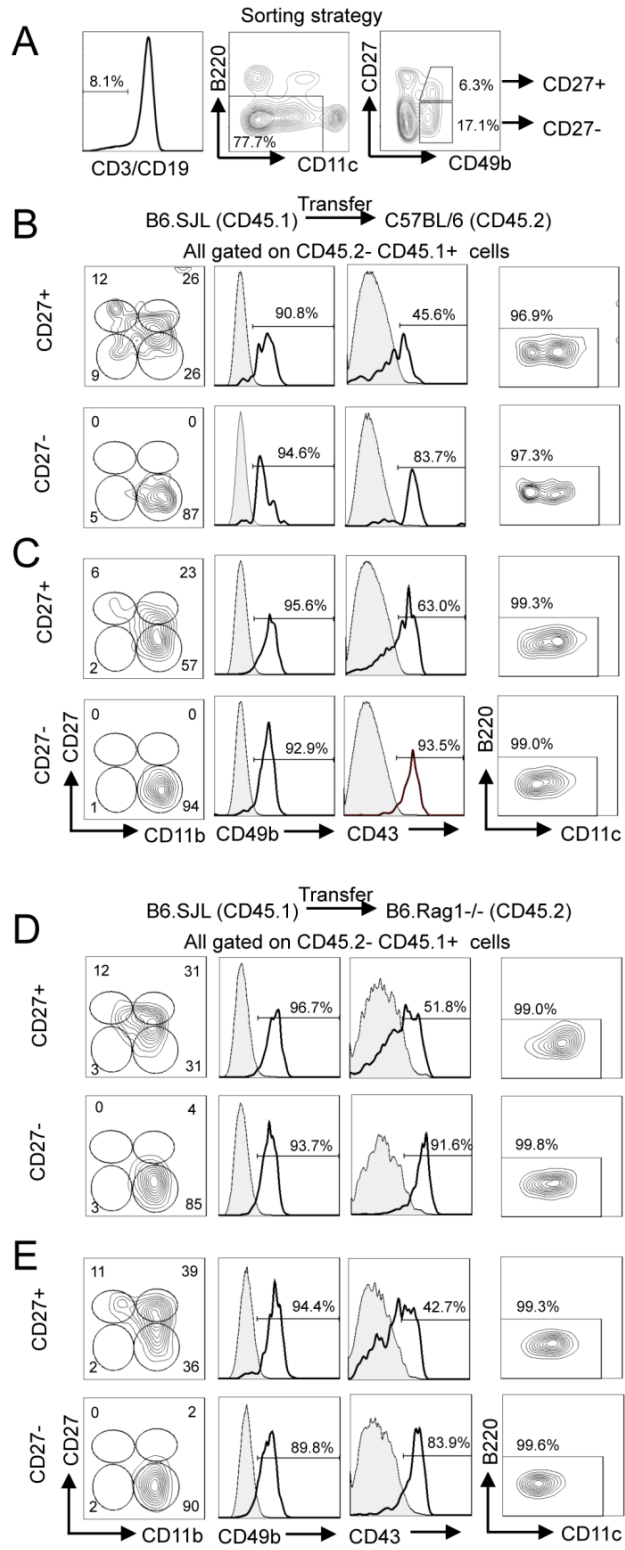


Figure 1. mNK cells do not acquire B220 expression *in vivo*

(A) Gating strategy used to sort mNK cell subsets from the spleen of B6.SJL mice. Sorted cells are CD3⁻ CD19⁻ CD11c^{-low} B220⁻ CD49b⁺ and either CD27⁺ or CD27⁻. Cell purity was routinely above 93% for each cell type. (B-E) The CD27⁺ and CD27⁻ mNK cell subsets sorted from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice were adoptively transferred into (B,C) C57BL/6 (CD45.2) mice or (D, E) B6.Rag1^{-/-} (CD45.2) through tail vein injections. The spleen cells were analyzed (B, D) 5 and (C, E) 15 days after transfer. The expression of CD11b, CD27, CD49b, CD43, CD11c and B220 on CD45.1⁺ CD45.2⁻ transferred cells is shown. Bold histograms represent the level of expression of CD49b or CD43 marker on the indicated cell population. Shaded histograms represent the expression level of CD49b on host B cells (B,C) or on host dendritic cells (D,E). Shaded histograms represent the expression level of CD43 on host B cells (B,C) or on host CD11c^{low}B220⁺CD11b⁻ (D,E). Results are representative of at least 3 independent experiments.

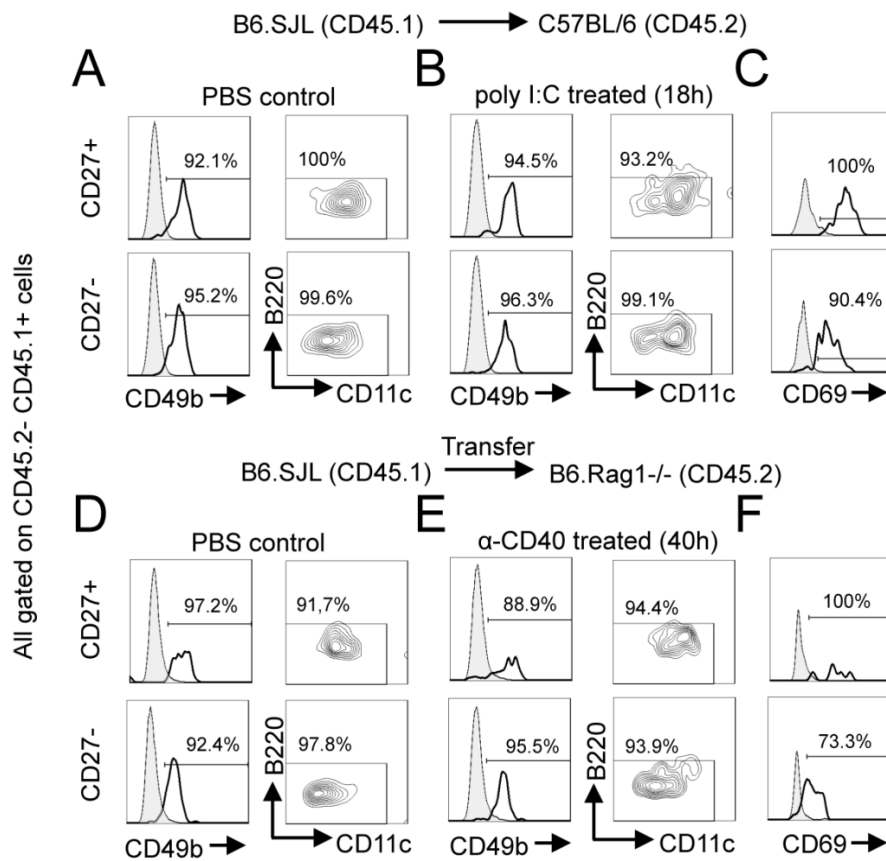


Figure 2. B220 is not up-regulated on mNK cells even upon *in vivo* activation

CD27⁺ and CD27⁻ mNK cell subsets sorted from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice were adoptively transferred into C57BL/6 (CD45.2)(A-C) or B6.Rag1^{-/-} (CD45.2)(D-F) mice through tail vein injections. The following day, mice were injected i.p. with PBS (A, D), poly I:C (B) or with anti-CD40 antibody (E). The expression of CD49b, CD11c and B220 was analysed on CD45.1⁺ CD45.2⁻ cells 18h following poly I:C injection (A, B) or 40h following anti-CD40 antibody injection (D, E). (C, F) CD69 expression is depicted on CD45.1⁺ CD45.2⁻ cells from PBS injected (grey filled) or poly I:C or anti-CD40 treated (bold) mice. Results are representative of at least 3 independent experiments.

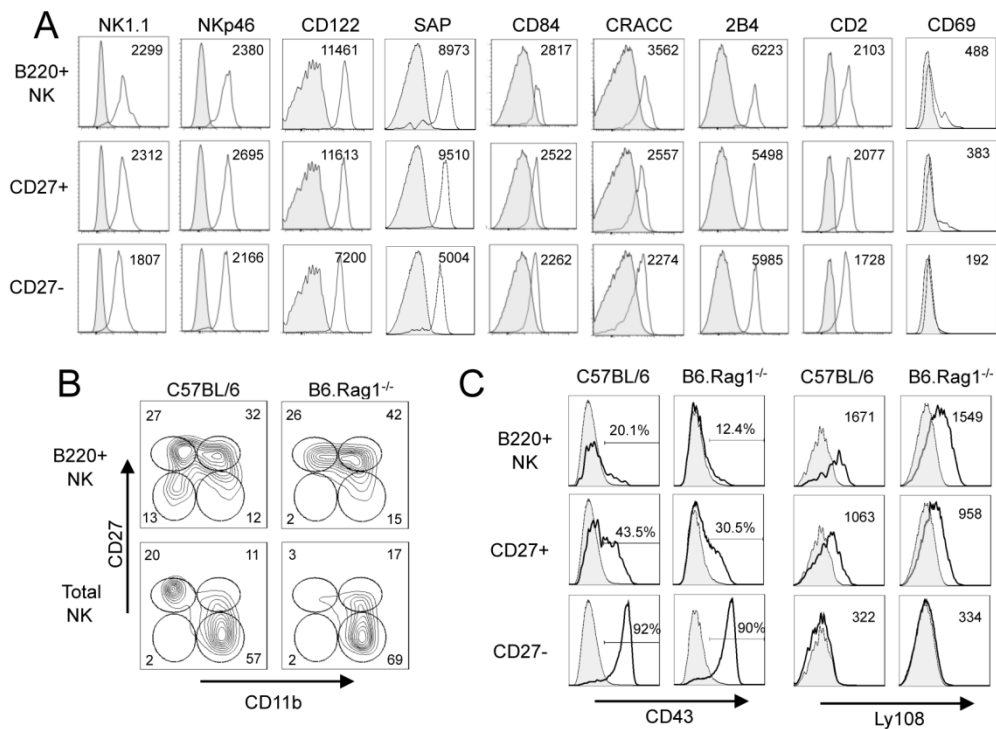


Figure 3. B220⁺ NK cells are phenotypically similar but not identical to mNK cells

(A) The level of expression of various NK cell markers from C57BL/6 mice gated on B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets is depicted. The mean fluorescence intensity is indicated. (B) Expression of CD11b and CD27 expression on B220⁺ NK cells and total CD49b⁺CD11c^{low/-}B220⁻ NK cells from both C57BL/6 and B6.Rag1^{-/-} mice is shown. (C) Expression of NK cell maturation markers, namely CD43 and Ly108, on B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets from C57BL/6 and B6.Rag1^{-/-} mice is shown. Results are representative of at least 3 independent experiments.

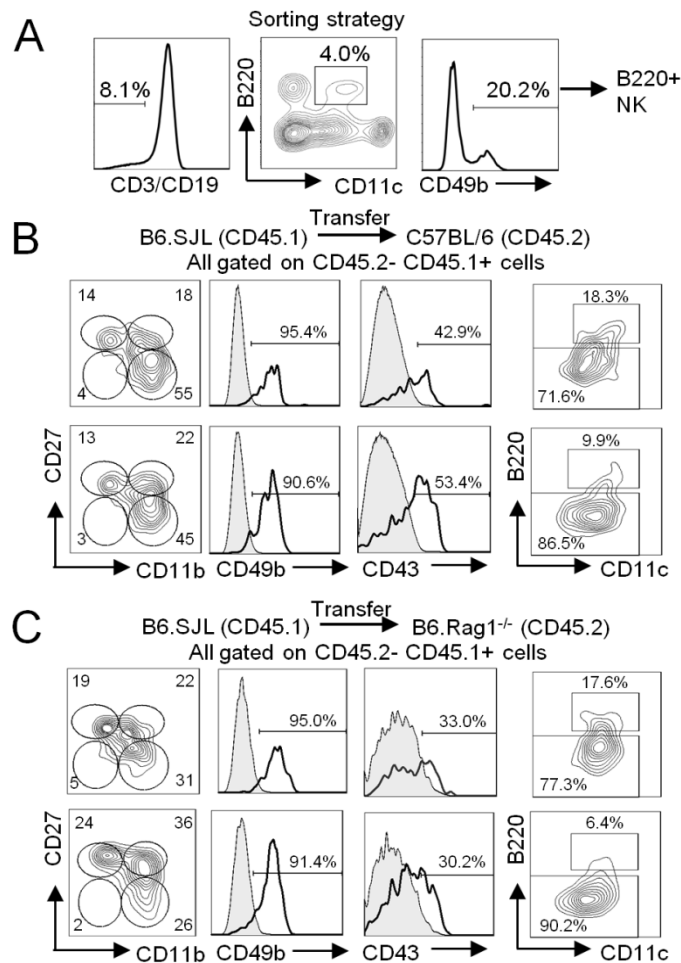


Figure 4. B220⁺ NK cells acquire a mNK cell phenotype upon *in vivo* transfer

(A) Gating strategy used to sort B220⁺ NK cells from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice. Sorted cells are CD3⁻ CD19⁻ CD11c^{low} B220⁺ CD49b⁺. Cell purity was routinely above 90%. B220⁺ NK cells sorted from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice were adoptively transferred into (B) C57BL/6 (CD45.2) or (C) B6.Rag1^{-/-} (CD45.2) mice through tail vein injections. The spleen cells were analyzed 5 (top panels of B and C) and 15 (lower panels of B and C) days after transfer. The expression of CD11b, CD27, CD49b, CD43, CD11c and B220 on CD45.1⁺CD45.2⁻ transferred cells is shown. Results are representative of at least 3 independent experiments.

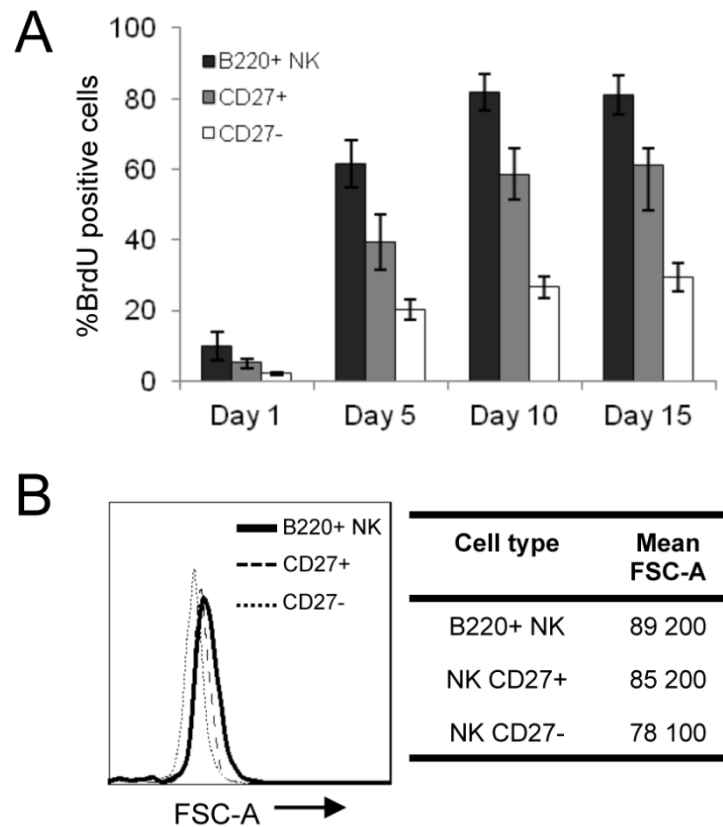


Figure 5. B220⁺ NK cells are highly cycling relative to mNK cells

(A) The mean percentage of BrdU incorporation upon continuous labelling is shown for B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets. One of three representative experiments is shown, with 4 mice/group. (B) Cell size is depicted in the histogram for sorted B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cells. The mean FSC-A is indicated for each NK cell subset. Results are representative of at least 3 experiments.

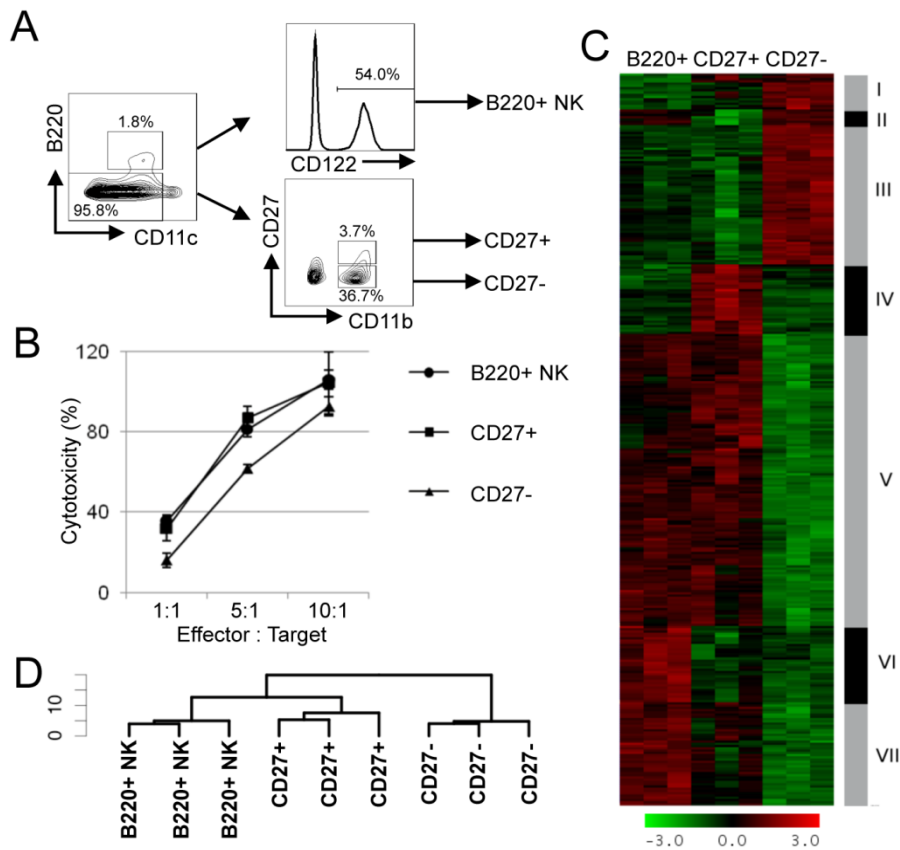


Figure 6. B220⁺ NK cells exhibit close homology to CD27⁺ NK cells

(A) Gating strategy for sorting B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets from the spleen of B6.Rag1^{-/-} mice. B220⁺ NK cells are selected as CD11c^{low}B220⁺CD122⁺ cells, while CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets are CD11c^{low}B220⁻CD122⁺ cells and are further separated according to CD27 expression. (B) The function of B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets from B6.Rag1^{-/-} mice is depicted by their cytotoxic activity towards ⁵¹Cr-labelled YAC-1 cells. The percent-specific lysis is shown for B220⁺ NK cells (round), CD27⁺ NK cells (square) and CD27⁻ NK cells (triangle). Results are representative of at least 3 experiments. (C and D) Hierarchical clustering of differentially expressed genes among B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK cell subsets. 326 genes with an adjusted p-value smaller than 0.05 and an absolute fold change greater than 1.5 in any of the two comparisons (CD27⁺ vs B220⁺; CD27⁻ vs B220⁺) were considered differentially expressed. Shown in panel (C) is the gene clustering heatmap with the red-green scale presenting the z-transformed intensities where red represents a relative increase in expression and green represents a relative decrease. Panel (D) represent a sample clustering dendrogram from data in (C).

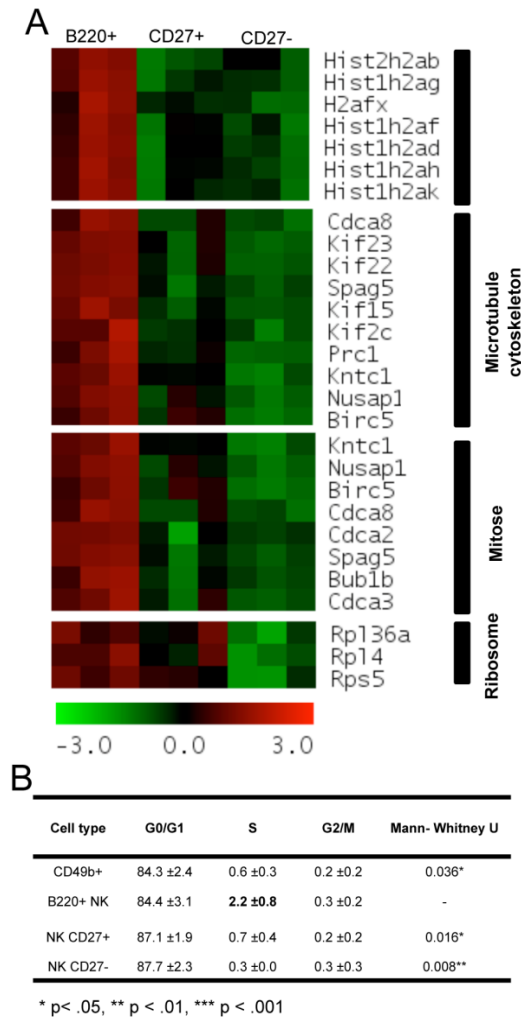


Figure 7. B220⁺ NK cells are actively cycling

(A) Heatmap of the mRNA expression of the genes from clusters VI and VII upon DAVID Functional Enrichment analysis, wherein higher mRNA expression was observed in B220⁺ NK cells relative to both CD27⁺ and CD27⁻ NK cells. Z-transformed intensities are visualized by a red-green color scale where red represents a relative increase in expression and green a relative decrease. (B) Cell cycle analysis was performed on B220⁺, CD27⁺ and CD27⁻ NK, as well as total CD49b⁺ NK cells sorted from the spleen of C57BL/6 mice. The percentage of cells in each phase on the cell cycle is represented. Mann-Whitney U was applied to obtain *p* values when comparing B220⁺ NK cells to other cell types. n=5.

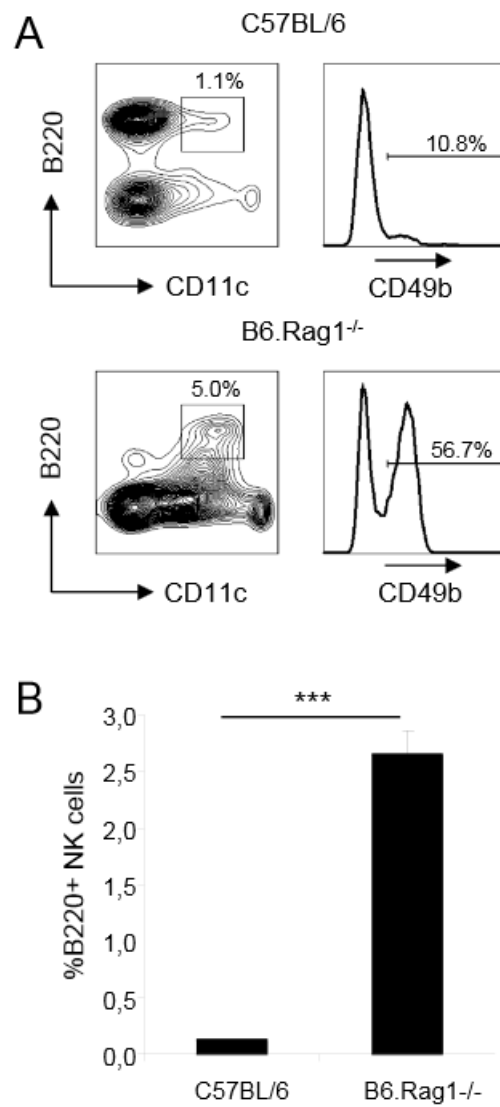


Figure S1. B220⁺ NK cell percentage is increased in B6.Rag1^{-/-} mice.

(A) The percentage of *ex vivo* B220⁺ NK cells in the spleen of C57BL/6 (upper panel) or B6.Rag1^{-/-} (lower panel) mice is shown. B220⁺ NK cells are gated as CD11c^{low} B220⁺ CD49b⁺ cells. (B) Mean percentage of B220⁺ NK cells in the spleen. n=3, *** p < 0.001.

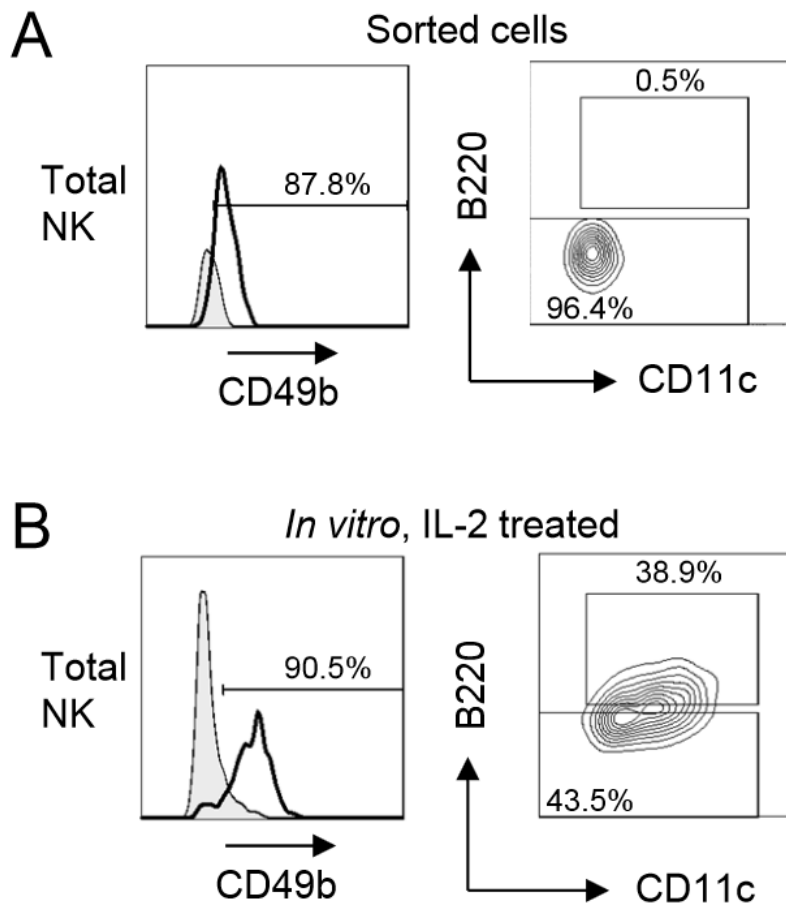


Figure S2. *In vitro* cultured NK cells show an increase in B220⁺ expression.

(A) The phenotype of sorted CD11c⁻ B220⁻ CD49b⁺ NK cells is shown. (B) Sorted NK cells cultured for 3 days with 1000U/ml IL-2 at 37 °C. The expression of CD49b, CD11c and B220 post-culture is shown. n=2.

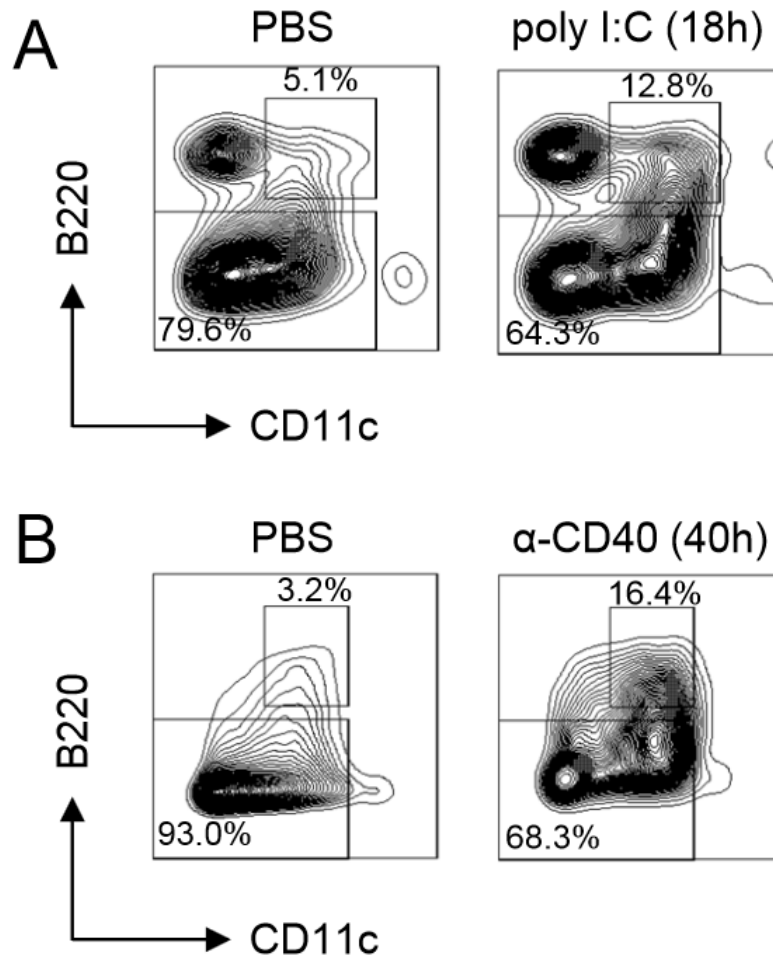


Figure S3. An increased proportion of total endogenous NK cells expressing B220 following *in vivo* stimulation.

(A) C57BL/6 or (B) B6.Rag1^{-/-} mice were injected i.p. with PBS (A and B, left panels), poly I:C (A, right panel) or anti-CD40 antibody (B, right panel). The expression of CD11c and B220 was assessed in CD49b⁺ spleen cells 18h following poly I:C injection (A) or 40h following anti-CD40 antibody injection (B). Results are representative of at least 3 independent experiments.

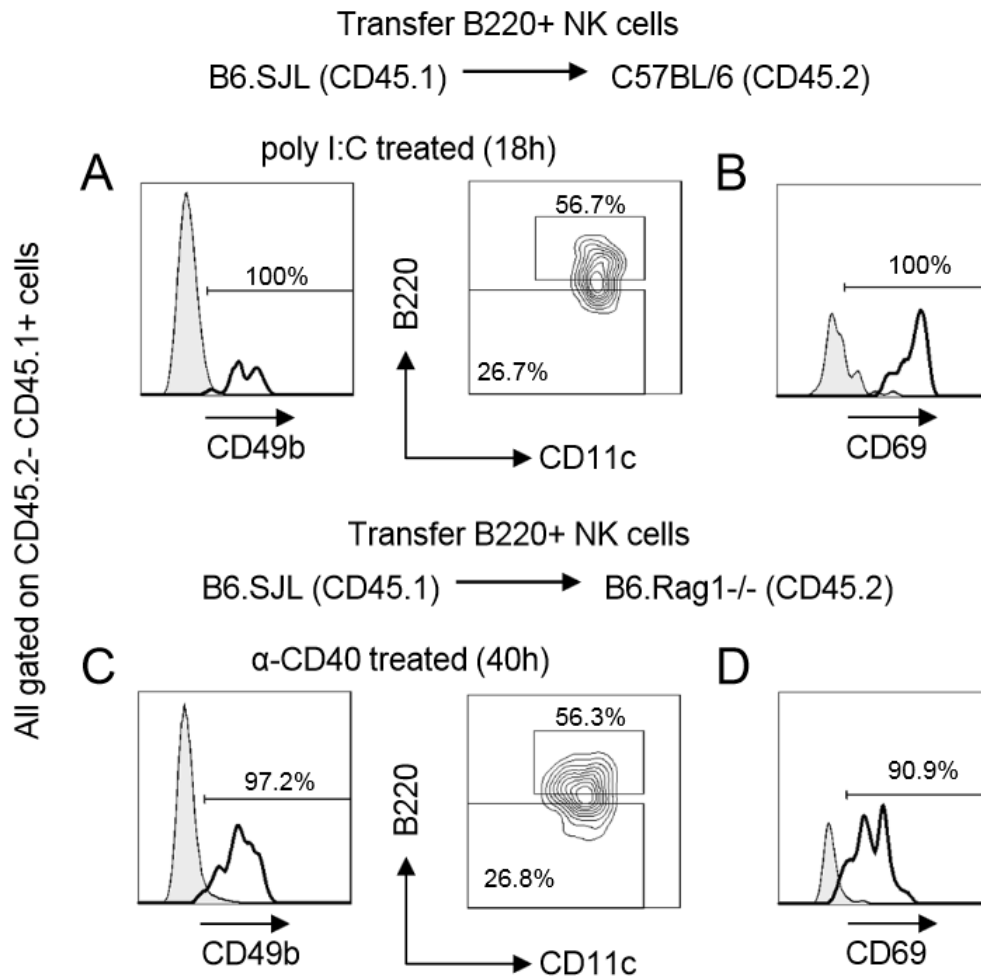


Figure S4. *In vivo* stimulated B220⁺ NK cells maintain high levels of B220.

B220⁺ NK cells were sorted from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice and adoptively transferred into (A, B) C57BL/6 (CD45.2) or (C, D) B6.Rag1^{-/-} (CD45.2) mice through tail vein injections. The following day, C57BL/6 mice were injected i.p. with poly I:C and B6.Rag1^{-/-} mice were injected i.p. with anti-CD40 antibody. Eighteen hours following poly I:C injection (A, B) or 40h following anti-CD40-treatment (C, D), mice were sacrificed and the expression of CD49b, CD11c and B220 was assessed on the CD45.1⁺ CD45.2⁻ transferred cells. CD69 expression is depicted on CD45.1⁺ CD45.2⁻ cells from PBS-injected (grey filled histograms) and poly I:C or anti-CD40-treated (bold) mice. Results are representative of 3 independent experiments.

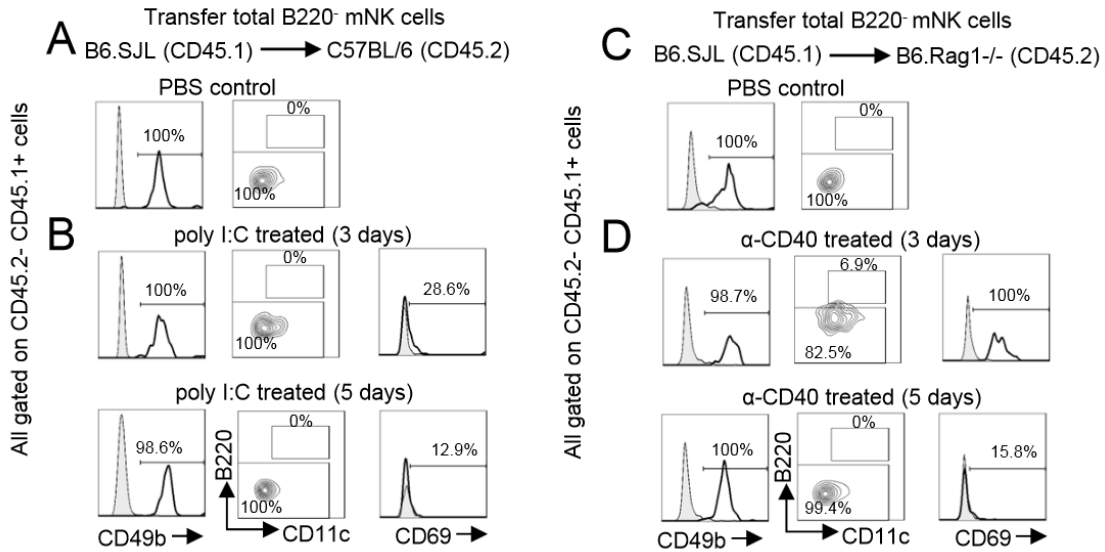


Figure S5. B220 is not up-regulated on mNK cells at late time points upon *in vivo* activation

Total B220⁻ mNK cells (CD3⁻ CD19⁻ CD11c^{neg/low} B220⁻ CD49b⁺) sorted from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice were adoptively transferred into C57BL/6 (A-B) and B6.Rag1^{-/-} (C,D) (CD45.2) mice through tail vein injections. The following day, mice were injected i.p. with PBS (A,C), poly I:C (B) or anti-CD40 (D). The expression of CD49b, CD11c and B220 was analysed on CD45.1⁺ CD45.2⁻ cells 3 days or 5 days following activation as indicated. CD69 expression is depicted on total CD45.1⁺ CD45.2⁻ cells from PBS-injected (grey filled histogram) and (B, bold) poly I:C-treated or (C, bold) anti-CD40-treated mice. Results are representative of at least 3 independent experiments.

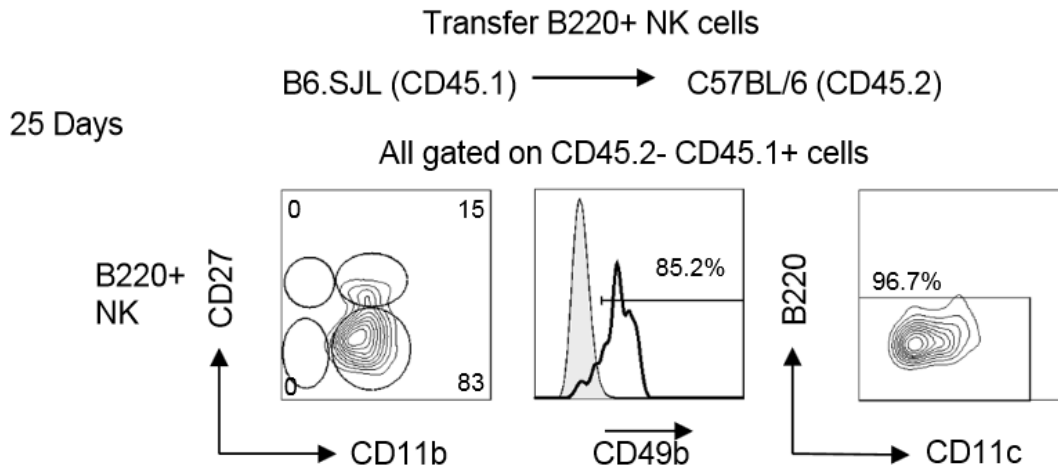


Figure S6. B220⁺ NK cells lose all B220 expression after 25 days *in vivo*.

(A) Sorted B220⁺ NK cells from the spleen of B6.SJL (CD45.1) mice were adoptively transferred into C57BL/6 (CD45.2) mice through tail vein injections. The transferred cells were tracked 25 days after transfer using CD45.1 and CD45.2 allelic markers. The expression of CD11b, CD27, CD49b, CD11c and B220 on CD45.1⁺CD45.2⁻ transferred cells is shown. Results are representative of 2 experiments.

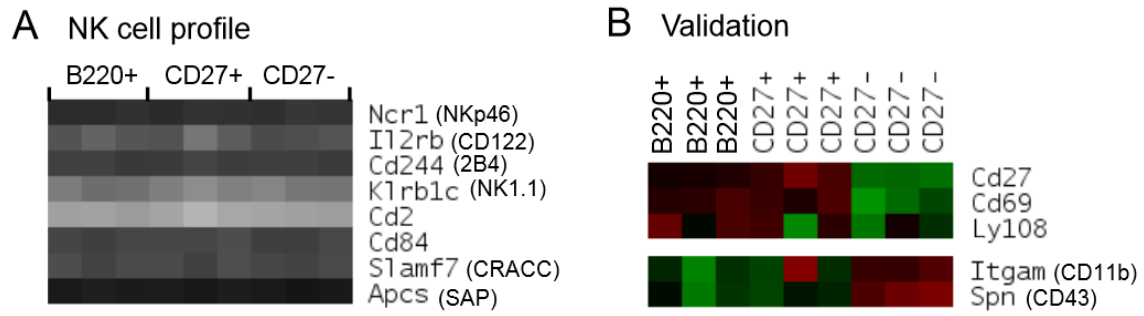


Figure S7. Validation analysis of the transcriptome analysis

(A) Grey scale heatmaps present the normalized log₂ intensities of the expression profile of selected genes associated with NK cells. (B) Heatmaps of the validation genes for B220⁺ NK cells. Red-green color scale heatmaps present z-transformed intensities where red represents a relative increase in expression and green represents a relative decrease.

CHAPITRE 3: ARTICLE 2

3.1 Genetic characterization of interferon-producing killer dendritic cells

Fanny Guimont-Desrochers, Zachary John Cappello, Miguel Chagnon, Marcia McDuffie, Sylvie Lesage

Cet article a été publié dans *The Journal of Immunology* **182**, 5193-5197

Ma contribution à cet article est très importante. J'ai participé au design expérimental avec l'aide de la Dre Sylvie Lesage. J'ai vérifié la proportion d'IKDC dans plusieurs modèles murins et j'ai effectué l'analyse phénotypique des souris F2. La Dre Marcia McDuffie a généré les souris congéniques NOD.Lc7 et son étudiant, Zachary John Cappello, a vérifié la proportion d'IKDC chez ces souris. Miguel Chagnon a réalisé l'analyse statistique de l'étude génétique. J'ai activement participé à l'analyse des résultats, à leur interprétation, à la création des figures, à la rédaction de l'article et à la réponse aux réviseurs. J'évalue ma participation à 85%.

Cet article marque le début de ma recherche du gène qui régule la proportion d'IKDC. En premier lieu, il démontre que les IKDC sont différemment régulés chez les souris ayant des fonds génétiques différents, indiquant que ces cellules sont régulées par des facteurs génétiques. Ensuite, il décrit comment l'étude génétique a été réalisée et les résultats obtenues. Finalement, il révèle que les IKDC sont régulées de façon intrinsèque par un ou des gènes retrouvés sur le chromosome 7 distal.

Genetic characterization of interferon-producing killer dendritic cells

Fanny Guimont-Desrochers*, Zachary John Cappello†, Miguel Chagnon§, Marcia McDuffie†‡, Sylvie Lesage*

* Dept of Microbiology and Immunology, University of Montreal and Maisonneuve-Rosemont Hospital, Research Center.

† Dept. of Microbiology, University of Virginia.

‡ Dept. of Medicine, University of Virginia.

§ Dept. of Mathematics and Statistics, Univeristy of Montreal.

Keywords: Dendritic Cells, Natural Killer Cells, Tumor Immunity

3.2 Abstract

The combined phenotypic expression of CD11c^{low} B220⁺ CD122⁺ DX5⁺ has been used to define a novel cell type, termed interferon-producing killer dendritic cells (IKDC). IKDC readily produce IFN- γ and demonstrate spontaneous cytotoxic activity towards tumors, suggesting that a modulation of IKDC number may be beneficial in cancer treatment. We examined various mouse strains and found that IKDC number was highly variable between the different strains. A linkage analysis associated the distal arm of chromosome 7 with variations in IKDC number. The genetic contribution of chromosome 7 to the regulation of IKDC number was confirmed through the use of congenic mice. We further demonstrate that IKDC proportion is regulated by intrinsic hematopoietic factors. We discuss the role of various candidate genes in the regulation of this newly described cell type and its implication in therapy.

3.3 Introduction

The idea of a dendritic cell type able to trigger cytotoxicity towards MHC-deficient cells and provide antigen presentation to T cells was first presented over ten years ago in a rat model [1]. More recently, two groups clearly identified a cell type carrying phenotypic and functional properties of both NK cell and plasmacytoid dendritic cells (pDC), which was termed interferon-producing killer dendritic cells (IKDC) [2, 3]. On the one hand, as for NK cells, IKDC express various NK cell surface markers such as DX5, are able to mediate cytolysis of MHC class I deficient target cells and produce vast amounts of IFN- γ [4]. On the other hand, as for pDC, IKDC can be distinguished according to CD11c^{low} B220⁺ expression and are able to induce T cell proliferation [2]. IKDC were thus suggested to provide a direct bridge between innate and adaptive immunity through their ability to mediate both cytolysis and antigen-presentation. However, the term “IKDC” has stimulated a debate regarding the lineage relationship of this cell type to DC. Indeed, it was recently demonstrated that IKDC share more similarity with NK cells than DC [4-7]. One group proposes that IKDC are merely activated NK cells [7]. Regardless, recent evidence suggests that IKDC are indeed a cell type distinct from NK cells. Firstly, their bone marrow differentiation proceeds through a unique pathway [8]. Secondly, their ability to respond to IL-15 through trans-presentation differs from NK cells [9]. Finally, their transcriptional profile, although more similar to NK cells than DC, is clearly distinct from the former [10]. Thus, although IKDC may be more closely related to NK cells than DC, they appear to define a distinct subset. For simplicity, we have opted to use “IKDC” to describe the CD11c^{int}B220⁺DX5⁺CD122⁺ phenotype. Further characterization of this phenotype will be required to delineate the relationship between NK and IKDC.

Notwithstanding, the contribution of IKDC in tumor clearance has been clearly observed in various systems. Indeed, IKDC contribute to tumour immunosurveillance via secretion of high levels of IFN- γ and TRAIL-dependent lysis of tumor cells [3, 11]. Therefore, modulating IKDC number may be beneficial in cancer treatment. This prompted us to examine the regulation of IKDC number. We found that each mouse strains carried a set number of IKDC. However, this number was highly variable between strains, where NOD and B10.Br mice

respectively showed the lowest and highest proportion of IKDC. A linkage analysis of F2 generation mice from a B10.Br to NOD outcross associated the regulation of IKDC number to the distal arm of chromosome 7. Moreover, we demonstrate that IKDC number is regulated by intrinsic hematopoietic factors. We discuss potential genes regulating IKDC number which may contribute to the elaboration of novel cancer therapies.

3.4 Materials and Methods

Mice

B10.Br, NOD.*H2k*, F1 (B10.Br x NOD.*H2k*) and F2 (F1 X F1) mice were maintained at Maisonneuve-Rosemont Hospital housing facility. BALB/c, C3H, C57BL/6 and NOR mice were purchased from Jackson Laboratory. NOD.Lc7 mice (formerly designated NOD.DR-4, [12]) were bred in the vivaria at the University of Virginia. 8 to 12 week-old mice were used for phenotypic analyses. F1 (B10.Br x NOD.*H2k*) recipients were irradiated at 11 Gy and left to reconstitute for 8 weeks with 2×10^6 bone marrow cells from B10.Br and NOD.*H2k* at 1:1 ratio. The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee overseen by the Canadian Council for Animal Protection approved all experimental procedures.

Flow cytometry

Spleen and lymph nodes are treated with collagenase (Collagenase of *Clostridium histolyticum*, Type V, Sigma-Aldrich) for 15 minutes at 37°C and passed through a cell strainer. All antibodies were purchased from Biolegend except CD11c (N418)-biotin and B220-FITC which were produced in the laboratory. Data were acquired using a FACSCalibur (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Treestar).

Linkage analysis

Genomic DNA was isolated from the tails of F2 male and female mice by using the DNeasy Blood & Tissue Kit from Qiagen and single nucleotide polymorphisms were determined using the Illumina Mouse Low Density Linkage panel serviced through The Centre for Applied Genomics at The Hospital for Sick Children, Ontario, Canada. The LOD score was obtained through a single QTL model using the library R/qtl of R software (ver 2.6.2). No impact of gender was observed ($p=0.062$ non-parametric, Mann-Whitney).

3.5 Results

Multiple cell surface markers have been used to define IKDC [2-4, 13]. Similar to pDC, IKDC have been best defined by the expression of a low level of CD11c, along with B220 [2, 3]. In addition, they express markers usually associated to NK cells, such as DX5 and CD122 [2, 5]. Figure 1a shows that we can readily identify a subset of cells expressing a CD11c^{low} B220⁺ DX5⁺ CD122⁺ phenotype in both spleen and lymph nodes. These plots demonstrate that not all CD11c^{low} B220⁺ DX5⁺ cells express CD122, while all CD11c^{low} B220⁺ CD122⁺ cells express DX5. Therefore, CD122 was routinely used in the characterization of this cell subset, as it serves as a more specific marker to define this rare cell population.

We next undertook the challenge of defining the genetic factors regulating IKDC number. We examined the proportion and absolute number of IKDC in various mouse strains (Figure 2). Each strain showed a relatively fixed proportion and number of IKDC. However, a high variation of IKDC proportion was noted between mouse strains. For instance, B10.Br and C57BL/6 carried a high number of IKDC, while NOD mice showed a very low IKDC number (IKDC number, B10.Br vs NOD p value $< 1 \times 10^{-4}$). This variation in IKDC number between strains did not correlate with NK cell number (supplemental Figure 1) and suggests that genetic factors determine IKDC number. Alternatively, the reduced IKDC number in NOD mice was possibly due to inflammation associated with autoimmune diabetes predisposition. To verify this hypothesis, we assessed the number of IKDC in NOD mice congenic for the MHC H2^k locus (NOD.H2k). The MHC locus is the major susceptibility factor in NOD mice and thus NOD.H2k mice do not develop diabetes [14]. Yet, NOD and NOD.H2k mice had similar numbers of IKDC (Figure 2). These results suggest that the decrease in IKDC in NOD mice is not a consequence of autoimmune diabetes development. Regardless, NOD.H2k mice still carry all non-MHC genes associated with autoimmune susceptibility, and as for NOD mice, they remain susceptible to other autoimmune diseases [15], which may provide an inflammatory state and influence IKDC number. However, the BALB/c strain is resistant to autoimmune diseases, does not show inflammation and also exhibits a relatively low number of IKDC (Figure 2). Interestingly, these results also demonstrate that IKDC proportion is not

regulated by the MHC locus, as NOD and NOD.*H2k* mice show a comparable number of IKDC. This observation is further supported by the fact that C57BL/6 (*H2^b*) and B10.Br (*H2^k*), which are essentially genetically related bar the MHC, also show a comparable number of IKDC (Figure 2). Further evidence that IKDC number is regulated by genetic factors, came from the evaluation of IKDC proportion in NOR mice. NOR is a NOD-related strain with prominent non-NOD intervals on chromosomes 1, 2, 4, 5, 7, 11, 12, and 18 [16]. As the proportion of IKDC is significantly different between NOD and NOR strains (p value $< 1 \times 10^{-3}$), these results suggests that at least one of the genetic intervals differing between the two strains is responsible for defining IKDC number.

We have determined that IKDC proportion is highest in C57BL/6 and B10.Br strains and lowest in NOD and NOD.*H2k* mice. For linkage analysis, we opted to perform the F2 outcross using B10.Br and NOD.*H2k* mice. These strains were selected for three reasons. First, they showed the highest differential in the proportion of IKDC, allowing for a better segregation of the F2 phenotypes. Second, the results would not be confounded by possible autoimmune diabetes development as NOD.*H2k* mice do not develop diabetes. Finally, both B10.Br and NOD.*H2k* strains carry the same MHC locus and our data indicate that this parameter does not regulate IKDC number.

A linkage analysis was conducted on 106 F2 mice from the B10.Br to NOD.*H2k* outcross. The F2 mice showed a broad distribution of IKDC frequency, suggesting that the trait is multigenic (Figure 3a). Linkage analysis using the Illumina low density platform demonstrated a suggestive linkage on chromosome 7 and a weak association with chromosome 19 (Figure 3b). To confirm the impact of chromosome 7 on the proportion of IKDC, we took advantage of congenic NOD.Lc7 mice which carry C57L alleles on the corresponding chromosome 7 interval (Figure 3c). NOD.Lc7 mice showed a high proportion of IKDC, confirming that this genetic locus regulates the proportion of these cells (Figure 3d).

The interval on chromosome 7 is rather large and carries many potential candidate genes. To determine whether IKDC proportion was regulated by cell-intrinsic hematopoietic factors, which would restrict the candidate gene search, we performed bone marrow chimera

experiments. B10.Br and NOD.*H2k* bone marrow were mixed in a 1:1 ratio in a lethally irradiated F1 (B10.Br x NOD.*H2k*) recipient and left to reconstitute for 8 weeks prior to analysis. Taking advantage of congenic markers for each strain, we found that the B10.Br and NOD.*H2k* bone marrow reconstituted the recipient in relatively equal proportions, although NOD.*H2k* consistently showed a slight advantage (Figure 4, left panel). However, the proportion of IKDC originating from NOD.*H2k* was always reduced in comparison to B10.Br (Figure 4, right panel). These results demonstrate that the proportion of IKDC is regulated by cell-intrinsic hematopoietic factors, thus greatly restricting the list of potential candidate genes.

3.6 Discussion

IKDC have a defined tumoricidal activity [3, 11] and modulation of their numbers may yield important clinical applications. Here, we performed a linkage analysis to define the genetic parameters regulating IKDC number. We have found that the distal portion of chromosome 7 strikingly impacts on the proportion of IKDC. Indeed, both NOD.Lc7 and NOR mice, which are congenic for a C57 genetic region on chromosome 7, show a high proportion of IKDC. Moreover, the proportion of IKDC is regulated within the hematopoietic compartment, greatly restricting the potential candidate gene search. Nevertheless, *IL4ra*, *IL21r*, *IL27*, *CD19*, *LAT* and *Mapk3* form only a short list of the potential candidate genes included within the interval defined by the loci delimiting the congenic interval regulating IKDC proportion in NOD.Lc7: *D7Mit253* and *D7Mit12*. For example, LAT adaptative protein increases human NK cell cytotoxicity [17] and IL21 is known to promote pathogenic Th17 responses as well as to enhance both CD8 and NK cell cytotoxic activity specifically against tumor cells [18]. Comparative gene profiling of IKDC from NOD and NOD.Lc7 will facilitate the identification of the genetic elements controlling this phenotype.

The NOD.Lc7 IKDC number is quite compelling and confirms the linkage results suggesting that the chromosome 7 interval provides the major genetic control of IKDC proportion. However, the broad distribution of IKDC frequencies in F2 mice illustrates that the proportion of IKDC is regulated as a multigenic trait. Moreover, it revealed a suggestive linkage on chromosome 19. Surprisingly, both the chromosome 7 and 19 intervals associate with accrued T cell IL-4 secretion [19]. As IKDC rapidly produce high levels of IFN- γ upon activation, it is unlikely that they promote IL-4 production. Rather, this observation may point to the fact that the relatively large genetic regions identified may not only contribute to IKDC proportion: they may impact various other pathways including resistance to oxidative stress [20]. Moreover, in NOD mice, other genetic regions of chromosome 7 have been shown to impact the inflammatory response [21]. The contribution of these multiple genetic regions towards immune regulation remains to be thoroughly addressed.

In conclusion, NOD mice demonstrate a severe reduction in IKDC number, which can be restored by genetic elements contained within the distal arm of chromosome 7. Interestingly, NOD.SCID or RAG-deficient mice develop thymomas while the SCID and RAG deficiency on other genetic backgrounds does not promote thymic tumor development [22]. It remains to be determined whether restoration of IKDC number in NOD.SCID mice will impact on thymomagenesis. Future work will address whether NOD mice are generally more susceptible to developing multiple types of cancers. Understanding the genetic control of IKDC proportion may help define susceptibility to cancer as well as facilitate the development of novel therapeutic targets.

3.7 Acknowledgments

The authors wish to thank Edward S. Weiss for invaluable help in the interpretations of single nucleotide polymorphism data and Nathalie Labrecque for critical review on the manuscript.

3.8 References

1. Josien R, Heslan M, Soulillou JP, Cuturi MC. Rat spleen dendritic cells express natural killer cell receptor protein 1 (NKR-P1) and have cytotoxic activity to select targets via a Ca²⁺-dependent mechanism. *J Exp Med* 1997; 186(3):467-72.
2. Chan CW, Crafton E, Fan HN, *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* 2006; 12(2):207-13.
3. Taieb J, Chaput N, Menard C, *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12(2):214-9.
4. Vremec D, O’Keeffe M, Hochrein H, Fuchsberger M, Caminschi I, Lahoud M, Shortman K. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 2007; 109(3):1165-73.
5. Blasius AL, Barchet W, Cella M, Colonna M. Development and function of murine B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* 2007.
6. Caminschi I, Ahmet F, Heger K, *et al.* Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* 2007.
7. Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, Goff OR, Corcuff E, Mandelboim O, Di Santo JP. CD11c⁺B220⁺ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 2007.
8. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun XH, Kee BL, Kincade PW. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDC) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit⁺CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood* 2007.
9. Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, *et al.* Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions. *J Immunol* 2008; 180(12):7887-97.
10. Robbins SH, Walzer T, Dembele D, *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 2008; 9(1):R17.

11. 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. *J Immunol* 2008; 181(9):6654-63.
12. McDuffie M. Derivation of diabetes-resistant congenic lines from the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol* 2000; 96(2):119-30.
13. Spits H, Lanier LL. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* 2007; 26(1):11-6.
14. Podolin PL, Pressey A, DeLarato NH, Fischer PA, Peterson LB, Wicker LS. I-E+ nonobese diabetic mice develop insulinitis and diabetes. *J Exp Med* 1993; 178(3):793-803.
15. Damotte D, Colomb E, Cailleau C, Brousse N, Charreire J, Carnaud C. Analysis of susceptibility of NOD mice to spontaneous and experimentally induced thyroiditis. *Eur J Immunol* 1997; 27(11):2854-62.
16. Serreze DV, Prochazka M, Reifsnyder PC, Bridgett MM, Leiter EH. Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene. *J Exp Med* 1994; 180(4):1553-8.
17. Jevremovic D, Billadeau DD, Schoon RA, *et al.* Cutting edge: a role for the adaptor protein LAT in human NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1999; 162(5):2453-6.
18. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT. Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends Immunol* 2008; 29(6):290-4.
19. Choi P, Xanthaki D, Rose SJ, Haywood M, Reiser H, Morley BJ. Linkage analysis of the genetic determinants of T-cell IL-4 secretion, and identification of Flj20274 as a putative candidate gene. *Genes Immun* 2005; 6(4):290-7.
20. Haskins K, Kench J, Powers K, Bradley B, Pugazhenti S, Reusch J, McDuffie M. Role for oxidative stress in the regeneration of islet beta cells? *J Investig Med* 2004; 52(1):45-9.
21. Chen J, Reifsnyder PC, Scheuplein F, *et al.* "Agouti NOD": identification of a CBA-derived Idd locus on Chromosome 7 and its use for chimera production with NOD embryonic stem cells. *Mamm Genome* 2005; 16(10):775-83.

22. Chiu PP, Ivakine E, Mortin-Toth S, Danska JS. Susceptibility to lymphoid neoplasia in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice. *Cancer Res* 2002; 62(20):5828-34.

3.9 Figures and Tables

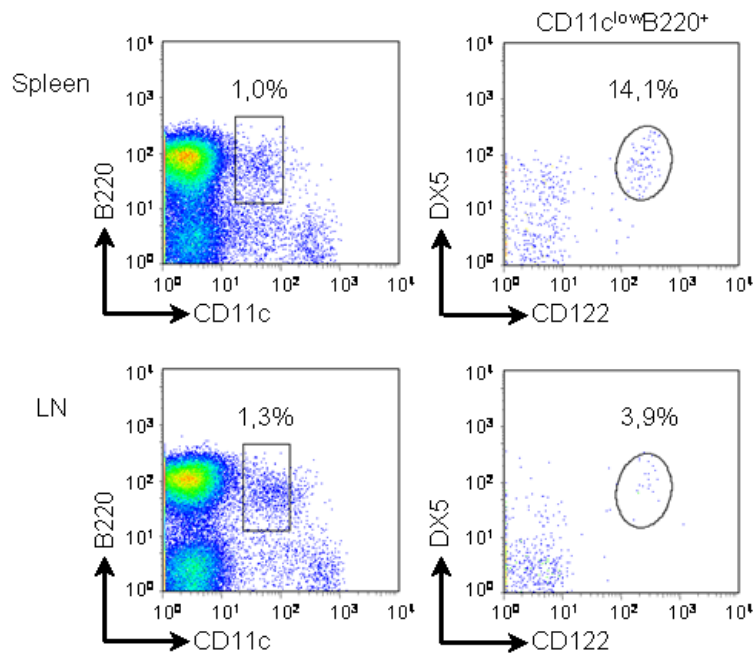


Figure 1. Interchangeable use of CD122 and DX5 to identify IKDC

IKDC are phenotyped according to $CD11c^{low}B220^{+}DX5^{+}CD122^{+}$ cells in both spleen (top) and lymph nodes (bottom).

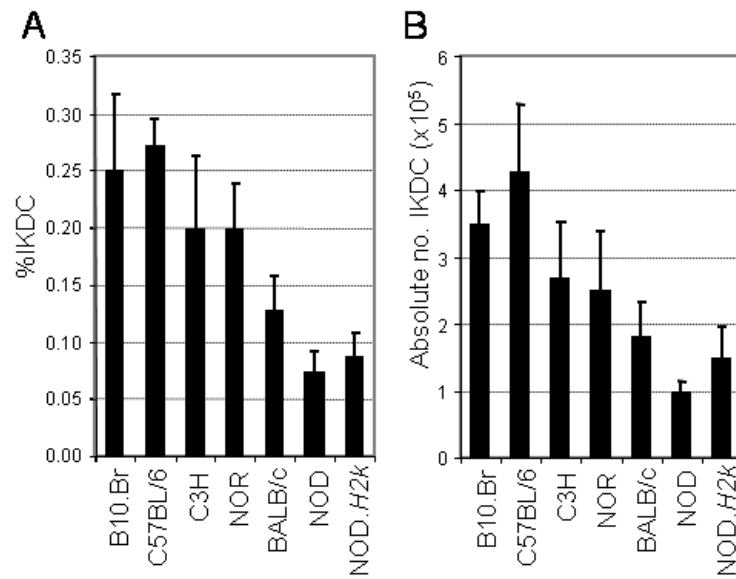


Figure 2. IKDC proportion and number in various mouse strains

(A) The proportion and (B) the absolute number of IKDC (CD11c^{low}B220⁺CD122⁺ cells) in the spleen are shown for the indicated strains of mice. n<3.

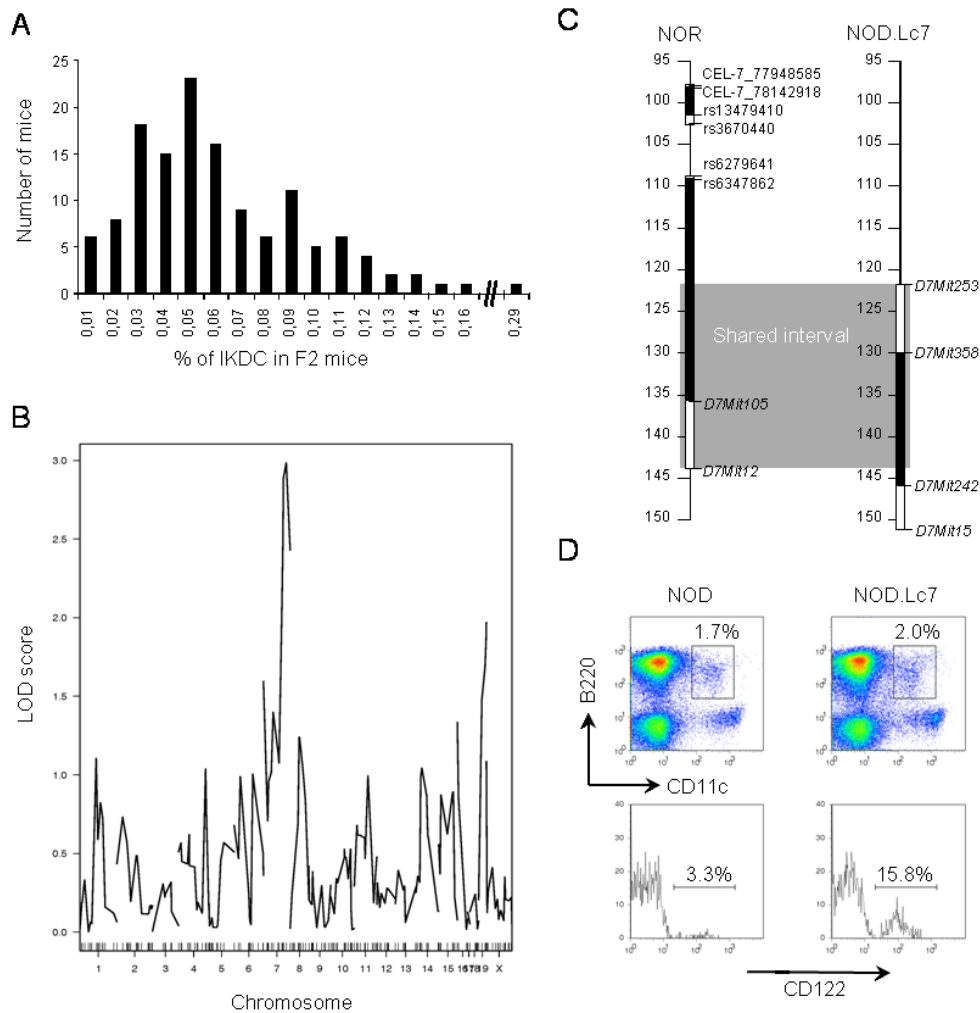


Figure 3. Regulation of IKDC proportion by distal region of chromosome 7

(A) The proportion of IKDC was evaluated in 106 F2 mice. Shown is the distribution of mice for the %IKDC. (B) Logarithm of odds plot for the %IKDC in F2 cohorts is shown. Chr 7, $p < 0.01$ and Chr 19, $p < 0.05$. (C) Schematic representation of the shared diabetes-resistant intervals between NOR and NOD.Lc7 mice. The genetic region is delimited by D7Mit253 and D7Mit12. Marker placement is determined according to the NCBI m37 build. (D) The proportion of IKDC is restored in NOD.Lc7 congenic mice. Data are representative of three experiments.

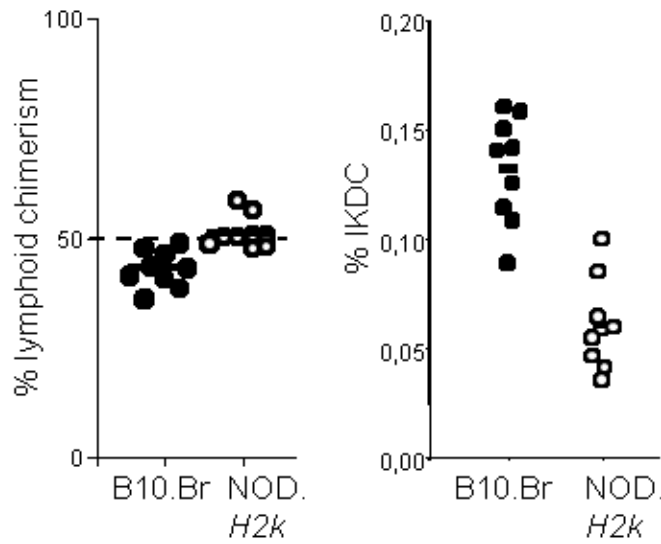


Figure 4. IKDC proportion is dependent on hematopoietic-intrinsic factors CD45.1 and CD45.2 were respectively used to establish the level of bone marrow reconstitution from NOD.H2k and B10.Br mice in the spleen of an F1 recipient (left panel). The proportion of IKDC among all B10.Br or NOD.H2k cells was calculated by gating on CD45.1⁻ or CD45.2⁻ cells, respectively (right panel).

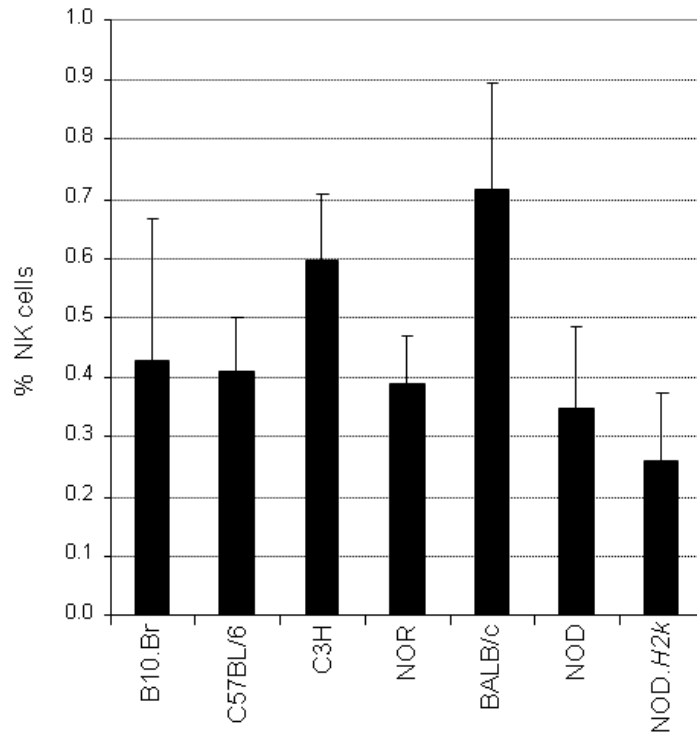


Figure S1. NK cell proportions

The proportion of NK cells (B220- CD3- NKp46+) in the spleen of the indicated mouse strains is shown. n=3

CHAPITRE 4: DISCUSSION

4.1 Les IKDC : Que sont-ils?

Les IKDC ont tout d'abord été identifiées comme des cellules hybrides ayant la particularité de conjuguer un phénotype et des fonctions de pDC et de cellules NK (Tableau 2). Le potentiel fonctionnel conféré par cet ensemble de caractéristiques, partagées normalement par les DC et les cellules NK, deux acteurs importants du système immunitaire, a amené la communauté scientifique à s'intéresser grandement aux IKDC. Ainsi, à la suite de la découverte des IKDC, la recherche sur ces cellules a pris son envol. Plusieurs groupes de recherche se sont ajoutés aux deux équipes responsables de l'identification des IKDC pour étudier la biologie de ces cellules et leurs rôles potentiels dans plusieurs contextes immunologiques. Durant la même période, trois groupes de recherche indépendants tentèrent de reproduire les résultats attribuant des caractéristiques de DC aux IKDC, sans succès. Premièrement, la production d'IFN- α par les IKDC s'est avérée être nulle et probablement attribuable à des pDC contaminantes^{218,235}. Deuxièmement, les IKDC ne sont pas capables d'apprêter un antigène et de présenter des antigènes provenant de différentes sources pour activer la prolifération des lymphocytes T²⁴⁶. Troisièmement, les IKDC expriment un niveau très faible de CMH-II et aucun agent reconnu pour augmenter cette expression ne semble y parvenir efficacement^{235,246}. Quatrièmement, les IKDC ne dépendent pas du FLT3-L pour leur développement et, contrairement aux DC^{235,246}, elles n'expriment pas le facteur de transcription PU.1. Selon ces résultats, les IKDC ne semblent pas partager de caractéristiques avec les DC, ce qui amena plusieurs chercheurs à mettre en doute le caractère hybride des IKDC. En plus de démontrer que les IKDC ne ressemblent pas aux DC, les trois groupes de recherche indépendants ont constaté que les IKDC sont très similaires aux cellules NK. En effet, ils sont parvenus à reproduire les résultats des expériences qui prouvent que les IKDC possèdent des caractéristiques de cellules NK et même, à générer de nouveaux résultats qui renforcent les ressemblances entre ces deux types de cellules. Premièrement, ils ont démontré que les IKDC possèdent un potentiel cytotoxique et une production d'IFN- γ supérieures ou

similaires aux cellules NK, tel que démontré par les données présentées dans les articles ayant découvert les IKDC^{1,234,235,246}. Deuxièmement, le phénotype des IKDC est similaire à celui des cellules NK puisqu'elles expriment plusieurs marqueurs associés à la lignée NK, tels que des récepteurs de la famille des Ly49, des NKG2 et le 2B4^{1,235}. Troisièmement, il fut démontré que les IKDC dépendent de cytokines utilisant la chaîne γ_c , telles que l'IL-15, aussi primordiale pour la différenciation des cellules NK^{103,235}. Ainsi, les IKDC furent considérées comme des cellules appartenant à la lignée NK, sans pouvoir déterminer la relation biologique exacte avec ces cellules.

	cDC	pDC	IKDC	NK Cell
Function				
Perforin-dependent killing	no	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes
IFN- γ	low or no (Vremec et al., 2006)	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes
IFN- α/β	low or no	high	low (Chan et al., 2006)	no or low
IL-12	high	low	yes (Chan et al., 2006)	no
APC	yes	yes	yes, LN; no, spleen (Chan et al., 2006)	no
Antigenic Phenotype				
MHC class II	yes	yes	yes (higher on LN than spleen) (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006)	no (Chan et al., 2006)
CD80 + CD86	yes	yes	yes, LN; no, spleen (Chan et al., 2006)	no (Chan et al., 2006)
CD40	yes	yes	yes, LN; no, spleen (Chan et al., 2006)	no (Chan et al., 2006)
OX40 ligand	yes	yes	?	no (K. Takeda, personal communication)
CD11b	yes	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes (Lanier et al., 1986; Puzanov et al., 1996)
CD11c	yes	yes	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes (Laouar et al., 2005; Schleicher et al., 2005)
B220	no	yes	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes (Puzanov et al., 1996)
Siglec H	no (Blasius et al., 2006)	yes (Blasius et al., 2006)	?	no (Blasius et al., 2006)
PDCA1	no	yes	no (Chan et al., 2006)	no (Chan et al., 2006)
NK1.1	no	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006)	yes
Ly49 ^a	no	no	yes (Chan et al., 2006)	yes
NKG2D	no	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006)	yes
CD49b (DX5)	no	no	yes (Chan et al., 2006; Taieb et al., 2006; Vremec et al., 2006)	yes

^aExcluding Ly49Q

Tableau 2 : Les caractéristiques des IKDC associées aux cDC, aux pDC et aux cellules NK.
Tiré de²⁸⁸.

4.1.1 Des cellules NK activées

En contact avec des agents activateurs, par exemple des cytokines ou des particules microbiennes, les cellules NK deviennent activées. Cette activation crée des changements importants dans la cellule NK et lui confère des caractéristiques différentes de celles observées chez les cellules NK à l'état de base. Entre autres, les aNK augmentent en taille et acquièrent un potentiel fonctionnel amplifié, soit une plus forte production de cytokines et un pouvoir cytotoxique accru⁸⁷. Aussi, les cellules aNK activées *in vitro* augmentent l'expression de plusieurs marqueurs de surfaces, tels que le CD69, le CD44, le FasL, le CMH-II, le CD11c et le B220 (Article 1, Figure S2)¹⁰²⁻¹⁰⁶. Les cellules aNK ont donc un pouvoir fonctionnel plus grand et elles expriment des marqueurs peu ou pas présents sur les cellules NK à l'état de base. De manière intéressante, il a été démontré que les IKDC sont fonctionnellement plus efficaces que les cellules NK et elles expriment des marqueurs que les cellules NK à l'état de base n'expriment pas, tels que le marqueur B220. À la suite de ces observations, il a été suggéré que les IKDC soient des cellules aNK¹⁰³. Cette hypothèse est fort probable, car les similitudes entre les deux cellules sont manifestes. D'ailleurs, puisque les IKDC sont ségréguées des cellules NK, par la présence du marqueur B220 à leur surface cellulaire, l'augmentation de l'expression de B220 sur les cellules aNK permet de suggérer que les IKDC sont des cellules aNK.

Par contre, les données qui relatent une augmentation de B220 ont été obtenues à la suite d'expérimentations *in vitro*. Puisque les résultats des expérimentations *in vitro* ne reflètent pas toujours la réalité, il s'avère essentiel de vérifier si les mêmes résultats seront obtenus *in vivo*. Afin de vérifier cela, nous avons effectué des études de transferts adoptifs (Article 1, Figures 1 et 2). Des cellules NK CD27⁺, fonctionnellement immatures, et des cellules NK CD27⁻, fonctionnellement matures, ont été triées à partir de souris C57BL/6 et transférées chez des souris B6SJL, qui expriment un marqueur allotypique différent, permettant de retrouver les cellules injectées par cytométrie en flux. Contrairement aux résultats obtenus *in vitro*, les cellules NK CD27⁺ et CD27⁻ injectées n'acquièrent pas le marqueur B220 à la suite de leur transfert *in vivo*, au cours d'une période de temps de 5 jours et durant une période de temps qui correspond à leur demi-vie, c'est-à-dire 15 jours (Article 1,

Figure 1). Bien que les cellules NK CD27⁺ transférées n'aient pas acquis l'expression du marqueur B220, elles ont tout de même répondu à des signaux provenant de l'hôte, puisque ces cellules ont augmenté l'expression de CD11b et de CD43, en accord avec leur maturation fonctionnelle. Les cellules NK CD27⁻ qui ont déjà atteint le dernier stade de maturation fonctionnelle ont maintenu leur phénotype de cellules NK fonctionnellement matures. Les deux sous-types de cellules NK ont aussi été transférées dans des souris hôtes B6.Rag1^{-/-} qui permettent, en raison de leur environnement lymphopénique, une certaine prolifération homéostatique, mais aucune augmentation de l'expression de B220 n'a été observée (Article 1, Figure 1).

Malgré que les cellules NK transférées se renouvellent et adoptent un phénotype de cellules fonctionnellement matures, il est probable qu'elles aient besoin de stimuli plus fort pour s'activer et augmenter leur niveau d'expression de B220 *in vivo*. *In vitro*, les cellules NK augmentent l'expression de B220 lorsqu'elles sont en contact avec des stimuli, tels que l'IL-2 (Article 1, Figure S2). De plus, on détecte plus de cellules arborant un phénotype de cellules NK B220⁺, c'est-à-dire des cellules, CD3⁻ CD19⁻ NK1.1⁺ B220⁺, dans la rate de souris ayant été injectées avec un agent activateur (Article 1, Figure S3)¹⁰³. Nous avons donc effectué le même type de transfert adoptif que mentionné précédemment, soit des cellules NK CD27⁺ et CD27⁻ triées de souris C57BL/6 et injectées dans des souris hôtes B6SJL; par contre, les souris B6SJL ont été subséquemment traitées avec un des deux agents activateurs suivants, soit du poly I:C ou de l'anti-CD40. Le phénotype des cellules NK injectées a été évalué au pic de la réponse et à différents moments après cette réponse. Le poly I:C et l'anti-CD40 ont permis d'activer les cellules NK CD27⁺ et CD27⁻ injectées, comme l'a démontré l'augmentation importante de l'expression de CD69 sur ces cellules, au pic de la réponse (Article 1, Figure 2). Par contre, les cellules aNK CD27⁺ et CD27⁻ n'ont pas acquis une forte expression du marqueur B220 associé avec le phénotype des IKDC. Tout de même, la moyenne d'expression de B220 sur les cellules aNK traitées avec l'un ou l'autre des agents activateurs a légèrement augmenté au pic d'activation, puis a diminué. Il a été suggéré que la prolifération cellulaire soit associée avec une augmentation de l'expression de B220¹⁰³. Il est probable que la prolifération affecte légèrement à la hausse la moyenne d'expression de B220, mais jamais à

des niveaux atteignant ceux observés chez les IKDC. Donc, que ce soit à l'état de base ou avec deux agents activateurs différents, *in vivo*, les cellules aNK ne sont pas des IKDC. Toutefois, nous ne pouvons exclure que d'autres types d'agents activateurs aient la capacité d'augmenter l'expression de B220 sur les cellules NK.

Ces résultats contrastent avec les données antérieures qui indiquent que les cellules arborant un phénotype de cellules NK B220⁺, soit CD3⁻ CD19⁻ NK1.1⁺ B220⁺, sont augmentées *in vivo* dans la rate, à la suite d'injection de poly I:C ou de CPG ODN¹⁰³. Par contre, des différences flagrantes dans le design expérimental permettent d'expliquer ces résultats divergents. En effet, cette étude antérieure a évalué l'augmentation de l'expression du marqueur B220 sur les cellules NK endogènes, c'est-à-dire les cellules NK totales (comprenant aussi des IKDC) d'une souris traitée avec un agent activateur et non sur des cellules NK triées et injectées dans des hôtes traités avec un agent activateur. D'ailleurs, la même augmentation de cellules NK B220⁺ est observée avec nos données, si on évalue le phénotype des cellules de l'hôte et non celui des cellules injectées (Article 1, Figure S3). Si ce ne sont pas des cellules NK qui augmentent l'expression du marqueur B220, comment expliquer cette augmentation de cellules hôtes CD3⁻ CD19⁻ NK1.1⁺ B220⁺ au pic d'activation dans la rate? Nous avons démontré que les IKDC transférées dans une souris hôte, qui est par la suite injectée au poly I:C, maintiennent leur forte expression de B220 (Article 1, Figure S4). Aussi, un groupe de recherche différent a révélé que les cellules NK B220⁻ sont augmentées dans le foie et les poumons et réduites dans la rate en réponse au poly I:C, suggérant une migration des cellules NK B220⁻ de la rate à ces organes²⁴⁹. Il est probable qu'au moment d'une stimulation au poly I:C, les cellules NK de la rate migrent à l'extérieur de celle-ci, alors que les IKDC y restent, tout en maintenant l'expression de B220, ce qui a pour effet d'augmenter la proportion de cellules NK B220⁺. Les raisons physiologiques de ces différences de migrations entre les IKDC et les cellules NK sont toutefois inconnues. L'ensemble de ces résultats indique que les IKDC ne sont pas des cellules NK activées.

4.1.2 Un sous-type de cellules NK

Si les IKDC ne sont pas des cellules hybrides, ni des cellules aNK, qu'est-ce qui les définit? Une analyse comparative de l'expression des marqueurs associés à la lignée NK, entre les IKDC et les cellules NK CD27^{+/}, a permis à notre groupe de recherche de confirmer les similitudes importantes entre les IKDC et les cellules NK. Les IKDC expriment les marqueurs associés à la lignée NK, soit les marqueurs CD122, NK1.1, CD49b ainsi que le NKp46, presque exclusivement exprimés sur les cellules NK²⁸⁹. De plus, les IKDC expriment des niveaux similaires aux cellules NK CD27⁺ et ⁻ de la molécule d'adhésion CD2, des récepteurs de la famille des *Signalling Lymphocytic Activation Molecule* (SLAM), tels que CD84, CRACC et 2B4 en plus de l'adaptateur SLAM-Associated Protein (SAP) (Article 1, Figure 3)²⁹⁰. Cette analyse phénotypique nous a aussi permis de mettre le doigt sur des récepteurs exprimés différemment sur les IKDC, par rapport aux deux sous-types de cellules NK. Fait intéressant, ce sont des récepteurs liés à la maturation fonctionnelle. En effet, nous avons observé que la majorité des IKDC expriment le phénotype suivant : CD27⁺CD11b^{low/high} (stade 2 et 3), contrairement à la majorité des cellules NK de la rate qui ont atteint le dernier stade de maturation fonctionnelle, soit CD27⁻CD11b⁺ (stade 4). En accord avec ces résultats, les IKDC expriment peu de CD43 et de forts niveaux de Ly108, leur conférant un phénotype très immature et unique (Article 1, Figure 3). En parallèle avec cette étude phénotypique, une analyse comparative du transcriptôme des IKDC avec ceux des sous-types de cellules NK a permis de découvrir que les IKDC ont une augmentation de l'expression de l'ARNm de gènes associés au cycle cellulaire (Article 1, Figure 6 et 7). Ces résultats ont par la suite été validés par une expérience de cycle cellulaire qui a démontré que les IKDC prolifèrent très rapidement par rapport aux cellules NK. Sachant que les IKDC sont immatures et prolifèrent activement, il nous est apparu pertinent de vérifier leur devenir *in vivo*. Nos résultats indiquent que les IKDC injectées poursuivent leur maturation fonctionnelle, telle qu'observée via l'augmentation de l'expression de CD43 et de CD11b, mais de façon bien étonnante, elles acquièrent un phénotype de cellules NK. En effet, après seulement 5 jours, une bonne partie des IKDC injectées ont perdu l'expression de B220 et cette perte d'expression se poursuit jusqu'à 25 jours *in vivo*, où elles deviennent toutes B220⁻ (Article 1, Figure 4 et S6). La conversion des IKDC en cellules NK peut sembler rapide puisqu'elle est déjà bien avancée

après 5 jours, mais elle est en accord avec le renouvellement très rapide des IKDC observé au cours d'une expérience de marquage au BrdU (Article 1, Figure 5). Il est intéressant de constater que les IKDC possèdent plusieurs caractéristiques associées à une population de cellules précurseurs, soit une prolifération et un renouvellement rapide, un phénotype immature et le potentiel de se convertir en une autre cellule. Dans leur ensemble, ces résultats nous ont permis de révéler que les IKDC sont des précurseurs de cellules NK *in vivo*.

Sachant que les IKDC sont des précurseurs de cellules NK, il s'avère intéressant de tenter de déterminer leur place dans la voie de différenciation des cellules NK. Nos résultats indiquent que les IKDC se différencient en cellules NK CD27⁺ fonctionnellement immatures qui, elles vont suivre leur maturation et par la suite devenir des NK CD27⁻ fonctionnellement matures (Article 1, Figure 4). De plus, les IKDC ont un transcriptôme très homologue à celui des cellules NK CD27⁺, ce qui renforce l'idée que ces deux types de cellules soient très près dans la différenciation (Article 1, Figure 6). Bien que nous sachions que les IKDC se différencient en NK CD27⁺, il s'avère plus complexe de déterminer la cellule qui précède les IKDC. Les cellules iNK ont été décrites comme les cellules précédant les cellules NK CD27⁺ dans la différenciation des cellules NK (Figure 11, cellules en mauve). Il est alors plausible que les cellules iNK se différencient en IKDC avant de devenir des cellules NK CD27⁺. Un argument en faveur de cette hypothèse est la présence d'une faible expression de B220 sur les cellules iNK, suggérant que ces cellules acquièrent B220, puis CD49b, pour devenir des IKDC¹⁰³. Par opposition, des études de progéniteurs ont révélé que les IKDC ne sont pas générées par les CLP, donc que les IKDC proviennent probablement d'une voie différente de celle des cellules iNK²⁴². Justement, ces études de progéniteurs ont permis de révéler que les IKDC sont issues d'un progéniteur beaucoup plus primitif que les CLP, soit le LSP (Figure 11, cellules orangées)²⁴². En effet, les IKDC sont produites par les LSP alors que les cellules NK sont produites par les CLP, et dans une moindre mesure, par les *Early Lymphoid Progenitor* (ELP) et les LSP. Il est donc possible que les cellules NK proviennent de plus d'une voie de différenciation. L'étude de souris déficientes en B220 n'a révélé aucune déficience en termes de nombre de cellules NK, indiquant qu'une voie de différenciation indépendante des IKDC existe probablement²⁹¹. Nous croyons qu'une voie de différenciation des cellules NK

proviendrait des ELP et des CLP et passerait par les étapes de différenciation connue (Figure 11, voie de différenciation n° 1) et l'autre proviendrait des LSP qui se différencient en IKDC, puis en cellules NK (Figure 11, voie de différenciation n° 2). Spécifiquement, les LSP de la moelle osseuse génèrent les IKDC qui, elles, peuvent migrer dans les niches de cellules NK, dont majoritairement la rate, où elles se différencient en cellules NK CD27⁺ (Article 1, Figure 4).

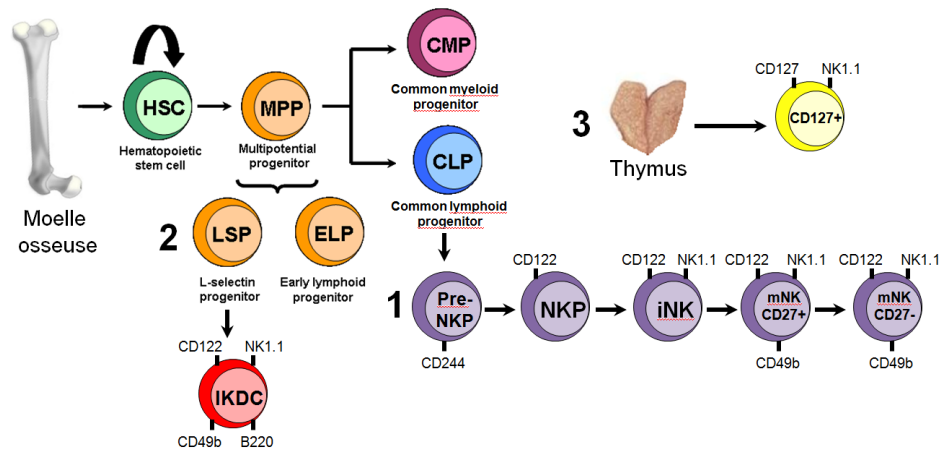


Figure 11 : Schéma représentant la différenciation des cellules NK et des IKDC. Inspiré de^{56,69,72,242}.

Une autre voie de différenciation des cellules NK a été identifiée (Figure 11, voie de différenciation n° 3). Cette voie parallèle est issue d'un précurseur thymique qui génère des cellules NK CD127⁺ qui vont s'établir dans les organes lymphoïdes périphériques^{69,70}. Nous avons alors voulu déterminer si les IKDC participent à cette voie de différenciation. Puisque les IKDC n'expriment pas CD127 et que leur quantité dans le thymus est très faible (0,006 %), nous croyons que ces cellules ne sont pas impliquées dans cette voie de différenciation (données non présentées)¹. Tout comme les IKDC, les cellules de la voie de différenciation provenant des Pre-NKP ne semblent pas faire partie de la voie thymique. En effet, l'injection intrathymique de NKP ou de Pre-NKP n'a pas permis de générer de cellules NK, ce qui indique que cette voie n'est pas la même que la voie thymique⁵⁶. Par contre, les cellules NK du 1^{er} stade, les NK CD11b⁻CD27⁻, pourraient provenir du thymus, puisqu'elles expriment

CD127 et semblent absentes chez les souris B6.Rag^{-/-} (Article 1, Figure 3)^{69,90}. Une étude exhaustive de tous les intermédiaires cellulaires de chacune des voies de différenciation sera nécessaire pour bien comprendre leur place dans la différenciation des cellules NK. L'étude de modèles murins ayant un arrêt à certaines étapes de la différenciation des cellules NK permettra de mieux comprendre ce processus et les molécules impliquées. De ce fait, une accumulation de cellules NK exprimant B220, donc potentiellement des IKDC, a été observée chez les souris déficientes en Gata3, en T-bet et en Bcl11b^{83,292}.

Les cellules NK générées du thymus ont des caractéristiques très particulières. Leur homéostasie est dépendante de GATA-3 et l'IL-7 et elles peuvent produire de grandes quantités de cytokines, mais possèdent un potentiel cytotoxique faible⁶⁹. En lien avec ces observations, il est possible que les NK différenciés d'IKDC possèdent des caractéristiques uniques. Ainsi, chacune des voies de différenciation de cellules NK participerait à la génération de cellules NK avec des attributs particuliers. Afin de vérifier cela, il nous faudra évaluer les caractéristiques des cellules NK générées à partir des différentes voies de différenciation. Pour le moment, nous pouvons supposer que les IKDC s'avèrent une voie de différenciation très avantageuse, car le renouvellement très rapide de ces cellules permet sans doute la génération accélérée de cellules NK. Cette faculté peut être très bénéfique en situation inflammatoire.

Plusieurs groupes de recherche ont souligné le pouvoir antitumoral remarquable des IKDC. Comment rallier ce pouvoir fonctionnel impressionnant avec la nouvelle fonction de précurseur de cellules NK? À la lumière de ces résultats, nous croyons que le pouvoir antitumoral remarquable des IKDC peut être expliqué par deux hypothèses. Notre première hypothèse justifie le potentiel antitumoral important des IKDC par leur capacité à générer une grande quantité de cellules NK. Il a été démontré qu'une injection d'IKDC est plus efficace qu'une injection de cellules NK pour diminuer la croissance tumorale chez des souris *beige* ayant des tumeurs 76.9 établies depuis 10 jours²³⁷. De plus, nous avons observé que l'injection d'IKDC chez des souris NOD-*scid IL2rg*^{-/-} permet de générer plus de cellules NK, après 6

jours *in vivo*, que l'injection de cellules NK (Annexe 1). Ainsi, les études comparatives de cellules NK et d'IKDC débutent avec la même quantité de cellules injectées, mais après quelques jours, les IKDC permettent d'obtenir une plus grande quantité de cellules NK et un pouvoir fonctionnel beaucoup plus important. Aussi, le cycle cellulaire très rapide des IKDC permet sans doute une différenciation accélérée en cellules NK et donc, la génération d'une grande quantité de cellules NK, après une courte période de temps (Article 1, Figure 5). D'autre part, nous ne connaissons pas les caractéristiques des cellules NK générées des IKDC. Les IKDC pourraient produire des cellules NK au pouvoir fonctionnel supérieur. Donc, la production rapide d'une grande quantité de cellules NK pourrait expliquer le potentiel antitumoral impressionnant des IKDC. Cependant, le fait que les IKDC maintiennent une forte expression de B220, au cours du pic de la réponse au poly I:C et à l'anti-CD40, va à l'encontre de cette hypothèse (Article 1, Figure S4). En effet, cette observation suggère que la différenciation des IKDC en cellules NK est stoppée en présence de stimuli activateurs. Mais pourquoi les IKDC ne se différencieraient-elles pas en cellules NK dans ces conditions? Notre deuxième hypothèse sur la justification du potentiel antitumoral supérieur des IKDC permet d'expliquer cette observation. Elle est basée sur le fait que les IKDC possèdent des propriétés fonctionnelles intrinsèques uniques, leur conférant un pouvoir antitumoral considérable. En effet, les IKDC sont renommées pour leur production d'IFN- γ et leur pouvoir cytotoxique qui sont supérieurs à ceux des cellules NK^{234,246}. Ces expériences ont été majoritairement exécutées *in vitro*. Contrairement aux expériences *in vivo* qui s'échelonnent sur plusieurs jours et permettent aux IKDC de se différencier en cellules NK, ce type d'expérience comporte un temps d'incubation très court, lequel empêche probablement les IKDC de se différencier en cellules NK. Ainsi, les résultats qui suggèrent que les IKDC sont plus efficaces que les cellules NK, peuvent sans doute être expliqués par les propriétés intrinsèques exceptionnelles des IKDC et non par leur capacité à se différencier en cellules NK. Aussi, les IKDC utilisent des molécules différentes des cellules NK pour effectuer la cytolysse de leur cible. Il a été démontré que les IKDC utilisent TRAIL alors que les cellules NK utilisent majoritairement la relâche de granzyme et de perforine²⁵². Ces différences pourraient expliquer pourquoi le pouvoir cytotoxique des IKDC est supérieur à celui des cellules NK. De plus, outre leurs fonctions associées aux cellules NK, les IKDC ont été décrites dans plusieurs articles scientifiques pour leur fonction de CPA. Bien que les fonctions de CPA des IKDC sont

controversées, il a été démontré que les *licensed* IKDC peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T et les activer^{237,261}. Ainsi, ces caractéristiques de CPA pourraient permettre aux IKDC d'avoir un pouvoir fonctionnel plus important et surtout plus vaste que celui des cellules NK. Bien que la deuxième hypothèse semble la plus plausible, basée sur les données actuelles, il est possible que dans certaines situations les deux hypothèses soient valables. Ainsi, une partie des IKDC utiliserait leur pouvoir fonctionnel supérieur intrinsèque alors qu'une autre partie des IKDC se différencieraient en cellules NK. En somme, peu importe ce qui rend les IKDC aussi efficaces, que ce soit leur différenciation en cellules NK ou leurs propriétés intrinsèques, il est clair que les IKDC sont des cellules remarquables. En plus de leur rôle dans la diminution de la croissance tumorale, les IKDC, ou des cellules arborant leur phénotype, ont été associés à plusieurs désordres immunitaires tels que la protection contre l'EAE, le virus de l'immunodéficience humaine et le virus de l'influenza²³⁹⁻²⁴¹.

4.2 IKDC : Quels facteurs génétiques les régulent?

Plusieurs groupes ont démontré que les IKDC ont un pouvoir antitumoral impressionnant. En effet, les IKDC sont significativement plus efficaces que les cellules NK pour diminuer la croissance tumorale²³⁴. De plus, des études au laboratoire nous ont permis d'observer que plusieurs modèles murins prédisposés au développement de tumeurs spontanées ou permissifs à l'implantation de tumeurs ont une proportion d'IKDC diminuée par rapport aux modèles murins résistants (Annexe 2)^{293,294}. En plus de suggérer que les IKDC s'avèrent des candidats intéressants pour des thérapies antitumorales, ces résultats suggèrent qu'une proportion réduite d'IKDC favorise le développement tumoral. Donc, il serait pertinent de tenter de restaurer la proportion d'IKDC et de vérifier si cela est suffisant pour prévenir le développement tumoral. Un moyen d'y parvenir est d'extraire les cellules *ex vivo*, de les faire proliférer avec des facteurs *in vitro*, puis de les réinjecter en plus grand nombre dans la souris. Cependant, puisque les IKDC meurent facilement *in vitro*, il s'avère très ardu d'effectuer ce genre d'expérience. Il est alors essentiel de trouver un moyen de cibler les IKDC spécifiquement *in vivo*, pour augmenter leur nombre. Pour ce faire, nous avons opté pour une étude génétique. Ce type d'étude comporte bien des avantages. En effet, les études génétiques facilitent et, même dans certains cas, permettent l'identification du ou des gènes impliqués dans la régulation d'une population cellulaire. Le gène identifié peut ensuite être ciblé pour faire varier la proportion de la population cellulaire étudiée. Par exemple, une thérapie génique ciblant l'adénosine déaminase chez des patients souffrant d'immunodéficience combinée sévère reliée à cette enzyme, a permis d'en rétablir le niveau et de traiter des patients à long terme²⁹⁵. De plus, le gène identifié permettra de faciliter l'identification des orthologues d'IKDC chez l'humain et le développement de thérapies anticancéreuses.

Pour effectuer une étude génétique, il faut d'abord s'assurer que le trait à l'étude, dans ce cas-ci la proportion d'IKDC, est régulé par des facteurs génétiques. Nous avons pu déterminer que les IKDC sont bel et bien contrôlées par des facteurs génétiques, puisque leur proportion varie entre des souris possédant un fond génétique distinct (Article 2, Figure 2). De

plus, en comparant ces souris au fond génétique différent, nous avons pu en apprendre davantage sur la régulation de la proportion d'IKDC. Premièrement, nous avons constaté que le locus du CMH n'est pas impliqué dans la régulation de la proportion d'IKDC. Les souris B10.Br (CMH H2^k) et C56BL/6 (CMH H2^b) diffèrent au niveau de leur CMH-II, mais possèdent une proportion d'IKDC similaire. La même chose est observée chez les souris NOD (CMH H2^{g7}) et NOD.H2^k (CMH H2^k). Deuxièmement, l'inflammation ne semble pas impliquée dans la régulation de la proportion d'IKDC. Les souris NOD sont prédisposées au diabète auto-immun et développent de l'insulite, alors que les souris NOD.H2^k sont résistantes. Par contre, ces deux souris ont une quantité semblable d'IKDC. Troisièmement, les souris de fond génétique B6 contiennent la plus grande proportion d'IKDC, alors que les souris de fond génétique NOD contiennent la plus faible proportion. En fonction de ces observations, nous avons choisi pour l'étude génétique les souris B10.Br et les souris NOD.H2^k, puisqu'elles possèdent un grand différentiel de proportion d'IKDC, mais aussi parce qu'elles ont le même CMH et qu'elles ne sont pas prédisposées à des troubles auto-immuns qui pourrait affecter la viabilité des souris au cours de l'étude. Nous avons effectué une étude de liaison sur des souris F2 issues de l'intercroisement de souris F1 (B10.Br X NOD.H2^k). L'analyse a permis d'identifier une association suggestive d'une région distale du chromosome 7, ainsi qu'une faible association d'une région du chromosome 19 à la régulation de la proportion des IKDC (Article 2, Figure 3). Une analyse des haplotypes a révélé qu'une proportion élevée d'IKDC est obtenue avec des allèles de polymorphisme B10.Br, au niveau de la région du chromosome 7 (SNP rs13479513) et des allèles de polymorphisme NOD (SNP rs13483650), au niveau de la région du chromosome 19 (Annexe 3). L'ensemble de ces résultats a été validé à l'aide de la souris congénique NOD.Lc7 qui possède un fond génétique NOD, sauf pour un segment au niveau de la région distale du chromosome 7 qui est d'origine C57L, semblable à B10.Br ou C57BL/6, et qui correspond à l'intervalle identifié avec l'étude génétique (Article 2, Figure 3). En effet, la proportion d'IKDC dans la rate des souris NOD.Lc7 est complètement restaurée. Par la suite, nous avons jeté un coup d'œil aux gènes contenus dans l'intervalle Lc7 pour tenter d'identifier un ou des gènes possiblement reliés à la régulation de la proportion d'IKDC. Cependant, cet intervalle génétique est particulièrement large, car il contient environ 400 gènes dont une bonne partie sont des gènes immunologiques. De manière intéressante, nous avons identifié que la région Lc7 contient plusieurs QTLs

associés au cancer (Figure 12). De plus, en vérifiant les régions génétiques orthologues à la région Lc7 chez l'humain, nous avons aussi détecté plusieurs QTLs associés au cancer. La plupart de ces QTLs n'ont toujours pas révélé le gène précis qui les associe au cancer. Ceci indique que le gène qui régule les IKDC est potentiellement aussi associé à l'un de ces QTLs.

Quantitative trait loci (QTLs) associés au cancer

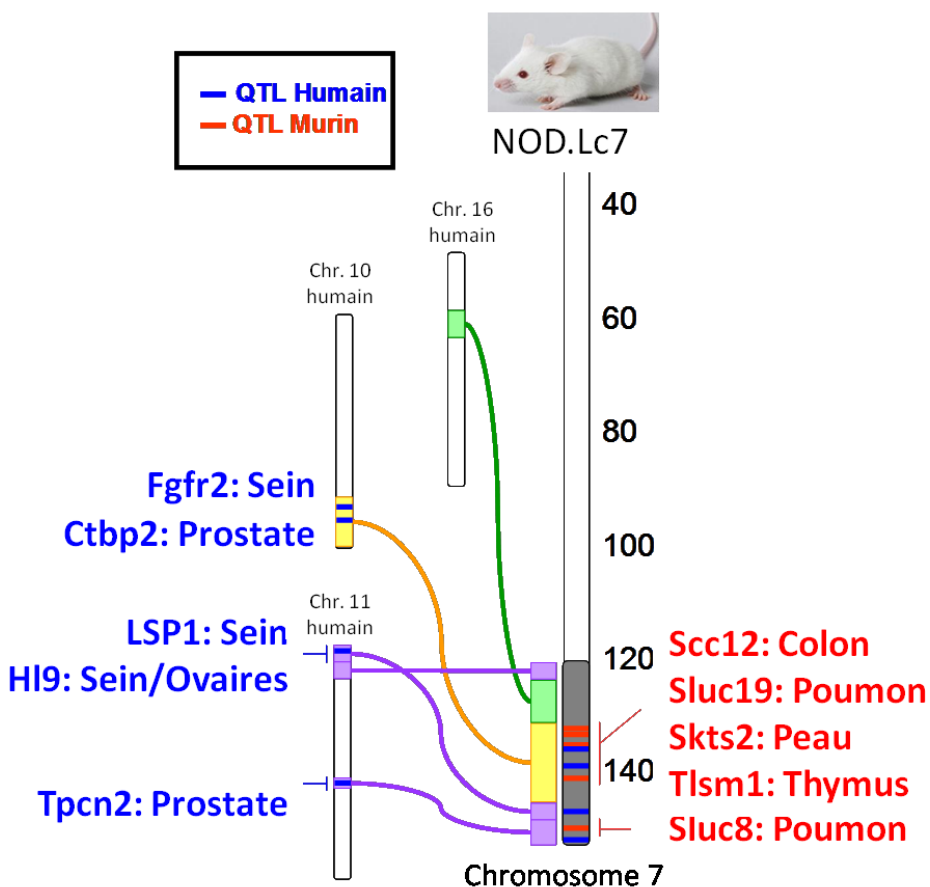


Figure 12 : Schéma représentant les QTLs associés au cancer dans la région Lc7 et dans les régions orthologues à la région Lc7 chez humain.

Afin d'orienter notre recherche du gène qui régule les IKDC, nous avons effectué une expérience de chimère qui a révélé que la proportion d'IKDC est contrôlée par des facteurs hématopoïétiques intrinsèques (Article 2, Figure 4). Ce résultat très instructif suggère que la

diminution d'IKDC chez la souris NOD. $H2^k$ est attribuable à un défaut de migration, de mort cellulaire, de renouvellement ou de progéniteurs. De manière intéressante, des études connexes au laboratoire nous ont permis d'exclure certaines de ces possibilités. Premièrement, nous avons évalué la possibilité d'un défaut de migration. La diminution d'IKDC observée dans la rate pourrait prendre son origine d'une migration préférentielle dans un autre organe ou encore d'un défaut de récepteur de chémokine, contraignant l'entrée dans la rate. Pour vérifier cette possibilité, nous avons simplement vérifié la proportion d'IKDC dans plusieurs organes lymphoïdes et non-lymphoïdes. Nous avons choisi de vérifier la proportion d'IKDC dans des souris Rag1^{-/-} pour faciliter leur détection. En effet, les souris NOD.Rag1^{-/-} ont une diminution de la proportion d'IKDC dans la rate, par rapport aux souris NOD.Rag1^{-/-}Lc7, encore plus importante que les souris NOD, par rapport aux souris NOD.Lc7. Nous avons observé que la proportion d'IKDC est diminuée chez la souris NOD.Rag1^{-/-} par rapport à la souris NOD.Rag1^{-/-}Lc7 dans toutes les niches importantes d'IKDC et de cellules NK, soit la rate, le foie, la moelle osseuse, les poumons et le thymus, indiquant que le trafic de ces cellules n'est pas la cause de la diminution de leur proportion dans la rate des souris NOD (Annexe 4 et données non présentées). Deuxièmement, nous avons étudié si la mort cellulaire pouvait expliquer la différence de proportion d'IKDC. Nous avons déjà évalué la survie des IKDC par l'expression de *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), une protéine anti-apoptotique, et de Caspase 3, une protéine pro-apoptotique^{296,297}. Par contre, les niveaux d'expression de ces deux protéines étaient similaires entre les IKDC de souris NOD et NOD.Lc7, suggérant que les IKDC de souris NOD n'ont pas de défaut de survie (Annexe 5). Donc, nous pouvons exclure un défaut de migration ou de survie pour expliquer la diminution de proportion des IKDC chez la souris NOD. Troisièmement et quatrièmement, il est probable qu'un problème de renouvellement ou de progéniteur d'IKDC explique cette diminution de proportion dans la rate des souris NOD. De ce fait, il a été démontré que les HSC de la souris NOD possèdent plusieurs altérations, révélés au cours d'expériences de greffe de moelle osseuse, indiquant qu'un défaut de progéniteurs d'IKDC chez ces souris est probable^{298,299}. Ces deux possibilités devront être examinées pour tenter de comprendre le mécanisme responsable de la diminution de la proportion d'IKDC chez la souris NOD et ainsi faciliter l'identification du gène qui les régule.

En parallèle, nous avons aussi généré des souris sous-congéniques de la souris NOD.Lc7 pour tenter de raccourcir l'intervalle génétique Lc7 qui régule la proportion d'IKDC. Nous avons généré trois souris sous-congéniques ayant un intervalle Lc7 plus petits, allant de 138 à 151 Mb, de 135 à 151 Mb et de 132 à 142 Mb (Annexe 6). La proportion d'IKDC a été vérifiée chez chacune de ces souris. Malheureusement, aucune des souris sous-congéniques ne possède une proportion d'IKDC semblable à celle de la souris NOD.Lc7 (Annexe 7, A). Ces résultats suggèrent que les souris sous-congéniques de la souris NOD.Lc7 ont perdu le gène de polymorphisme C57L ou la combinaison de gènes de polymorphisme C57L nécessaires à l'obtention d'une forte proportion d'IKDC. En effet, bien que les intervalles génétiques réduits des souris sous-congéniques couvrent une bonne partie de l'intervalle génétique Lc7, la partie proximale de cet intervalle (D7Mit253 à D7Mit105) n'a pas été héritée par les souris sous-congéniques. Pour déterminer l'importance de cette région proximale sur la proportion d'IKDC, nous avons étudié la souris NOR/Lt qui contient cette région proximale d'origine C57, sans la partie distale de l'intervalle génétique Lc7. La souris NOR/Lt est issue d'une erreur de croisement dans une colonie de souris NOD avec des souris de souche BK (C57BL/6 et DBA/2) (Figure 13)^{300,301}. La souris NOR/Lt possède un fond génétique NOD, sauf pour environ 11,6 % de son génome qui est d'origine C57BL/6 ou DBA/2, ce qui est suffisant pour rendre cette souris résistante au développement de l'insulite et du diabète auto-immun. Contrairement aux souris sous-congéniques NOD.Lc7, les souris NOR/Lt possèdent une proportion d'IKDC élevée, tel qu'observé chez la souris NOD.Lc7 (Annexe 7, B). Et puisque la souris NOR/Lt ne développe pas d'insulite ou de diabète, la proportion élevée d'IKDC n'est pas attribuable à un processus inflammatoire. Ce résultat indique que l'intervalle proximal contient le ou les gènes régulant la proportion d'IKDC. Nous ne pouvons exclure hors de tout doute que les autres régions génétiques d'origine BK contenues chez la souris NOR/Lt peuvent influencer la proportion d'IKDC. Cependant, ce scénario est improbable puisque l'étude génétique indique clairement qu'il n'y a pas d'autres régions génétiques que celle sur les chromosomes 7 et 19, qui influencent la proportion d'IKDC.

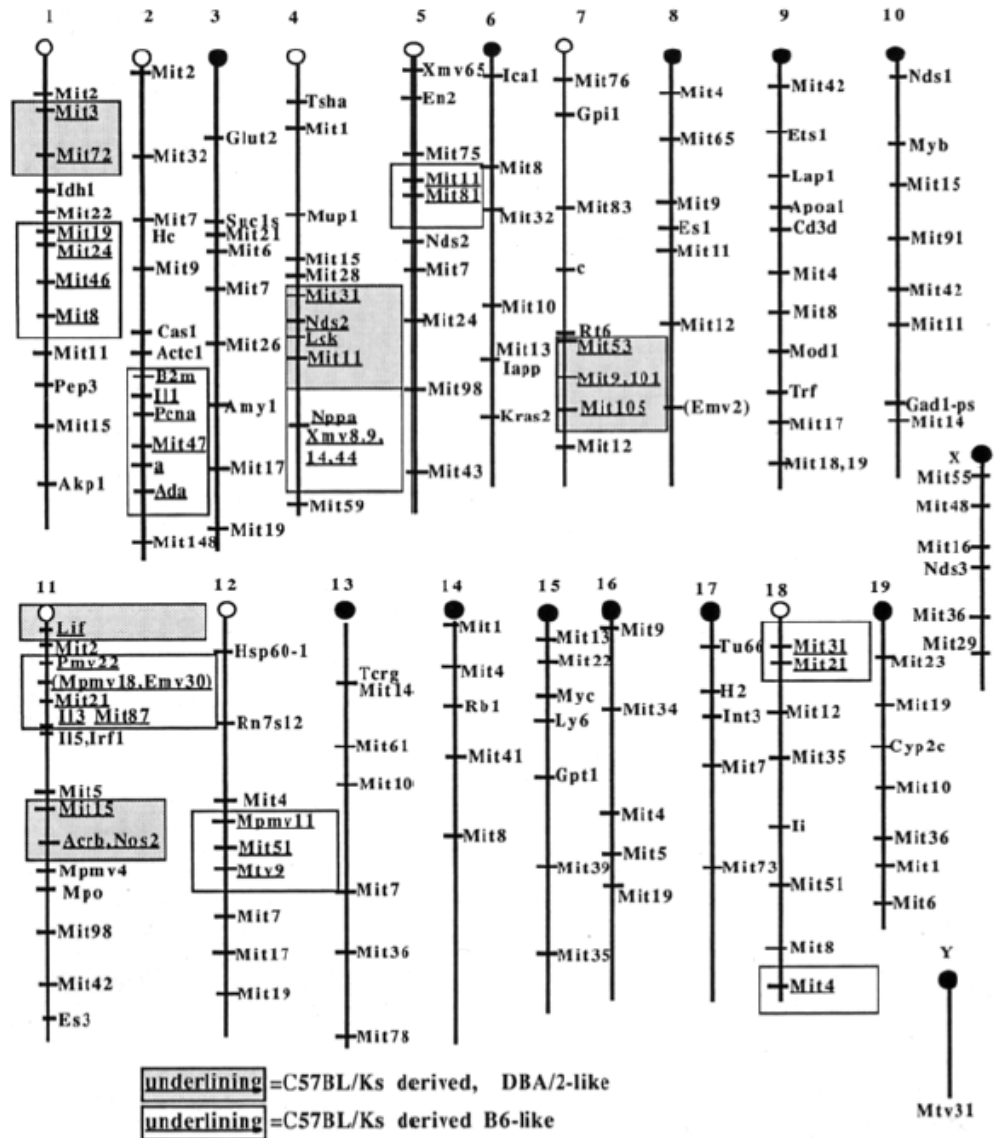


Figure 13 : Représentation du profil génétique de la souris NOR/Lt. Tiré de³⁰¹.

Bien que les chimères et les souris sous-congéniques nous ont permis de limiter davantage le type et la quantité de gènes responsables de la régulation de la proportion d'IKDC, il s'avérait essentiel d'utiliser d'autres outils pour parvenir à mettre le doigt sur le gène ou les gènes précis. Afin d'y arriver, nous avons effectué une analyse de *RNAseq* qui est

une méthode de séquençage a haut débit qui permet d'étudier le transcriptôme d'un groupe à l'étude par rapport à un groupe contrôle, et ce, de façon très précise et pointue³⁰². Cette technique permet de détecter les polymorphismes, les expressions différentielles, l'épissage alternatif, les nouveaux isoformes et les nouveaux et/ou rares transcrits. Au départ, nous souhaitions effectuer ce type d'analyse sur les IKDC de rate de souris NOD et NOD.Lc7 pour tenter d'identifier une différence au niveau du transcriptôme de ces cellules qui révélerait le gène qui les régule. Cependant, puisque nous avons établi que la proportion d'IKDC réduite chez la souris NOD pouvait être attribuable à un défaut de progéniteurs d'IKDC, nous ne voulions pas limiter l'analyse aux IKDC. Ainsi, nous avons effectué une expérience de *RNAseq* sur la rate totale de souris NOD et NOD.Lc7. Tout d'abord, nous avons été capables de valider la technique, puisqu'il a été possible de détecter un enrichissement du nombre de SNP homozygotes au niveau de la région Lc7 (données non présentées). Ensuite, une analyse préliminaire a permis de déterminer que, parmi les 400 gènes de l'intervalle Lc7, seulement 40 étaient différemment exprimés ou polymorphiques, entre la souris NOD.Lc7 et la souris NOD (Annexe 8, A). Sachant que le gène ou les gènes qui régulent les IKDC se retrouvent probablement dans la région proximale de l'intervalle Lc7 (D7Mit253 à D7Mit105), comme l'étude des souris sous-congéniques de NOD.Lc7 et les souris NOR/Lt le dévoile, nous avons évalué les gènes différemment exprimés et polymorphiques dans cette plus petite région. Ce plus petit intervalle génétique contient 101 gènes, dont seulement 15 sont polymorphiques, 5 sont différemment exprimés et 2 sont polymorphiques et différemment exprimés (Annexe 8, B). Bien que tous ces gènes soient des candidats potentiels, nous nous sommes intéressés aux 2 gènes différemment exprimés et à la fois polymorphiques, *ITGAD* et *COX6A2*. Ces deux gènes revêtent un intérêt particulier, parce que des études de micropuces au laboratoire ont dévoilé que ces gènes étaient fortement augmentés en expression chez les IKDC par rapport aux deux sous-types de cellules NK, soit les NK CD27⁺ et ⁻. Donc, ces résultats nous ont poussés à croire que ces gènes étaient impliqués dans la régulation de la proportion d'IKDC. Il est à noter que ces deux gènes sont physiquement très proches l'un de l'autre, à 128Mb sur le chromosome 7.

Le premier gène se nomme *Integrin Alpha-D (ITGAD)* et code pour la protéine CD11d aussi appelée *Membrane-activated Complex 1* qui fait partie de la famille des intégrines de leucocytes CD11/CD18³⁰³. Cette famille comprend le CD11a/CD18 (LFA-1), le CD11b/CD18 (Mac-1), le CD11c/CD18 (p50,95) et le CD11d/CD18. Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité α (CD11a-d) et d'une sous-unité β_2 (CD18). Le CD11d est sans doute le moins connu des CD11 et la majorité des études sur cette molécule ont été effectuées chez l'Homme. Chez l'humain, le complexe CD11d/CD18 est exprimé de manière basale sur tous les leucocytes. Au cours d'une réaction inflammatoire, l'expression des ligands de CD11d, soit le VCAM-1 et ICAM-3, est augmentée sur les cellules endothéliales ayant subi des dommages permettant aux leucocytes exprimant CD11d/CD18 de s'y lier et de migrer vers le tissu endommagé³⁰³⁻³⁰⁵. En plus de jouer un rôle dans l'infiltration des leucocytes vers les tissus, au cours d'une réaction inflammatoire, le CD11d est aussi impliqué dans l'activation des macrophages, des éosinophiles et des neutrophiles et dans la prolifération des lymphocytes T³⁰⁶⁻³¹⁰. Chez la souris, l'expression de CD11d est très restreinte. En effet, le CD11d est seulement exprimé sur les splénocytes qui expriment CD11b³⁰⁷. L'étude de souris déficientes en CD11d a révélé que ces souris ont une quantité normale de leucocytes périphériques, un taux régulier d'IgG dans le sérum, un potentiel cytotoxique des cellules NK normal, mais des défauts au niveau de la réponse des lymphocytes T³⁰⁷. L'expression de CD11d sur les IKDC ou sur les cellules NK ainsi que la proportion de ces cellules n'a pas été évaluée chez les souris déficientes en CD11d. Malheureusement, les souris déficientes en CD11d et l'anticorps anti-CD11d ne sont plus disponibles. Sachant que les cellules qui expriment CD11d sont CD11b⁺, il est tentant de supposer que les IKDC ou une partie de celles-ci expriment le CD11d, puisqu'environ 40 % d'entre elles expriment CD11b (Article 1, Figure 3b). De plus, les résultats des micropuces indiquent que le gène CD11d est fortement exprimé chez les IKDC, par rapport aux cellules NK CD27⁺ et CD27⁻ (données non présentées). Aussi, nous avons détecté grâce à une expérience de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) que les IKDC provenant de souris NOD.Lc7 expriment plus de CD11d que les IKDC de souris NOD (données non présentées). Donc, si l'on considère que les IKDC expriment le CD11d, on peut se demander comment une altération de celui-ci permet d'expliquer la faible proportion d'IKDC chez la souris NOD. L'intégrine CD11d joue un rôle important dans la migration en cours de réaction inflammatoire. Puisque la proportion d'IKDC est diminuée à

l'état de base, il n'est pas clair que le CD11d peut aussi jouer un rôle dans ce contexte basal. De plus, la proportion d'IKDC est diminuée dans la majorité des organes périphériques de la souris NOD, indiquant qu'un défaut de migration est peu probable (Annexe 4). Outre la migration, le CD11d a un rôle dans la prolifération. Une prolifération accrue des IKDC pourrait favoriser une accumulation de ces cellules qui mènerait à l'obtention d'une proportion plus élevée.

Une autre manière d'étudier l'effet de CD11d est par l'absence de son ligand VCAM-1 (le seul connu chez la souris) ou de sa sous-unité β_2 (CD18). Les souris déficientes en VCAM-1 ont des défauts d'organogénèse sévères et sont embryoniques létales^{311,312}. Par contre, un groupe de recherche a généré des souris transgéniques Cre recombinaise VCAM-1, permettant d'étudier l'absence de ce ligand chez les souris adultes. Ces souris présentent un défaut majeur de migration vers la moelle osseuse, une diminution des lymphocytes B matures et des lymphocytes T dans la moelle osseuse³¹³. Rien n'a été observé concernant les cellules de la lignée NK. De leur côté, les souris déficientes en CD18 possèdent des défauts importants, mais ne sont pas embryoniques létales. Elles s'avèrent moins spécifiques que les CD11d ou les VCAM-1 déficientes, puisque l'absence de la sous-unité β_2 (CD18) empêche l'expression de toutes les sous-unités α (CD11a-d) à la surface cellulaire³¹⁴. Les souris déficientes en CD18 développent de la dermatite chronique spontanée et des infections mucocutanées spontanées et possèdent des défauts de migration et d'adhésion des neutrophiles et une diminution de la prolifération des lymphocytes T³¹⁵. De manière intéressante, il a été démontré que les neutrophiles sont essentiels à la maturation, la fonction et l'homéostasie des cellules NK³¹⁶. L'homéostasie des neutrophiles est donc étroitement reliée à celle des cellules de la lignée NK. De plus, chez l'homme, les neutrophiles activés peuvent induire la production d'IFN- γ par les cellules NK, par l'engagement de ICAM-3 sur les neutrophiles et du CD11d/CD18 sur les cellules NK³¹⁷. Considérant que les souris déficientes en CD18 possèdent des altérations au niveau de leurs neutrophiles, que les neutrophiles sont importants pour l'homéostasie des cellules NK et que les neutrophiles peuvent entrer en contact avec les cellules NK par l'expression de CD11d, il est probable que les cellules de la lignée NK, telles que les IKDC, soient affectées par la liaison de CD11d avec son ligand sur les neutrophiles. En d'autres

termes, qu'un polymorphisme de CD11d altère la liaison des neutrophiles avec les IKDC et affecte leur proportion. Il sera intéressant de vérifier cette hypothèse. Un autre groupe de recherche a étudié des souris déficientes en CD18. Ce groupe a utilisé la mutagenèse par *Ethyl Nitrosourea* (ENU), qui génère des souris ayant une mutation nulle en CD18 et ils évaluèrent cette déficience sur les cellules NK. Ils ont constaté une augmentation de la proportion dans plusieurs organes périphériques de cellules NK c-kit⁺ avec un phénotype fonctionnellement immature, mais tout de même capable de monter une réponse normale contre le MCMV³¹⁸. Cette étude démontre que l'absence de CD18 ne cause pas la diminution, mais l'augmentation de la proportion de cellules NK. En se basant sur les résultats de cette étude, on pourrait croire que l'absence ou une altération de la signalisation par le CD11d favoriserait une augmentation des IKDC, ce qui ne corrèle pas avec la proportion d'IKDC réduite chez la souris NOD. De plus, la maturation fonctionnelle (expression de CD27 et CD11b) des cellules NK et des IKDC de la souris NOD est similaire à celle des souris NOD.Lc7 (données non présentées). Cependant, ce qui est important avec cette étude, c'est qu'elle démontre qu'une altération de la voie des intégrines CD11/CD18 peut avoir un effet sur la proportion d'une population cellulaire dans tous les organes qui la niche. En parallèle, nous avons trouvé bon de vérifier le niveau d'expression de CD18 sur les IKDC de souris NOD.Lc7 et NOD, puisqu'il peut affecter l'expression à la surface du CD11d. Cependant, le niveau d'expression du CD18 était similaire (données non présentées). L'ensemble de ces résultats indique qu'une altération de la signalisation du CD11d, causée par un polymorphisme ou une diminution de l'expression de CD11d, pourrait expliquer la proportion réduite d'IKDC chez la souris NOD. Il s'avère essentiel de vérifier spécifiquement l'effet de l'absence ou de la diminution de l'expression de CD11d sur la proportion d'IKDC.

Le second gène se nomme *Cytochrome c Oxidase Subunit VIa Polypeptide 2* (*COX6A2*) et code pour la protéine du même nom, aussi appelée COX6AH ou COXVIAH. Le COX6A2 est une sous-unité du cytochrome c oxydase. Précisément, le cytochrome c oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire de la mitochondrie³¹⁹⁻³²¹. Cette enzyme a pour rôle de catalyser le transfert d'électron du cytochrome c réduit à l'oxygène et de transloquer les protons à travers la membrane interne de la mitochondrie^{322,323}. Le cytochrome c oxydase

est composé d'un complexe hétéromère formé de trois sous-unités catalytiques (COX1 à COX3) encodées par de l'ADN mitochondrial et de dix sous-unités structurales (COX4 à COX13) encodées par de l'ADN nucléaire³²⁴. Les COX1 à COX3 sont responsables de la fonction catalytique du cytochrome c oxydase, c'est-à-dire le transfert de l'électron, alors que les COX4 à 13 sont responsables de l'assemblage des différentes sous-unités en un complexe et peuvent faire varier l'activité du cytochrome c oxydase en réponse à des signaux physiologiques ou l'environnement métabolique^{324,325}. La sous-unité COX6A possède deux polypeptides. Le gène *COX6A1* encode le premier polypeptide, un isoforme du foie, qui est exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus non musculaires et à faible intensité dans les muscles contractiles. Le gène *COX6A2* encode le deuxième polypeptide, un isoforme du cœur et des muscles, qui est seulement exprimé dans les muscles striés^{326,327}. Cependant, des études préliminaires au laboratoire laissent croire que les IKDC expriment bel et bien le COX6A2. De plus, il semble que les IKDC provenant de souris NOD.Lc7 expriment d'avantage de COX6A2 que les IKDC de souris NOD (données non présentées). Malgré que les IKDC expriment COX6A2, il semble bien difficile de déterminer comment ce polypeptide pourrait affecter la proportion d'IKDC. Une avenue potentielle est la création de *short hairpin RNA* (shRNA) pour le gène *COX6A2* afin d'évaluer l'absence de celui-ci sur la proportion d'IKDC *in vivo*³²⁸. Aussi, nous pouvons essayer d'évaluer directement l'effet de la mitochondrie sur la proportion d'IKDC. Il est connu que l'ADN mitochondrial est transmis de la mère à l'enfant et non du père à celui-ci³²⁹. De plus, il a été démontré que l'activité du cytochrome c oxydase chez la souris est aussi héritée de la mère³³⁰. Ainsi, est-il possible que l'ADN mitochondrial provenant d'une souris femelle NOD interagisse avec le COX6A2, crée une empreinte génomique sur celui-ci, ce qui résultera, entre autres, en une diminution de la proportion d'IKDC? Pour tester cela, nous allons effectuer une série de croisements de souris jusqu'à l'obtention de souris qui possèdent au moins un allèle Lc7 et une mitochondrie provenant de souris NOD.Lc7 ou de souris NOD (Figure 14). Spécifiquement, nous allons croiser une souris femelle NOD.Lc7 avec une souris mâle NOD, les bébés F1 seront hétérozygotes pour le segment Lc7 et posséderont une mitochondrie Lc7. En même temps, nous allons croiser une souris femelle NOD avec une souris mâle NOD.Lc7, les bébés F1 seront hétérozygotes pour le segment Lc7 comme dans le cas précédent, mais posséderont une mitochondrie NOD. S'il y a effectivement présence d'une empreinte génomique par la

mitochondrie, les souris F1 avec une mitochondrie NOD auront une proportion d'IKDC plus faible que les souris F1 avec une mitochondrie Lc7. Finalement, tout comme *ITGAL*, *COX6A2* est un gène candidat très intéressant qu'il faudra étudier davantage pour déterminer s'il a un rôle dans la proportion d'IKDC.

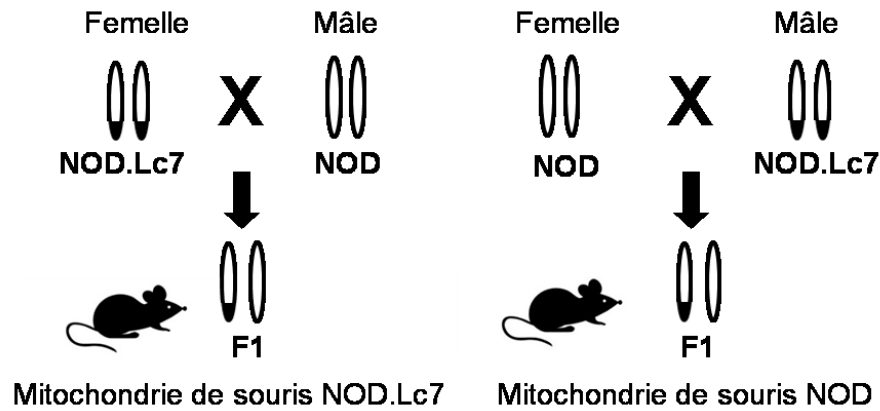


Figure 14 : Stratégie de croisement proposée pour évaluer si la mitochondrie fait une empreinte génomique sur le COX6A2.

4.3 Modèle

L'étude de la biologie et de la génétique des IKDC nous a permis d'avoir une meilleure compréhension des rôles et de la régulation de ces cellules. La Figure 15 présentée ci-dessous tente de résumer l'ensemble des nouvelles connaissances sur les IKDC. Il est à noter qu'en raison de leur nouvelle fonction précurseur et par analogie avec les cellules pre-B et pre-DC, les IKDC ont été rebaptisées cellules pre-mNK^{331,332}. Ce nouveau nom souligne leur nouvelle identité tout en étant en accord avec leur biologie.

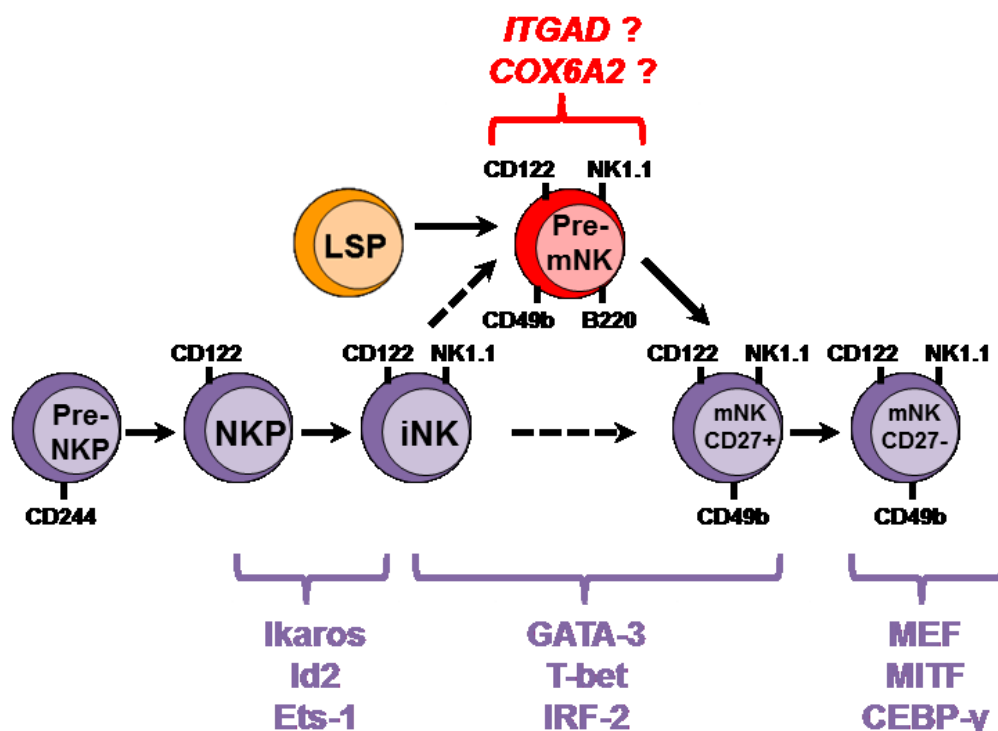


Figure 15 : Modèle représentant la différenciation des cellules NK. Les lignes hachurées et les points d'interrogation représentent des éléments à confirmer. Les facteurs de transcription, en mauve, et les gènes, en rouge, importants pour certaines étapes clés de la différenciation des cellules NK sont indiqués. Inspiré de^{72,83}.

4.4 Conclusion

L'objectif de cette thèse consistait à définir l'identité des IKDC puis à déterminer les facteurs génétiques responsables de la régulation de ces cellules. Pour y arriver, nous avons effectué plusieurs expériences de transfert adoptif qui ont révélé que les IKDC ne sont pas des cellules aNK, telles qu'il avait été proposé, mais des précurseurs de cellules NK. Aussi, nous avons démontré que les IKDC possèdent plusieurs caractéristiques en accord avec ce nouveau rôle, tel qu'une prolifération active et un phénotype immature. Pour que les IKDC aient un nom qui reflète davantage cette nouvelle identité et leur biologie, nous les avons redéfinies cellules pre-mNK. Ensuite, puisque nos données indiquent que les cellules pre-mNK sont régulées par des facteurs géniques, nous avons entrepris une étude génétique. Cette étude a permis d'identifier que des facteurs génétiques compris dans un locus distal du chromosome 7 étaient responsables de la régulation de la proportion des cellules pre-mNK. Des études de chimères ont par la suite révélé que les cellules pre-mNK sont régulées par des facteurs hématopoïétiques intrinsèques. Finalement, des analyses combinant l'étude de souris NOD.Lc7 sous-congéniques, de *RNAseq* et de micropuces ont permis d'identifier deux gènes candidats, soit *ITGAD* et *COX6A2*, pour la régulation des cellules pre-mNK.

Les résultats présentés dans cette thèse sont des éléments de connaissance précieux pour la suite de la recherche sur les cellules pre-mNK. Tout d'abord, ces résultats révèlent de façon éloquente la nécessité de corroborer les résultats obtenus avec des expériences *in vitro* avec des résultats *in vivo*. En effet, les cellules NK et les cellules pre-mNK ont un phénotype bien différent *in vitro* et *in vivo*. Il s'avérera essentiel de considérer cela pour les expériences futures. Ensuite, en raison de la controverse sur la nature des cellules pre-mNK, bon nombre d'équipes de recherche avaient cessé de les étudier. En mettant un terme à ce débat et en définissant l'identité des cellules pre-mNK, nous espérons faire renaître l'intérêt pour ces cellules au pouvoir antitumoral remarquable. Par ailleurs, des cellules pre-mNK ont été identifiées chez l'Homme (données non publiées de l'équipe du Dr Zitvogel). Il sera alors très intéressant de voir si ces cellules pre-mNK humaines sont régulées de la même façon que les

cellules pre-mNK murines. Entre autres, nous pourrions déterminer si les cellules pre-mNK humaines sont diminuées ou altérées chez les patients prédisposés au développement d'un cancer, comme ce que suggèrent les données chez la souris. Mais aussi, advenant que les gènes candidats que nous avons identifiés soient effectivement responsables de la régulation des cellules pre-mNK murines, nous pourrions vérifier si ces gènes contrôlent aussi les cellules pre-mNK humaines. Dans un tel cas, ces gènes pourraient devenir des outils thérapeutiques très intéressants et novateurs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Chan, C.W., *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* **12**, 207-213 (2006).
2. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* **5**, 117-121 (1975).
3. Trinchieri, G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* **47**, 187-376 (1989).
4. Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L. & Yokoyama, W.M. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2731-2736 (2000).
5. Schulz, G., Staffileno, L.K., Reisfeld, R.A. & Dennert, G. Eradication of established human melanoma tumors in nude mice by antibody-directed effector cells. *The Journal of experimental medicine* **161**, 1315-1325 (1985).
6. Smith, B.R., Rosenthal, D.S. & Ault, K.A. Natural killer lymphocytes in hairy cell leukemia: presence of phenotypically identifiable cells with defective functional activity. *Experimental hematology* **13**, 189-193 (1985).
7. Fan, Z., *et al.* NK-cell activation by LIGHT triggers tumor-specific CD8⁺ T-cell immunity to reject established tumors. *Blood* **107**, 1342-1351 (2006).
8. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* **13**, 1-27 (1970).
9. Burnet, M. Immunological Factors in the Process of Carcinogenesis. *British medical bulletin* **20**, 154-158 (1964).
10. Qin, Z. & Blankenstein, T. A cancer immunosurveillance controversy. *Nature immunology* **5**, 3-4; author reply 4-5 (2004).
11. Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **6**, 715-727 (2006).
12. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991-998 (2002).
13. O'Sullivan, T., *et al.* Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1869-1882 (2012).
14. Ikeda, H., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 95-109 (2002).
15. Iguchi-Manaka, A., *et al.* Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J Exp Med* **205**, 2959-2964 (2008).
16. Elboim, M., *et al.* Tumor immunoediting by NKp46. *J Immunol* **184**, 5637-5644 (2010).
17. Rook, A.H., *et al.* Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *Journal of immunology* **136**, 3916-3920 (1986).

18. Dickson, R.B., *et al.* Activation of growth factor secretion in tumorigenic states of breast cancer induced by 17 beta-estradiol or v-Ha-ras oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 837-841 (1987).
19. Derynck, R., *et al.* Synthesis of messenger RNAs for transforming growth factors alpha and beta and the epidermal growth factor receptor by human tumors. *Cancer research* **47**, 707-712 (1987).
20. Andreasen, P.A., Kjoller, L., Christensen, L. & Duffy, M.J. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **72**, 1-22 (1997).
21. Biron, C.A., Byron, K.S. & Sullivan, J.L. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine* **320**, 1731-1735 (1989).
22. Stein-Streilein, J. & Guffee, J. In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection. *Journal of immunology* **136**, 1435-1441 (1986).
23. Godeny, E.K. & Gauntt, C.J. Involvement of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced murine myocarditis. *Journal of immunology* **137**, 1695-1702 (1986).
24. Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K. & Welsh, R.M. Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *Journal of immunology* **131**, 1531-1538 (1983).
25. Bukowski, J.F., Woda, B.A. & Welsh, R.M. Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *Journal of virology* **52**, 119-128 (1984).
26. Bukowski, J.F., Warner, J.F., Dennert, G. & Welsh, R.M. Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **161**, 40-52 (1985).
27. Orange, J.S., Wang, B., Terhorst, C. & Biron, C.A. Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration. *The Journal of experimental medicine* **182**, 1045-1056 (1995).
28. Sjolín, H., *et al.* Pivotal role of KARAP/DAP12 adaptor molecule in the natural killer cell-mediated resistance to murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* **195**, 825-834 (2002).
29. Sun, J.C., Beilke, J.N. & Lanier, L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **457**, 557-561 (2009).
30. Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B. & Lanier, L.L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**, 1323-1326 (2002).
31. Brown, M.G., *et al.* Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**, 934-937 (2001).
32. Daniels, K.A., *et al.* Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J Exp Med* **194**, 29-44 (2001).
33. Smith, H.R., *et al.* Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 8826-8831 (2002).
34. Dokun, A.O., *et al.* Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol* **2**, 951-956 (2001).

35. O'Leary, J.G., Goodarzi, M., Drayton, D.L. & von Andrian, U.H. T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* **7**, 507-516 (2006).
36. Cooper, M.A., *et al.* Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1915-1919 (2009).
37. Horowitz, A., Stegmann, K.A. & Riley, E.M. Activation of natural killer cells during microbial infections. *Front Immunol* **2**, 88 (2011).
38. Le-Barillec, K., *et al.* Roles for T and NK cells in the innate immune response to *Shigella flexneri*. *Journal of immunology* **175**, 1735-1740 (2005).
39. Meding, S.J., Cheng, S.C., Simon-Haarhaus, B. & Langhorne, J. Role of gamma interferon during infection with *Plasmodium chabaudi chabaudi*. *Infection and immunity* **58**, 3671-3678 (1990).
40. Paya, C.V., Patick, A.K., Leibson, P.J. & Rodriguez, M. Role of natural killer cells as immune effectors in encephalitis and demyelination induced by Theiler's virus. *J Immunol* **143**, 95-102 (1989).
41. van Dommelen, S.L., *et al.* Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity* **25**, 835-848 (2006).
42. Zhang, B., Yamamura, T., Kondo, T., Fujiwara, M. & Tabira, T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *The Journal of experimental medicine* **186**, 1677-1687 (1997).
43. Hammarberg, H., *et al.* Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 5283-5291 (2000).
44. Smeltz, R.B., Wolf, N.A. & Swanborg, R.H. Inhibition of autoimmune T cell responses in the DA rat by bone marrow-derived NK cells in vitro: implications for autoimmunity. *Journal of immunology* **163**, 1390-1397 (1999).
45. Loza, M.J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E. & Perussia, B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood* **99**, 1273-1281 (2002).
46. Lauwerys, B.R., Garot, N., Renauld, J.C. & Houssiau, F.A. Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *Journal of immunology* **165**, 1847-1853 (2000).
47. Shi, F.D., *et al.* Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nature immunology* **1**, 245-251 (2000).
48. Flodstrom, M., *et al.* Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection. *Nature immunology* **3**, 373-382 (2002).
49. King, A., Burrows, T., Verma, S., Hiby, S. & Loke, Y.W. Human uterine lymphocytes. *Hum Reprod Update* **4**, 480-485 (1998).
50. Croy, B.A., *et al.* Analysis of uterine natural killer cells in mice. *Methods Mol Biol* **612**, 465-503 (2010).
51. Croy, B.A., *et al.* Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling. *Reproduction* **126**, 149-160 (2003).
52. Manaster, I. & Mandelboim, O. The unique properties of human NK cells in the uterine mucosa. *Placenta* **29 Suppl A**, S60-66 (2008).

53. Kim, S., *et al.* In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* **3**, 523-528 (2002).
54. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193-197 (2000).
55. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* **91**, 661-672 (1997).
56. Fathman, J.W., *et al.* Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood* **118**, 5439-5447.
57. Rosmaraki, E.E., *et al.* Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* **31**, 1900-1909 (2001).
58. Lodolce, J.P., *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* **9**, 669-676 (1998).
59. Suzuki, H., Duncan, G.S., Takimoto, H. & Mak, T.W. Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* **185**, 499-505 (1997).
60. Puzanov, I.J., Bennett, M. & Kumar, V. IL-15 can substitute for the marrow microenvironment in the differentiation of natural killer cells. *J Immunol* **157**, 4282-4285 (1996).
61. DiSanto, J.P., Muller, W., Guy-Grand, D., Fischer, A. & Rajewsky, K. Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 377-381 (1995).
62. Kennedy, M.K., *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* **191**, 771-780 (2000).
63. Wu, M.F. & Raulet, D.H. Class I-deficient hemopoietic cells and nonhemopoietic cells dominantly induce unresponsiveness of natural killer cells to class I-deficient bone marrow cell grafts. *Journal of immunology* **158**, 1628-1633 (1997).
64. Kim, S., *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* **436**, 709-713 (2005).
65. Yokoyama, W.M. & Kim, S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* **24**, 249-257 (2006).
66. Raulet, D.H. & Vance, R.E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* **6**, 520-531 (2006).
67. Fernandez, N.C., *et al.* A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* **105**, 4416-4423 (2005).
68. Dorfman, J.R. & Raulet, D.H. Acquisition of Ly49 receptor expression by developing natural killer cells. *J Exp Med* **187**, 609-618 (1998).
69. Vosshenrich, C.A., *et al.* A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol* **7**, 1217-1224 (2006).
70. Luther, C., Warner, K. & Takei, F. Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127+ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways. *Blood* **117**, 4012-4021 (2011).

71. Andrews, D.M. & Smyth, M.J. A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny. *Immunol Cell Biol* **88**, 107-116 (2010).
72. Smyth, M.J. & Nutt, S.L. IL-7 and the thymus dictate the NK cell 'labor market'. *Nat Immunol* **7**, 1134-1136 (2006).
73. Colucci, F., *et al.* Differential requirement for the transcription factor PU.1 in the generation of natural killer cells versus B and T cells. *Blood* **97**, 2625-2632 (2001).
74. Boggs, S.S., Trevisan, M., Patrene, K. & Geogopoulos, K. Lack of natural killer cell precursors in fetal liver of Ikaros knockout mutant mice. *Natural immunity* **16**, 137-145 (1998).
75. Barton, K., *et al.* The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity* **9**, 555-563 (1998).
76. 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* **98**, 5164-5169 (2001).
77. Samson, S.I., *et al.* GATA-3 promotes maturation, IFN-gamma production, and liver-specific homing of NK cells. *Immunity* **19**, 701-711 (2003).
78. Lohoff, M., *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* **192**, 325-336 (2000).
79. Townsend, M.J., *et al.* T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* **20**, 477-494 (2004).
80. Kaisho, T., *et al.* Impairment of natural killer cytotoxic activity and interferon gamma production in CCAAT/enhancer binding protein gamma-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1573-1582 (1999).
81. Ito, A., *et al.* Inhibitory effect on natural killer activity of microphthalmia transcription factor encoded by the mutant mi allele of mice. *Blood* **97**, 2075-2083 (2001).
82. Lacorazza, H.D., *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* **17**, 437-449 (2002).
83. Vosshenrich, C.A., Samson-Villeger, S.I. & Di Santo, J.P. Distinguishing features of developing natural killer cells. *Curr Opin Immunol* **17**, 151-158 (2005).
84. Cao, X., *et al.* Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* **2**, 223-238 (1995).
85. Kundig, T.M., *et al.* Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science* **262**, 1059-1061 (1993).
86. Di Santo, J.P. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* **24**, 257-286 (2006).
87. Huntington, N.D., Vosshenrich, C.A. & Di Santo, J.P. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol* **7**, 703-714 (2007).
88. Gregoire, C., *et al.* The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* **220**, 169-182 (2007).
89. Carlyle, J.R., *et al.* Molecular and genetic basis for strain-dependent NK1.1 alloreactivity of mouse NK cells. *J Immunol* **176**, 7511-7524 (2006).

90. Chiossone, L., *et al.* Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* **113**, 5488-5496 (2009).
91. Wendel, M., Galani, I.E., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer research* **68**, 8437-8445 (2008).
92. Hayakawa, Y. & Smyth, M.J. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *Journal of immunology* **176**, 1517-1524 (2006).
93. Robbins, S.H., *et al.* Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *J Immunol* **168**, 2585-2589 (2002).
94. Walzer, T., *et al.* Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nat Immunol* **8**, 1337-1344 (2007).
95. Zhong, M.C. & Veillette, A. Control of T lymphocyte signaling by Ly108, a signaling lymphocytic activation molecule family receptor implicated in autoimmunity. *J Biol Chem* **283**, 19255-19264 (2008).
96. Peck, S.R. & Ruley, H.E. Ly108: a new member of the mouse CD2 family of cell surface proteins. *Immunogenetics* **52**, 63-72 (2000).
97. Silva, A., Andrews, D.M., Brooks, A.G., Smyth, M.J. & Hayakawa, Y. Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *Int Immunol* **20**, 625-630 (2008).
98. Fu, B., *et al.* CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* **133**, 350-359.
99. Takeda, K., *et al.* TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* **105**, 2082-2089 (2005).
100. Paust, S., *et al.* Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol* **11**, 1127-1135 (2010).
101. Satoh-Takayama, N., *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. *Immunity* **29**, 958-970 (2008).
102. Moretta, A., *et al.* CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor alpha/beta. *J Exp Med* **174**, 1393-1398 (1991).
103. Vosshenrich, C.A., *et al.* CD11cIcloB220+ interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* **204**, 2569-2578 (2007).
104. Montel, A.H., Bochan, M.R., Hobbs, J.A., Lynch, D.H. & Brahmi, Z. Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol* **166**, 236-246 (1995).
105. Sague, S.L., Tato, C., Pure, E. & Hunter, C.A. The regulation and activation of CD44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* **24**, 301-309 (2004).
106. Nakayama, M., *et al.* Natural killer (NK)-dendritic cell interactions generate MHC class II-dressed NK cells that regulate CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18360-18365 (2011).

107. Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P. & Diefenbach, A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* **26**, 503-517 (2007).
108. Mortier, E., *et al.* Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* **31**, 811-822 (2009).
109. Guia, S., *et al.* A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood* **111**, 5008-5016 (2008).
110. Chaix, J., *et al.* Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *Journal of immunology* **181**, 1627-1631 (2008).
111. Swann, J.B., *et al.* Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *Journal of immunology* **178**, 7540-7549 (2007).
112. Fernandez, N.C., *et al.* Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nature medicine* **5**, 405-411 (1999).
113. Turner, J.G., *et al.* Anti-CD40 antibody induces antitumor and antimetastatic effects: the role of NK cells. *J Immunol* **166**, 89-94 (2001).
114. Martin-Fontecha, A., Assarsson, E., Carbone, E., Karre, K. & Ljunggren, H.G. Triggering of murine NK cells by CD40 and CD86 (B7-2). *J Immunol* **162**, 5910-5916 (1999).
115. Zarlino, J.M., *et al.* Augmentation of human natural killer cell activity by polyinosinic acid-polycytidylic acid and its nontoxic mismatched analogues. *Journal of immunology* **124**, 1852-1857 (1980).
116. Ballas, Z.K., Rasmussen, W.L. & Krieg, A.M. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* **157**, 1840-1845 (1996).
117. Beutner, H., *et al.* Cutting Edge: A dual role for type I IFNs during polyinosinic-polycytidylic acid-induced NK cell activation. *J Immunol* **187**, 2084-2088 (2011).
118. Manetti, R., *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* **177**, 1199-1204 (1993).
119. Chace, J.H., Hooker, N.A., Mildenstein, K.L., Krieg, A.M. & Cowdery, J.S. Bacterial DNA-induced NK cell IFN-gamma production is dependent on macrophage secretion of IL-12. *Clin Immunol Immunopathol* **84**, 185-193 (1997).
120. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P. & Salazar-Mather, T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* **17**, 189-220 (1999).
121. Vivier, E., *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44-49 (2011).
122. Strowig, T., Brilot, F. & Munz, C. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol* **180**, 7785-7791 (2008).
123. Maroof, A., *et al.* Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* **29**, 295-305 (2008).
124. Zenewicz, L.A., *et al.* Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. *Immunity* **29**, 947-957 (2008).
125. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* **106**, 2252-2258 (2005).

126. Cosman, D., *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-133 (2001).
127. Robertson, M.J. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* **71**, 173-183 (2002).
128. Yokoyama, W.M. & Plougastel, B.F. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nat Rev Immunol* **3**, 304-316 (2003).
129. Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. & Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* **319**, 675-678 (1986).
130. Wilkinson, G.W., *et al.* Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* **41**, 206-212 (2008).
131. Pegram, H.J., Andrews, D.M., Smyth, M.J., Darcy, P.K. & Kershaw, M.H. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunology and cell biology* **89**, 216-224 (2011).
132. Vivier, E., Nunes, J.A. & Vely, F. Natural killer cell signaling pathways. *Science* **306**, 1517-1519 (2004).
133. Carlyle, J.R., *et al.* Mouse NKR-P1B, a novel NK1.1 antigen with inhibitory function. *Journal of immunology* **162**, 5917-5923 (1999).
134. Kumar, V. & McNerney, M.E. A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nature reviews. Immunology* **5**, 363-374 (2005).
135. Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Direct TLR2 signaling is critical for NK cell activation and function in response to vaccinia viral infection. *PLoS Pathog* **6**, e1000811 (2010).
136. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* **9**, 503-510 (2008).
137. Schatzle, J.D., *et al.* Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3870-3875 (1999).
138. Veillette, A. NK cell regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Immunol Rev* **214**, 22-34 (2006).
139. Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L. & Smyth, M.J. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* **214**, 47-55 (2006).
140. Roder, J.C., *et al.* Target-effector cell interaction in the natural killer cell system. V. Energy requirements, membrane integrity, and the possible involvement of lysosomal enzymes. *Immunology* **40**, 107-116 (1980).
141. Lieberman, J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* **3**, 361-370 (2003).
142. Tyler, D.S., *et al.* GP120 specific cellular cytotoxicity in HIV-1 seropositive individuals. Evidence for circulating CD16+ effector cells armed in vivo with cytophilic antibody. *Journal of immunology* **142**, 1177-1182 (1989).
143. Krebs, P., *et al.* NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* **113**, 6593-6602 (2009).
144. Robbins, S.H., *et al.* Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* **3**, e123 (2007).
145. Dong, Z., *et al.* Essential function for SAP family adaptors in the surveillance of hematopoietic cells by natural killer cells. *Nat Immunol* **10**, 973-980 (2009).

146. Sayos, J., *et al.* Potential pathways for regulation of NK and T cell responses: differential X-linked lymphoproliferative syndrome gene product SAP interactions with SLAM and 2B4. *Int Immunol* **12**, 1749-1757 (2000).
147. Roncagalli, R., *et al.* Negative regulation of natural killer cell function by EAT-2, a SAP-related adaptor. *Nat Immunol* **6**, 1002-1010 (2005).
148. Veillette, A., Dong, Z., Perez-Quintero, L.A., Zhong, M.C. & Cruz-Munoz, M.E. Importance and mechanism of 'switch' function of SAP family adaptors. *Immunol Rev* **232**, 229-239 (2009).
149. Bloch-Queyrat, C., *et al.* Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J Exp Med* **202**, 181-192 (2005).
150. MacFarlane, M. & Williams, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* **5**, 674-678 (2004).
151. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* **137**, 1142-1162 (1973).
152. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine* **139**, 380-397 (1974).
153. Steinman, R.M., Kaplan, G., Witmer, M.D. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* **149**, 1-16 (1979).
154. Steinman, R.M., Adams, J.C. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* **141**, 804-820 (1975).
155. Steinman, R.M., Lustig, D.S. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *The Journal of experimental medicine* **139**, 1431-1445 (1974).
156. Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M., Gutchinov, B. & Cohn, Z.A. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **152**, 1070-1084 (1980).
157. Ohnmacht, C., *et al.* Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* **206**, 549-559 (2009).
158. Dudziak, D., *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**, 107-111 (2007).
159. Pooley, J.L., Heath, W.R. & Shortman, K. Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J Immunol* **166**, 5327-5330 (2001).
160. Urban, B.C. & Roberts, D.J. Malaria, monocytes, macrophages and myeloid dendritic cells: sticking of infected erythrocytes switches off host cells. *Current opinion in immunology* **14**, 458-465 (2002).
161. Koya, T., *et al.* Importance of myeloid dendritic cells in persistent airway disease after repeated allergen exposure. *Am J Respir Crit Care Med* **173**, 42-55 (2006).
162. Hildner, K., *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322**, 1097-1100 (2008).

163. den Haan, J.M. & Bevan, M.J. Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **196**, 817-827 (2002).
164. Belz, G.T., *et al.* The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* **196**, 1099-1104 (2002).
165. Bonifaz, L., *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-1638 (2002).
166. Shortman, K. & Heath, W.R. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunol Rev* **234**, 18-31 (2010).
167. Swiecki, M., Gilfillan, S., Vermi, W., Wang, Y. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cell ablation impacts early interferon responses and antiviral NK and CD8(+) T cell accrual. *Immunity* **33**, 955-966 (2010).
168. Saxena, V., Ondr, J.K., Magnusen, A.F., Munn, D.H. & Katz, J.D. The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* **179**, 5041-5053 (2007).
169. Traver, D., *et al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154 (2000).
170. Fogg, D.K., *et al.* A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**, 83-87 (2006).
171. Onai, N., *et al.* Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* **8**, 1207-1216 (2007).
172. Naik, S.H., *et al.* Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* **7**, 663-671 (2006).
173. Liu, K., *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* **324**, 392-397 (2010).
174. Liu, K. & Nussenzweig, M.C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* **234**, 45-54 (2009).
175. Schlitzer, A., *et al.* Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9- pDC-like common dendritic cell precursor. *Blood* **119**, 6063-6071 (2012).
176. Schlitzer, A., *et al.* Identification of CCR9- murine plasmacytoid DC precursors with plasticity to differentiate into conventional DCs. *Blood* **117**, 6562-6570 (2011).
177. Chopin, M., Allan, R.S. & Belz, G.T. Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. *Frontiers in immunology* **3**, 26 (2012).
178. Leon, B., Lopez-Bravo, M. & Ardavin, C. Monocyte-derived dendritic cells. *Semin Immunol* **17**, 313-318 (2005).
179. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70 (2003).
180. Helft, J., Ginhoux, F., Bogunovic, M. & Merad, M. Origin and functional heterogeneity of non-lymphoid tissue dendritic cells in mice. *Immunological reviews* **234**, 55-75 (2010).

181. Solanilla, A., *et al.* Expression of Flt3-ligand by the endothelial cell. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **14**, 153-162 (2000).
182. Lisovsky, M., *et al.* Flt3-ligand production by human bone marrow stromal cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* **10**, 1012-1018 (1996).
183. Astier, A.L., *et al.* RNA interference screen in primary human T cells reveals FLT3 as a modulator of IL-10 levels. *Journal of immunology* **184**, 685-693 (2010).
184. McKenna, H.J., *et al.* Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95**, 3489-3497 (2000).
185. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L. & Manz, M.G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**, 305-313 (2003).
186. Waskow, C., *et al.* The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* **9**, 676-683 (2008).
187. Inaba, K., *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702 (1992).
188. Kingston, D., *et al.* The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood* **114**, 835-843 (2009).
189. Hamilton, J.A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533-544 (2008).
190. Geissmann, F., *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).
191. Shortman, K. & Naik, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* **7**, 19-30 (2007).
192. Pulendran, B., *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *Journal of immunology* **159**, 2222-2231 (1997).
193. Dakic, A., *et al.* Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol* **172**, 1018-1027 (2004).
194. Katz, J.D., Ondr, J.K., Opoka, R.J., Garcia, Z. & Janssen, E.M. Cutting edge: merocytic dendritic cells break T cell tolerance to beta cell antigens in nonobese diabetic mouse diabetes. *J Immunol* **185**, 1999-2003.
195. Qiu, C.H., *et al.* Novel subset of CD8 α + dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J Immunol* **182**, 4127-4136 (2009).
196. Poulin, L.F., *et al.* DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* **119**, 6052-6062 (2012).
197. Sancho, D., *et al.* Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* **458**, 899-903 (2009).
198. Facchetti, F., de Wolf-Peeters, C., van den Oord, J.J., de Vos, R. & Desmet, V.J. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *American journal of clinical pathology* **92**, 42-50 (1989).

199. Nakano, H., Yanagita, M. & Gunn, M.D. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* **194**, 1171-1178 (2001).
200. O'Keeffe, M., *et al.* Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* **101**, 1453-1459 (2003).
201. Liu, K., *et al.* Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nat Immunol* **8**, 578-583 (2007).
202. Allan, R.S., *et al.* Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* **25**, 153-162 (2006).
203. Trombetta, E.S. & Mellman, I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* **23**, 975-1028 (2005).
204. Granucci, F., *et al.* Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **1**, 1079-1084 (1999).
205. Mackey, M.F., *et al.* Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *Journal of immunology* **161**, 2094-2098 (1998).
206. Gerosa, F., *et al.* The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* **174**, 727-734 (2005).
207. Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. & Valiante, N.M. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* **195**, 335-341 (2002).
208. Fu, F., *et al.* Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* **62**, 659-665 (1996).
209. Inaba, K., *et al.* The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* **180**, 1849-1860 (1994).
210. Hawiger, D., *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* **194**, 769-779 (2001).
211. Maldonado-Lopez, R., *et al.* CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* **189**, 587-592 (1999).
212. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* **1**, 126-134 (2001).
213. Kovacsics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**, 243-246 (1995).
214. Firat, E., *et al.* The role of endoplasmic reticulum-associated aminopeptidase 1 in immunity to infection and in cross-presentation. *J Immunol* **178**, 2241-2248 (2007).
215. Saveanu, L., *et al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* **325**, 213-217 (2009).
216. Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M. & Rock, K.L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* **21**, 155-165 (2004).
217. Belz, G.T., *et al.* Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* **172**, 1996-2000 (2004).

218. Vremec, D., *et al.* Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* **109**, 1165-1173 (2007).
219. Yamazaki, S., *et al.* CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* **181**, 6923-6933 (2008).
220. Villadangos, J.A. & Young, L. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **29**, 352-361 (2008).
221. Iparraguirre, A., *et al.* Two distinct activation states of plasmacytoid dendritic cells induced by influenza virus and CpG 1826 oligonucleotide. *Journal of leukocyte biology* **83**, 610-620 (2008).
222. Ochando, J.C., *et al.* Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology* **7**, 652-662 (2006).
223. Martin, P., *et al.* Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha⁺ B220⁺ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* **100**, 383-390 (2002).
224. Goubier, A., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* **29**, 464-475 (2008).
225. Muhlethaler-Mottet, A., Otten, L.A., Steimle, V. & Mach, B. Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* **16**, 2851-2860 (1997).
226. LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Reis e Sousa, C., Acha-Orbea, H. & Reith, W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 899-908 (2004).
227. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* **5**, 1219-1226 (2004).
228. Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* **183**, 1789-1796 (1996).
229. Shibaki, A. & Katz, S.I. Activation through CD40 ligation induces functional Fas ligand expression by Langerhans cells. *Eur J Immunol* **31**, 3006-3015 (2001).
230. Lu, L., *et al.* Fas ligand (CD95L) and B7 expression on dendritic cells provide counter-regulatory signals for T cell survival and proliferation. *J Immunol* **158**, 5676-5684 (1997).
231. Homann, D., *et al.* CD40L blockade prevents autoimmune diabetes by induction of bitypic NK/DC regulatory cells. *Immunity* **16**, 403-415 (2002).
232. Pillarisetty, V.G., Katz, S.C., Bleier, J.I., Shah, A.B. & DeMatteo, R.P. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol* **174**, 2612-2618 (2005).
233. Plitas, G., Chaudhry, U.I., Kingham, T.P., Raab, J.R. & DeMatteo, R.P. NK dendritic cells are innate immune responders to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* **178**, 4411-4416 (2007).
234. Taieb, J., *et al.* A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* **12**, 214-219 (2006).
235. Blasius, A.L., Barchet, W., Cella, M. & Colonna, M. Development and function of murine B220⁺CD11c⁺NK1.1⁺ cells identify them as a subset of NK cells. *J Exp Med* **204**, 2561-2568 (2007).

236. Himoudi, N., *et al.* Bone marrow-derived IFN-producing killer dendritic cells account for the tumoricidal activity of unpulsed dendritic cells. *J Immunol* **181**, 6654-6663 (2008).
237. Himoudi, N., *et al.* Migratory and antigen presentation functions of IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res* **69**, 6598-6606 (2009).
238. Haliotis, T., Ball, J.K., Dexter, D. & Roder, J.C. Spontaneous and induced primary oncogenesis in natural killer (NK)-cell-deficient beige mutant mice. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **35**, 505-513 (1985).
239. GeurtsvanKessel, C.H., *et al.* Both conventional and interferon killer dendritic cells have antigen-presenting capacity during influenza virus infection. *PLoS One* **4**, e7187 (2009).
240. Hardy, A.W., Graham, D.R., Shearer, G.M. & Herbeuval, J.P. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN-alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17453-17458 (2007).
241. Huarte, E., *et al.* Tolerogen-induced interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) protect against EAE. *J Autoimmun* **37**, 328-341 (2011).
242. Welner, R.S., *et al.* Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit^{hi}CD62L⁺ lymphoid progenitors. *Blood* **109**, 4825-4931 (2007).
243. Perry, S.S., *et al.* L-selectin defines a bone marrow analog to the thymic early T-lineage progenitor. *Blood* **103**, 2990-2996 (2004).
244. Perry, S.S., Welner, R.S., Kouro, T., Kincade, P.W. & Sun, X.H. Primitive lymphoid progenitors in bone marrow with T lineage reconstituting potential. *J Immunol* **177**, 2880-2887 (2006).
245. Siracusa, M.C., Overstreet, M.G., Housseau, F., Scott, A.L. & Klein, S.L. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *J Immunol* **180**, 1423-1431 (2008).
246. Caminschi, I., *et al.* Putative IKDCs are functionally and developmentally similar to natural killer cells, but not to dendritic cells. *J Exp Med* **204**, 2579-2590 (2007).
247. Tsujimura, H., Tamura, T. & Ozato, K. Cutting edge: IFN consensus sequence binding protein/IFN regulatory factor 8 drives the development of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **170**, 1131-1135 (2003).
248. Wu, L., *et al.* RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha-dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha⁺ dendritic cells. *Immunity* **9**, 839-847 (1998).
249. Jiang, Q., Wei, H. & Tian, Z. IFN-producing killer dendritic cells contribute to the inhibitory effect of poly I:C on the progression of murine melanoma. *J Immunother* **31**, 555-562 (2008).
250. Pletneva, M., *et al.* IFN-producing killer dendritic cells are antigen-presenting cells endowed with T-cell cross-priming capacity. *Cancer Res* **69**, 6607-6614 (2009).
251. Cooper, M.A., *et al.* Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* **97**, 3146-3151 (2001).
252. Ullrich, E., *et al.* Trans-presentation of IL-15 dictates IFN-producing killer dendritic cells effector functions. *J Immunol* **180**, 7887-7897 (2008).

253. Arina, A., *et al.* Interleukin-15 liver gene transfer increases the number and function of IKDCs and NK cells. *Gene Ther* **15**, 473-483 (2008).
254. Mignot, G., *et al.* The critical role of IL-15 in the antitumor effects mediated by the combination therapy imatinib and IL-2. *J Immunol* **180**, 6477-6483 (2008).
255. Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A. & Tagaya, Y. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* **17**, 537-547 (2002).
256. Kobayashi, H., *et al.* Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance. *Blood* **105**, 721-727 (2005).
257. Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F. & Tough, D.F. IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation. *J Immunol* **167**, 1179-1187 (2001).
258. Guimond, M., *et al.* In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis. *Journal of immunology* **184**, 2769-2775 (2010).
259. Maraskovsky, E., *et al.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* **184**, 1953-1962 (1996).
260. Schluns, K.S., Stoklasek, T. & Lefrancois, L. The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 1567-1571 (2005).
261. Terme, M., *et al.* The dendritic cell-like functions of IFN-producing killer dendritic cells reside in the CD11b+ subset and are licensed by tumor cells. *Cancer Res* **69**, 6590-6597 (2009).
262. Robbins, S.H., *et al.* Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* **9**, R17 (2008).
263. Poole, T.M. & Drinkwater, N.R. Two genes abrogate the inhibition of murine hepatocarcinogenesis by ovarian hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5848-5853 (1996).
264. Esteban, L.M., *et al.* Genetic control of NKT cell numbers maps to major diabetes and lupus loci. *J Immunol* **171**, 2873-2878 (2003).
265. Suwanai, H., Wilcox, M.A., Mathis, D. & Benoist, C. A defective Il15 allele underlies the deficiency in natural killer cell activity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9305-9310 (2010).
266. Lander, E.S. & Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* **121**, 185-199 (1989).
267. Morton, N.E. Sequential tests for the detection of linkage. *American journal of human genetics* **7**, 277-318 (1955).
268. Churchill, G.A. & Doerge, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* **138**, 963-971 (1994).
269. Anderson, M.S. & Bluestone, J.A. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* **23**, 447-485 (2005).
270. Adorini, L., Gregori, S. & Harrison, L.C. Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models. *Trends Mol Med* **8**, 31-38 (2002).
271. Xie, S. & Mohan, C. Divide and conquer--the power of congenic strains. *Clin Immunol* **110**, 109-111 (2004).

272. Makino, S., *et al.* Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* **29**, 1-13 (1980).
273. Kikutani, H. & Makino, S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains. *Adv Immunol* **51**, 285-322 (1992).
274. Bach, J.F. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* **15**, 516-542 (1994).
275. Wicker, L.S., Todd, J.A. & Peterson, L.B. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* **13**, 179-200 (1995).
276. Tisch, R. & McDevitt, H. Insulin-dependent diabetes mellitus. *Cell* **85**, 291-297 (1996).
277. Acha-Orbea, H. & McDevitt, H.O. The first external domain of the nonobese diabetic mouse class II I-A beta chain is unique. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2435-2439 (1987).
278. Kanagawa, O., Martin, S.M., Vaupel, B.A., Carrasco-Marin, E. & Unanue, E.R. Autoreactivity of T cells from nonobese diabetic mice: an I-Ag7-dependent reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1721-1724 (1998).
279. Bohme, J., Schuhbaur, B., Kanagawa, O., Benoist, C. & Mathis, D. MHC-linked protection from diabetes dissociated from clonal deletion of T cells. *Science* **249**, 293-295 (1990).
280. Wicker, L.S., *et al.* Autoimmune syndromes in major histocompatibility complex (MHC) congenic strains of nonobese diabetic (NOD) mice. The NOD MHC is dominant for insulinitis and cyclophosphamide-induced diabetes. *J Exp Med* **176**, 67-77 (1992).
281. Podolin, P.L., *et al.* I-E+ nonobese diabetic mice develop insulinitis and diabetes. *J Exp Med* **178**, 793-803 (1993).
282. Rogner, U.C. & Avner, P. Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders. *Nat Rev Immunol* **3**, 243-252 (2003).
283. Stimpfling, J.H. & Richardson, A. Recombination within the Histocompatibility Locus of the Mouse. *Genetics* **51**, 831-846 (1965).
284. McDuffie, M. Derivation of diabetes-resistant congenic lines from the nonobese diabetic mouse. *Clin Immunol* **96**, 119-130 (2000).
285. Chen, J., *et al.* "Agouti NOD": identification of a CBA-derived Idd locus on Chromosome 7 and its use for chimera production with NOD embryonic stem cells. *Mamm Genome* **16**, 775-783 (2005).
286. Haskins, K., *et al.* Role for oxidative stress in the regeneration of islet beta cells? *J Investig Med* **52**, 45-49 (2004).
287. Foroud, T. Introduction to genetic linkage analysis. *Cancer investigation* **15**, 548-552 (1997).
288. Spits, H. & Lanier, L.L. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* **26**, 11-16 (2007).
289. Walzer, T., *et al.* Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 3384-3389 (2007).
290. Veillette, A. Immune regulation by SLAM family receptors and SAP-related adaptors. *Nat Rev Immunol* **6**, 56-66 (2006).

291. Yamada, H., Kishihara, K., Kong, Y.Y. & Nomoto, K. Enhanced generation of NK cells with intact cytotoxic function in CD45 exon 6-deficient mice. *J Immunol* **157**, 1523-1528 (1996).
292. Li, L., Leid, M. & Rothenberg, E.V. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science* **329**, 89-93 (2010).
293. Chiu, P.P., Ivakine, E., Mortin-Toth, S. & Danska, J.S. Susceptibility to lymphoid neoplasia in immunodeficient strains of nonobese diabetic mice. *Cancer Res* **62**, 5828-5834 (2002).
294. Hennings, H., *et al.* FVB/N mice: an inbred strain sensitive to the chemical induction of squamous cell carcinomas in the skin. *Carcinogenesis* **14**, 2353-2358 (1993).
295. Candotti, F., *et al.* Gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency: clinical comparison of retroviral vectors and treatment plans. *Blood* **120**, 3635-3646 (2012).
296. Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**, 440-442 (1988).
297. Nicholson, D.W., *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37-43 (1995).
298. Chilton, P.M., *et al.* Hematopoietic stem cells from NOD mice exhibit autonomous behavior and a competitive advantage in allogeneic recipients. *Blood* **105**, 2189-2197 (2005).
299. Kaufman, C.L., Li, H. & Ildstad, S.T. Patterns of hemopoietic reconstitution in nonobese diabetic mice: dichotomy of allogeneic resistance versus competitive advantage of disease-resistant marrow. *J Immunol* **158**, 2435-2442 (1997).
300. Prochazka, M., Serreze, D.V., Frankel, W.N. & Leiter, E.H. NOR/Lt mice: MHC-matched diabetes-resistant control strain for NOD mice. *Diabetes* **41**, 98-106 (1992).
301. Serreze, D.V., Prochazka, M., Reifsnyder, P.C., Bridgett, M.M. & Leiter, E.H. 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 (1994).
302. Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L. & Wold, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**, 621-628 (2008).
303. Van der Vieren, M., *et al.* A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity* **3**, 683-690 (1995).
304. Schnell, L., Fearn, S., Klassen, H., Schwab, M.E. & Perry, V.H. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci* **11**, 3648-3658 (1999).
305. Van der Vieren, M., *et al.* The leukocyte integrin alpha D beta 2 binds VCAM-1: evidence for a binding interface between I domain and VCAM-1. *J Immunol* **163**, 1984-1990 (1999).
306. Mabon, P.J., Weaver, L.C. & Dekaban, G.A. Inhibition of monocyte/macrophage migration to a spinal cord injury site by an antibody to the integrin alphaD: a potential new anti-inflammatory treatment. *Exp Neurol* **166**, 52-64 (2000).
307. Wu, H., *et al.* Deficiency of CD11b or CD11d results in reduced staphylococcal enterotoxin-induced T cell response and T cell phenotypic changes. *J Immunol* **173**, 297-306 (2004).

308. Bao, F., Chen, Y., Dekaban, G.A. & Weaver, L.C. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* **88**, 1335-1344 (2004).
309. Bao, F., Chen, Y., Dekaban, G.A. & Weaver, L.C. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* **90**, 1194-1204 (2004).
310. Grayson, M.H., *et al.* alphadbeta2 integrin is expressed on human eosinophils and functions as an alternative ligand for vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). *J Exp Med* **188**, 2187-2191 (1998).
311. Gurtner, G.C., *et al.* Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* **9**, 1-14 (1995).
312. Kwee, L., *et al.* Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* **121**, 489-503 (1995).
313. Koni, P.A., *et al.* Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow. *J Exp Med* **193**, 741-754 (2001).
314. McKillop, W.M., Barrett, J.W., Pasternak, S.H., Chan, B.M. & Dekaban, G.A. The extracellular domain of CD11d regulates its cell surface expression. *J Leukoc Biol* **86**, 851-862 (2009).
315. Scharffetter-Kochanek, K., *et al.* Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med* **188**, 119-131 (1998).
316. Jaeger, B.N., *et al.* Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* **209**, 565-580 (2012).
317. Costantini, C., *et al.* On the potential involvement of CD11d in co-stimulating the production of interferon-gamma by natural killer cells upon interaction with neutrophils via intercellular adhesion molecule-3. *Haematologica* **96**, 1543-1547 (2011).
318. Crozat, K., *et al.* Impact of beta2 integrin deficiency on mouse natural killer cell development and function. *Blood* **117**, 2874-2882 (2011).
319. Hatefi, Y., Haavik, A.G. & Griffiths, D.E. Reconstitution of the electron transport system. I. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 441-446 (1961).
320. Hatefi, Y., Haavik, A.G. & Griffiths, D.E. Reconstitution of the electron transport system II. Reconstitution of DPNH-cytochrome c reductase. succinic-cytochrome c reductase and DPNH, succinic-cytochrome c reductase. *Biochem Biophys Res Commun* **4**, 447-453 (1961).
321. Hatefi, Y., Haavik, A.G. & Griffiths, D.E. Studies on the electron transfer system. XLI. Reduced coenzyme Q (QH₂)-cytochrome c reductase. *J Biol Chem* **237**, 1681-1685 (1962).
322. Ferguson-Miller, S., Brautigan, D.L. & Margoliash, E. Correlation of the kinetics of electron transfer activity of various eukaryotic cytochromes c with binding to mitochondrial cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **251**, 1104-1115 (1976).
323. Wikstrom, M.K. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature* **266**, 271-273 (1977).
324. Grossman, L.I. & Lomax, M.I. Nuclear genes for cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1352**, 174-192 (1997).

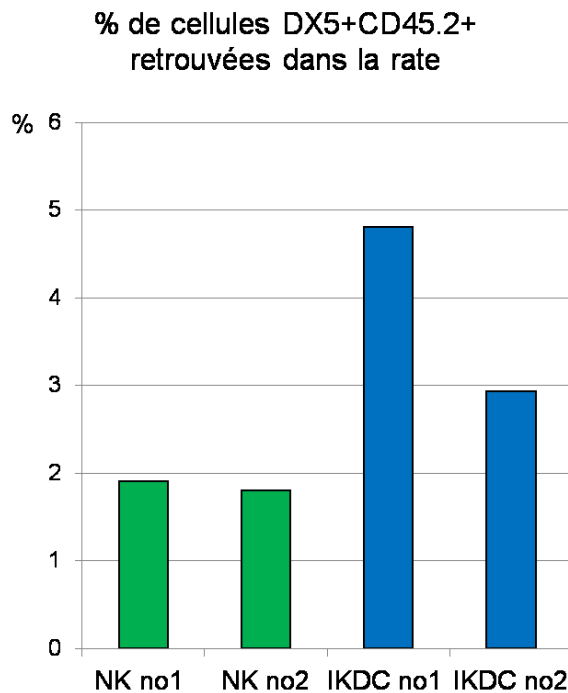
325. Tsukihara, T., *et al.* The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144 (1996).
326. Ewart, G.D., Zhang, Y.Z. & Capaldi, R.A. Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development. *FEBS Lett* **292**, 79-84 (1991).
327. Fabrizi, G.M., *et al.* Differential expression of genes specifying two isoforms of subunit VIa of human cytochrome c oxidase. *Gene* **119**, 307-312 (1992).
328. Paddison, P.J., Caudy, A.A., Bernstein, E., Hannon, G.J. & Conklin, D.S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* **16**, 948-958 (2002).
329. Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M. & Wallace, D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 6715-6719 (1980).
330. Mikami, H., Onishi, A. & Komatsu, M. Maternal inheritance of mitochondrial cytochrome c oxidase activity in mice. *J Hered* **80**, 132-136 (1989).
331. Hardy, R.R. & Hayakawa, K. B cell development pathways. *Annual review of immunology* **19**, 595-621 (2001).
332. Naik, S.H., *et al.* Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature immunology* **8**, 1217-1226 (2007).

ANNEXE 1

A



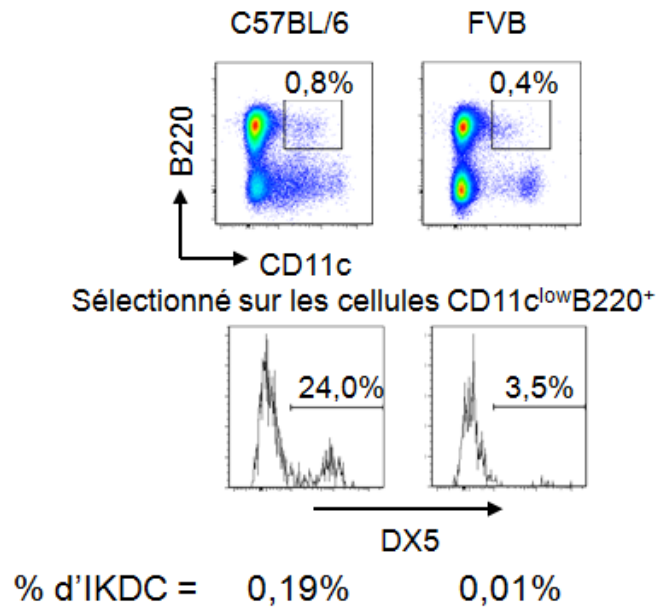
B



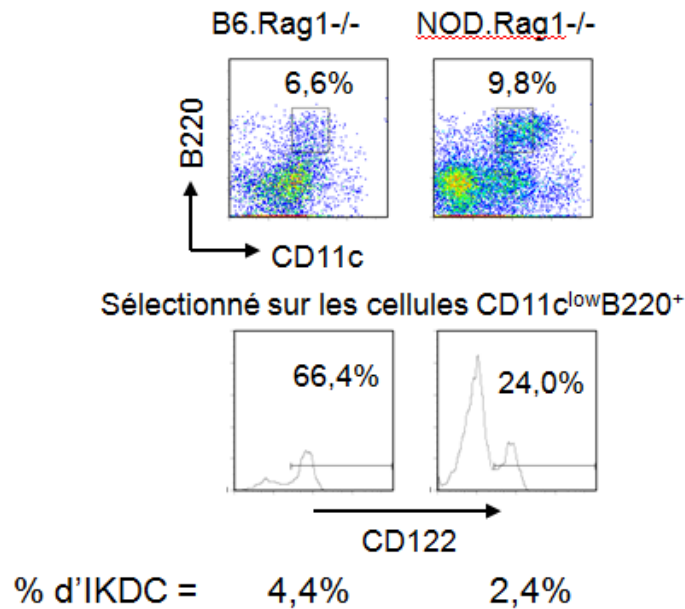
L'injection d'IKDC chez des souris NOD-scid *IL2rg*^{-/-} génère plus de cellules NK dans la rate, après 6 jours *in vivo*, que l'injection de cellules NK. En A, représentation schématique de l'expérience effectuée. Des cellules NK ou des IKDC de souris NOD CD45.2 ont été triées et injectées par intraveineuse dans des souris NOD-scid *IL2rg*^{-/-}. Six jours après le transfert des cellules, les cellules injectées sont retrouvées dans la rate grâce à l'expression de CD45.2 et de DX5 (CD49b). En B, diagramme à barre représentant le % de cellules retrouvées si des cellules NK ou des IKDC ont été injectées. N=2

ANNEXE 2

A

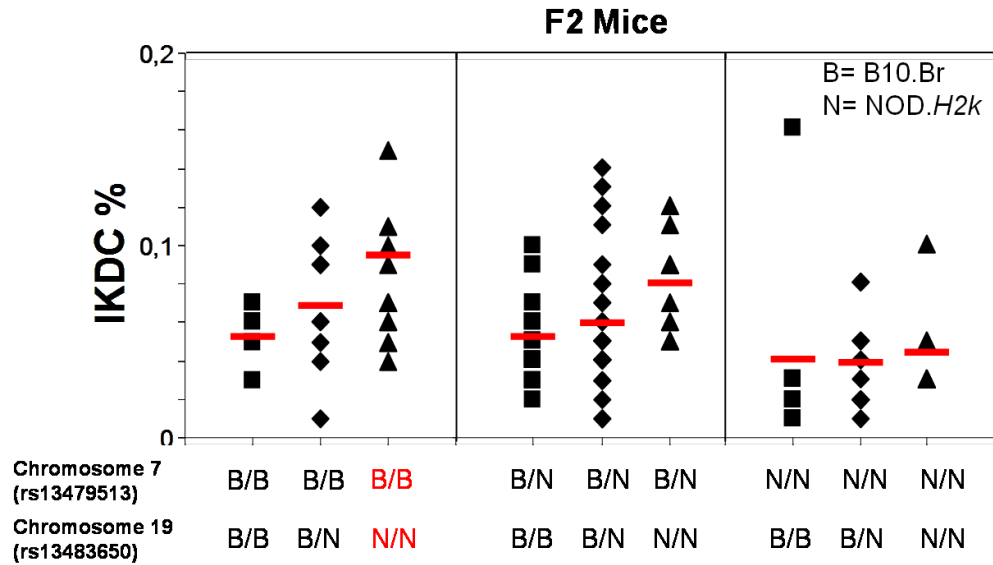


B



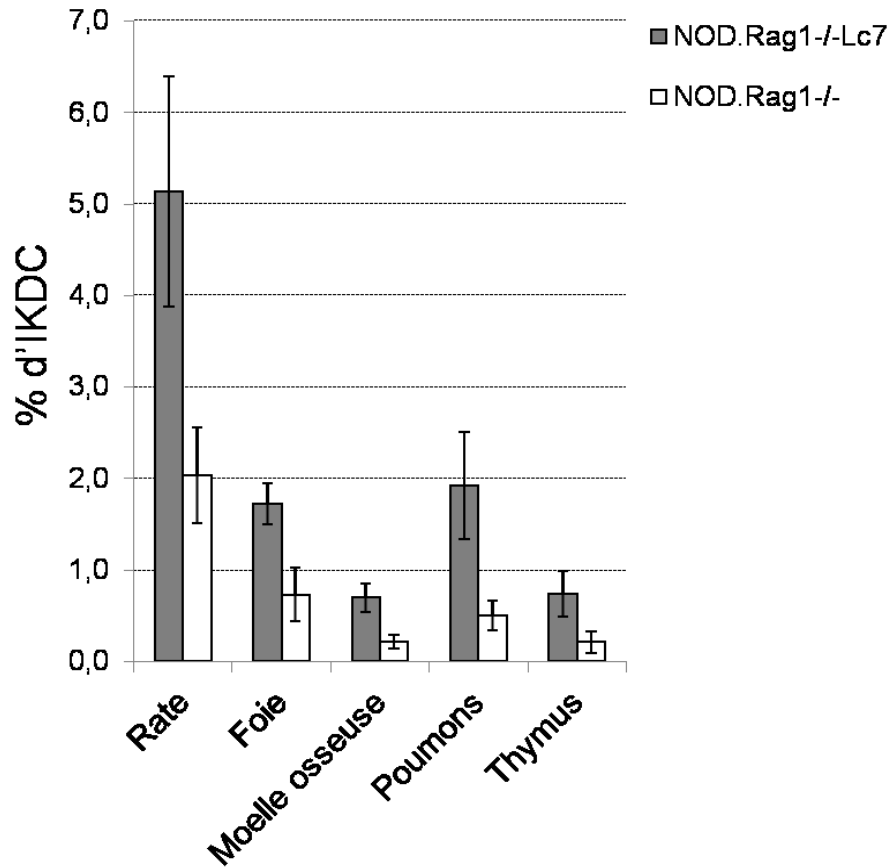
La proportion d'IKDC est réduite chez les modèles murins prédisposés au développement de tumeurs. Cette figure montre la proportion d'IKDC (CD11c^{low}B220⁺CD122⁺ ou DX5⁺) dans la rate des souris prédisposées (en A la souris FVB, en B la souris NOD.Rag1^{-/-}) et résistantes (en A la souris C57BL/6, en B la souris B6.Rag1^{-/-}) au développement de tumeurs.

ANNEXE 3



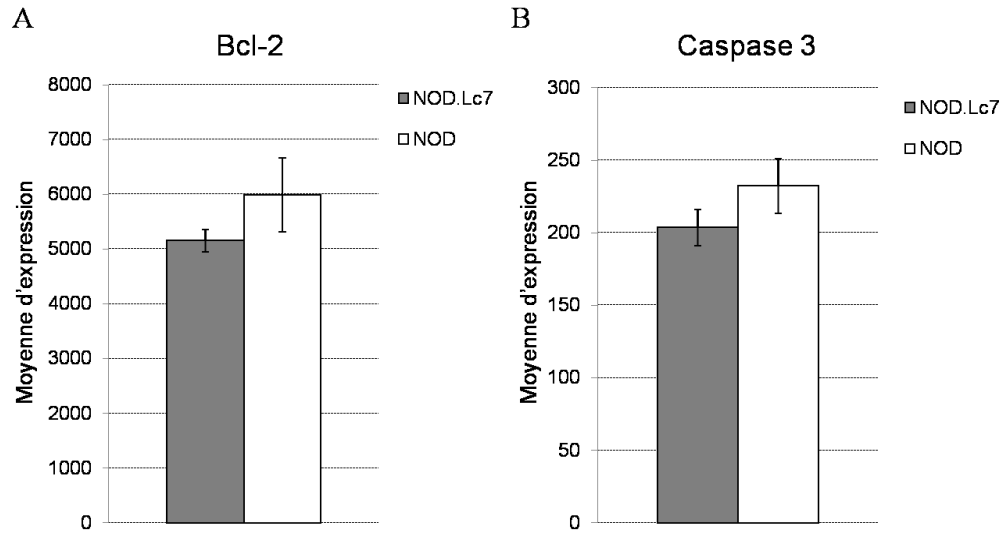
Effet de l'haplotype des SNPs du chromosome 7 et 19 sur la proportion d'IKDC chez les souris F2. Les souris F2 homozygotes pour des allèles B/B sur le chromosome 7 et homozygote N/N sur le chromosome 19 possèdent la plus grande proportion d'IKDC.

ANNEXE 4



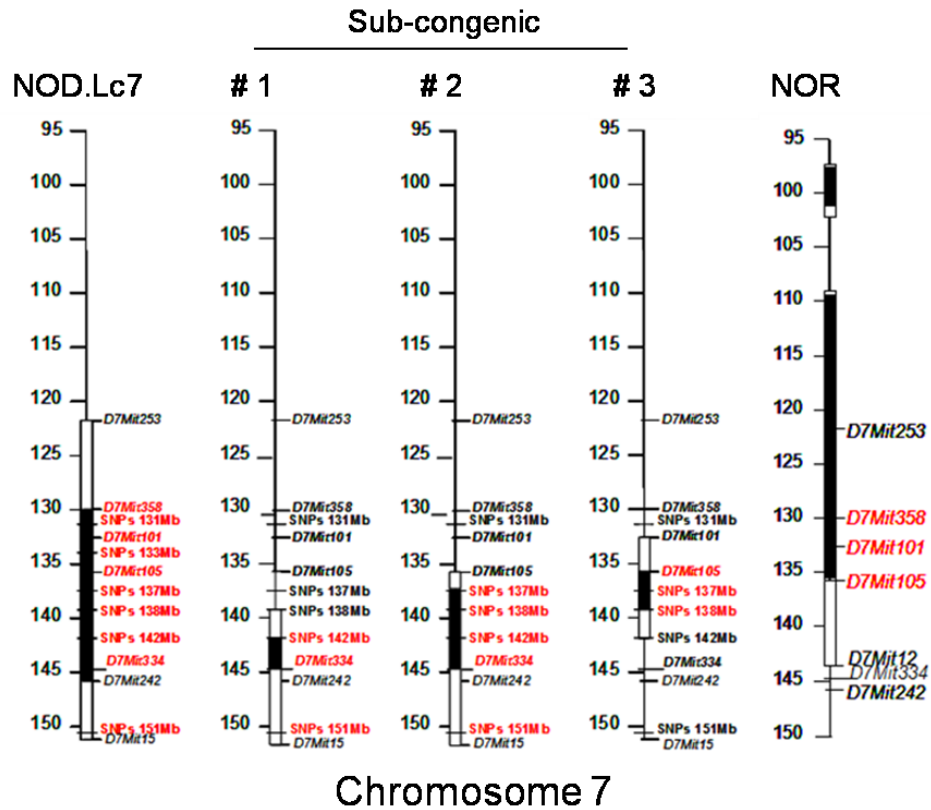
La proportion d'IKDC est réduite dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes de la souris NOD.Rag1-/-. Ce graphique présente la proportion d'IKDC (CD11c^{low}B220⁺CD122⁺) dans différents organes des souris NOD.Rag1-/-Lc7 et NOD.Rag1-/-.

ANNEXE 5



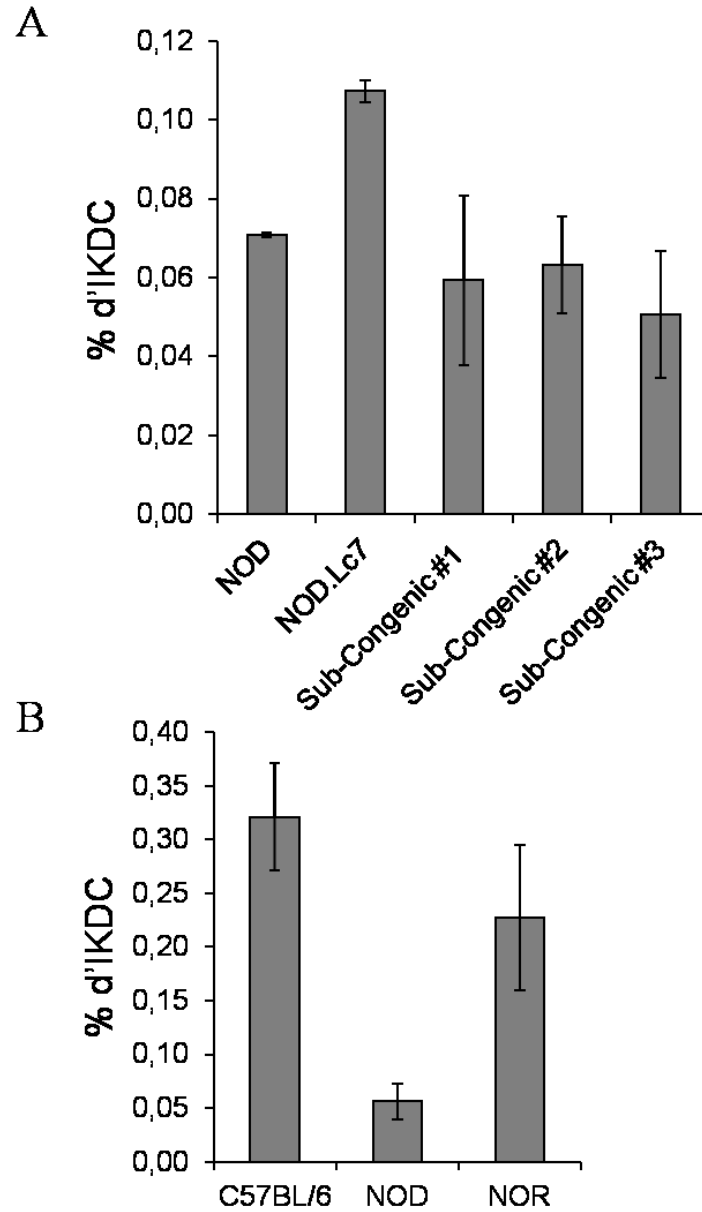
La survie des IKDC n'est pas affectée chez les IKDC de souris NOD. Ces deux graphiques présentent la moyenne d'expression de Bcl-2, en A, et de Caspase 3, en B, chez les IKDC de la rate de souris NOD.Lc7 et NOD.

ANNEXE 6



Représentation schématique du chromosome 7 pour différentes lignées de souris. Les segments en noir représentent des régions génétiques d'origine C57L ou C57BL/Ks, les segments en blanc sont d'origine inconnue et les segments composés d'une ligne fine sont d'origine NOD. Le placement des marqueurs a été déterminé selon le NCBI m37.

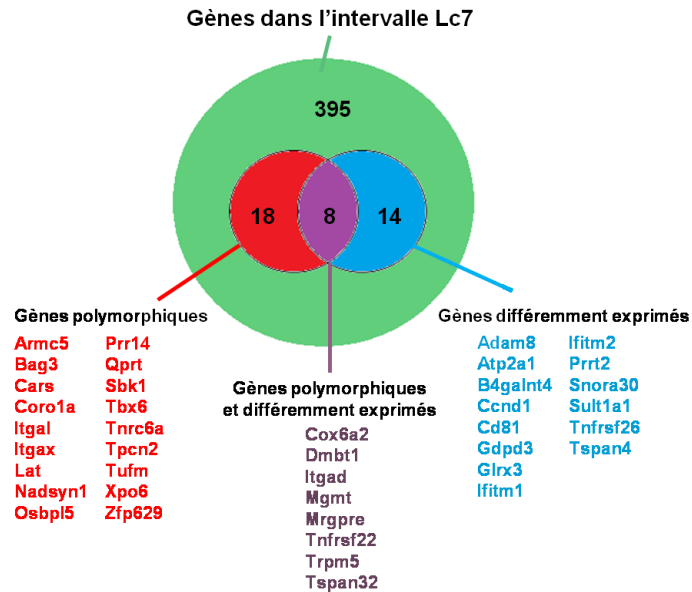
ANNEXE 7



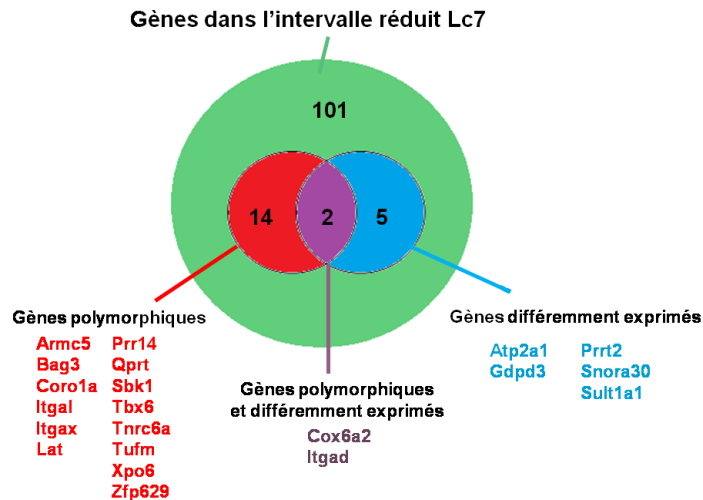
La proportion d'IKDC est élevée chez la souris NOD.Lc7 et la souris NOR/Lt. Ces graphiques représentent la proportion d'IKDC ($CD11c^{low}B220^{+}CD122^{+}$) dans la rate des souris NOD, NOD.Lc7 et sous-congéniques de NOD.Lc7 en A et des souris C57BL/6, NOD et NOR/Lt en B.

ANNEXE 8

A



B



Identification de deux gènes candidats, *ITGAD* et *COX6A2*, pour la régulation de la proportion d'IKDC. En A, le diagramme de Venne représente les gènes polymorphiques, les gènes polymorphiques et différemment exprimés et les gènes différemment exprimés inclus dans l'intervalle génétique Lc7 (D7Mit253 à D7Mit15). En B, le diagramme de Venne représente les gènes contenus dans l'intervalle génétique Lc7 réduit (D7Mit253 à D7Mit105). Seuls *ITGAD* et *COX6A2* sont à la fois polymorphiques et différemment exprimés et inclus dans l'intervalle génétique Lc7 réduit.