

RESUME

Les cellules NK sont impliquées dans la lutte contre divers pathogènes intracellulaires et dans les réponses immunitaires antitumorales. NKp46 est un récepteur activateur exprimé par toutes les cellules NK chez tous les mammifères.

La première partie de ce travail est consacrée à l'analyse d'une nouvelle souris NKp46^{iCre} générée par une approche de Knock-In qui cible sélectivement les cellules NKp46⁺. Ces souris sont fertiles et ne présentent aucun défaut apparent au niveau du développement des cellules hématopoïétiques. Il n'y a pas de défaut de maturation ni de fonctionnalité des cellules NK NKp46⁺ dans les souris NKp46^{iCre} hormis une diminution du nombre de récepteurs NKp46 exprimés à la surface des cellules NK. Le croisement de ces souris avec les souris reportrices rosa26-LSL-eYFP et rosa26-LSL-DTR nous a permis de montrer la spécificité de l'expression de l'*iCre* dans les cellules NKp46⁺. Grâce au traçage génétique *in vivo* des cellules NKp46⁺, nous avons revisité le développement des cellules NK et nous proposons un nouveau modèle de différenciation des cellules NK qui prend nouvellement en compte l'apparition des marqueurs NKp46 et CD16. En résumé, nos résultats définissent les souris NKp46^{iCre} comme le premier modèle murin de mutagenèse conditionnelle spécifique dans les cellules NKp46⁺. Ce modèle permettra la génération de nouveaux outils d'étude de la réponse immunitaire innée grâce à des croisements avec des souris possédant des gènes flanqués de sites LoxP.

La seconde partie de ce mémoire a consisté à caractériser les mécanismes de régulation de l'activation des cellules NK à partir d'une souris générée par mutagenèse aléatoire. Nous avons identifié une souris mutante, appelée *Noé* ou Ncr1^{Noé/Noé}, chez laquelle les cellules NK sont plus réactives face à des cellules tumorales *in vitro* et protègent mieux les souris lors d'infections virales. Le séquençage complet du génome de la souris Ncr1^{Noé/Noé} a révélé une mutation dans le gène codant pour le récepteur NKp46 et cette mutation prévient l'expression de NKp46 à la surface des cellules NK. Nous avons ensuite montré que l'engagement de NKp46 par ses ligands endogènes permet de calibrer le seuil de réactivité des cellules NK et cette régulation s'opère par l'intermédiaire de la diminution de l'expression du facteur de transcription Hélios. Nous avons ensuite mis en évidence que la régulation de l'activité des cellules NK *via* l'engagement de NKp46 est cruciale pour le développement ultérieur de la réponse adaptative antimicrobienne. Enfin, nous avons montré que l'on pouvait programmer des cellules NK hyper-réactives *in vivo* *via* l'injection d'anticorps bloquant anti-NKp46. En résumé, nos résultats révèlent un rôle majeur et insoupçonné du récepteur activateur NKp46 dans la calibration de la réactivité fonctionnelle des cellules NK et ouvrent la voie pour la conception de nouveaux traitements thérapeutiques anti-cancéreux.

MOTS-CLES : Natural Killer, Différenciation NK, NKp46, Helios, Réponses adaptatives

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
I- Généralités	1
II- Développement et maturation des cellules NK	2
III- Fonctions effectrices des cellules NK	3
1- Mécanismes de cytotoxicité	
1.1- Exocytose de granules lytiques	3
1.2- Voies des récepteurs de mort	4
2- Production de cytokines et de chimiokines	4
IV- Mécanismes de reconnaissance	5
1- Les récepteurs inhibiteurs	6
1.1- les récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor)	7
1.2- Les récepteurs apparentés aux lectines de type C	7
1.2.1- Famille Ly49	7
1.2.2- Récepteur CD94/NKG2	8
1.3- Les récepteurs reconnaissant les molécules indépendantes du CMH-I	9
1.4- Signalisation des récepteurs inhibiteurs	9
2- Les récepteurs activateurs	10
2.1- Les récepteurs de types KIR et Ly49	11
2.2- NKG2D	11
2.3- CD16	12
2.4- Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)	12
2.5- Les autres récepteurs activateurs	15
2.6- Signalisation des récepteurs activateurs	15
V- Education et tolérance des cellules NK	17
1- Mécanismes d'éducation par les molécules du CMH de classe I	17
1.1- Hypothèse initiale de la reconnaissance du soi manquant	17
1.2- Théories actuelles de l'éducation des cellules NK	18
a) le modèle « arming »	18
b) le modèle « disarming »	18
c) le modèle du rhéostat	19
2- Mécanismes d'éducation par les récepteurs activateurs	20
3- Plasticité de la réactivité des cellules NK	21
VI- "Priming" des cellules NK	22
VII- Rôles biologiques des cellules NK	24
1- Activité antitumorale	24
2- Activité antivirale	25
3- Rôles des cellules NK dans la mise en place de la réponse immune	27

MATERIELS ET METHODES	30
I- Matériels	30
1- Lignées de souris	30
1.1- Génération de la souris NKp46 ^{iCre} Knock In	30
1.2- Croisements des souris NKp46 ^{iCre}	30
1.3- Génération des souris <i>Noé</i> par mutagenèse aléatoire	31
1.4- Autres lignées de souris	31
2- Outils utilisés pour la cytométrie de flux	32
3- Toxine Diphtérique	34
4- Souches de pathogènes	34
5- Cytokines destinées aux activations cellulaires <i>in vitro</i>	35
II- Procédures expérimentales	35
1- Préparation des cellules	35
2- Stimulation <i>in vitro</i> des cellules NK	36
3- Marquages phénotypiques de surface et marquages intracellulaires	37
4- Génération et stimulation des cellules NK <i>in vitro</i> activées par l'IL-2 : Obtention de Lymphokine Activated Killer (LAK)	37
4.1- Génération des LAK	37
4.2- Stimulation <i>in vitro</i> des LAK	37
5- Enrichissement des cellules NK à partir de suspensions cellulaires	38
6- Différenciation <i>in vitro</i> des progéniteurs NK (NKP)	38
7- Marquage par immunofluorescence sur coupe de tissus	38
8- Traitement des souris avec la toxine Diphtérique	39
9- Co-culture des cellules NK et des cellules dendritiques CD11c⁺	39
10- Stimulation <i>in vitro</i> des lymphocytes T	39
11- Génération des chimères de moelle osseuse	39
12- Infection MCMV et titration du virus	40
13- Infection <i>Lm</i>-OVA et titration de la bactérie	40
14- Infection par le virus <i>Influenza</i>	41
15- Activités effectrices des cellules NK pendant les infections MCMV, H1N1 et <i>Lm</i>-OVA	41
16- Traitement des souris avec l'anticorps anti-NKp46 <i>in vivo</i>	41
17- Séquençage	41
18- Modélisation bio-informatique de la protéine NKp46 W32R	42
19- Transfection de lignées et test de détection de l'expression de la protéine NKp46W32R	42
20- Analyse transcriptomique	42
21- Génération des lentivirus shRNA d'Hélios	43
22- Transduction des LAK par les shRNA d'Hélios	44
23- Analyses statistiques	44

RESULTATS	45
Partie 1 : Génération et caractérisation d'une nouvelle lignée de souris NKp46^{iCre} Knock-In	45
I- Présentation et objectifs des travaux	45
II- Résultats	46
1- Caractérisation de la souris NKp46^{iCre}	46
1.1- Caractérisation de l'expression et de la fonctionnalité du récepteur NKp46	46
1.2- Caractérisation de l'expression et de la spécificité de l' <i>iCre</i>	47
2- Un modèle de différenciation des cellules NK commun à l'homme et à la souris	48
2.1- NKp46 : check point dans la maturation des cellules NK	48
2.2- CD16	49
3- Identification de sous-populations cellulaires NKp46⁺	50
3.1- Les cellules NKp46 ⁺ de l'intestin	50
3.2- Les cellules NKp46 ⁺ du foie	51
Partie 2 : Etude de de la régulation fonctionnelle des cellules NK	53
I- Présentation et objectifs des travaux	53
II- Résultats	54
1- Identification et caractérisation d'un mutant obtenu par mutagenèse aléatoire : La souris Noé	54
1.1- Hyperréactivité des cellules NK <i>in vitro</i>	54
1.2- Le phénotype Noé est intrinsèque aux cellules NK	54
1.3- Hyperréactivité des cellules NK des souris Noé <i>in vivo</i>	55
1.4- Séquençage du génome et identification de la mutation W32R dans le gène <i>NCR1</i>	56
2- L'absence d'expression de NKp46 est responsable du phénotype d'hyper-réactif des cellules NK des souris Noé	57
2.1- La complémentation génétique de la protéine NKp46 humaine restaure la réactivité des cellules NK	57
2.2- Validation du rôle de NKp46 dans l'hyperréactivité des cellules NK dans le modèle de souris NKp46 ^{iCre}	58
2.3- Hyperréactivité des cellules NK dans un autre modèle d'infection virale	58
3- Mécanismes moléculaires impliqués dans régulation du seuil de réactivité des cellules NK via NKp46 : down-régulation du facteur de transcription Hélios	59
3.1- Mise en évidence du rôle d'Hélios	59
3.2- Expression d'Hélios dans les souris <i>Ncr1^{NoelNoé}</i> et <i>Ncr1^{iCre/iCre}</i>	60
4- Rôle immunorégulateur des cellules NK sur la réponse immunitaire adaptative	60
4.1- Impact sur la réponse adaptative primaire antivirale	61
4.2- Impact sur la réponse adaptative mémoire	61
5- Manipulation de la réactivité des cellules NK via le récepteur NKp46	62
5.1- Le blocage du récepteur NKp46 <i>in vivo</i> permet de programmer des cellules NK hyper-réactives	62
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	64

Partie 1 : Génération et caractérisation d'une nouvelle lignée de souris NKp46^{iCre} Knock-In	64
Partie 2 : Etude de de la régulation fonctionnelle des cellules NK	67
1- Régulation du seuil d'activation des cellules NK <i>via</i> NKp46	67
2- Implication du facteur de transcription Hélios dans la calibration de la réactivité des cellules NK	70
3- Un rôle immunorégulateur des cellules NK	71
4- Manipulation de la réactivité des cellules NK et reprogrammation des cellules NK sauvages	73
CONCLUSION	75
Partie 1 : Génération et caractérisation d'une nouvelle lignée de souris NKp46^{iCre} Knock-In	75
Partie 2 : Etude de de la régulation fonctionnelle des cellules NK	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78
ANNEXES	86

LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
BCR : B Cell Receptor
CD : Cellule Dendritique
CLR : C-type lectin Related
CMH : Complexe Majeur D'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène
CSH : Cellules Souches Hématopoïétique
DTR : Diphtéria Toxin Receptor
ENU : N-Ethyl-N-nitrosourée
EOPS : Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique
FcR : Récepteur aux fragments constants des Ig
FCS : Fetal Calf Serum
H-2 : Histocompatibilité chez la souris
HLA : Human Leukocyte Antigen
HSV : Herpes Simplex Virus
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ILC : Innate Lymphoid Cell
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif
KI : Knock In
KIR : Killer Cell Immunoglobulin Like Receptor
LAMP : Lysosome Associated Membran Protein
LB : lymphocyte B
LCMV : Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LD : Lethal Dose
LT : Lymphocyte T
LTi : Lymphoid Tissue inducer
mCD : Cellules Dendritiques myéloïdes
MCMV : Mouse Cytomegalovirus
NCR : Natural Cytotoxicity Receptor
NK : Natural Killer
NKC : Natural Killer gene Complex
NKP : Natural Killer Precursor
PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
pCD : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
PRR : Pattern Recognition Receptor
RAG : Recombinase Activating Gene
TCR : T Cell Receptor
Tg : Transgénique

Th : T helper
TNF : Tumor Necrosis Factor
WT : Wild Type

INTRODUCTION

I- Généralités

Le système immunitaire est composé des cellules de l'immunité innée et adaptative. L'immunité innée représente la première barrière de défense contre les agressions. Les cellules composant le système immunitaire inné peuvent détecter la présence d'agents étrangers par différents mécanismes de reconnaissance impliquant les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptor), capables de détecter des motifs conservés parmi les micro-organismes appelés les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). La réponse innée est caractérisée par une réponse rapide et certaines cellules de l'immunité innée telles que les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) sont capables d'activer les cellules du système adaptatif.

La réponse immunitaire adaptative se met en place plus tardivement et est spécifique vis-à-vis du pathogène rencontré. Le système immunitaire adaptatif est composé des lymphocytes T et des lymphocytes B qui expriment des récepteurs de surface spécifiques de l'antigène. Ces récepteurs sont codés par des réarrangements somatiques du locus V (D) J et correspondent aux TCR (T Cell Receptor) exprimés par les lymphocytes T et aux BCR (B Cell Receptor) sur les lymphocytes B. Contrairement aux cellules immunitaires innées, les cellules T et B naïves doivent d'abord rencontrer leur antigène et être pré-activées par les cellules présentatrices de l'antigène pour exercer leurs fonctions effectrices. Après une phase d'expansion puis de contraction, une fraction des lymphocytes T et B spécifiques de l'antigène persiste, ce sont des lymphocytes mémoires. La mémoire immunologique permet une réponse adaptative plus rapide et plus efficace lors d'une nouvelle exposition avec le même pathogène.

Les cellules Natural Killer (NK) font partie du système immunitaire inné. Initialement, elles ont été décrites comme de grands lymphocytes granuleux doués d'une activité cytotoxique spontanée contre des cellules tumorales (Kiessling et al., 1975). Ces effecteurs sont impliqués dans la lutte contre divers pathogènes intracellulaires mais sont aussi capables de reconnaître les cellules stressées ou transformées tout en épargnant les cellules saines. Pour prévenir une rupture de la tolérance au soi, une telle activité nécessite la présence de mécanismes de régulation. Les mécanismes moléculaires permettant aux cellules NK de distinguer une cellule stressée d'une cellule saine reposent sur un équilibre dynamique résultant de l'intégration de signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par leurs récepteurs de

surface (Vivier et al., 2008). Les cellules NK activées vont lyser leurs cellules cibles *via* le relargage de granules lytiques et vont également sécréter des cytokines ainsi que des chimiokines (Vivier et al., 2008).

II- Développement et maturation des cellules NK

Le développement des cellules NK est initié dans le foie fœtal puis se déroule dans la moelle osseuse à partir de la naissance. Les cellules NK sont également présentes dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, le thymus, les ganglions lymphatiques, le foie et les poumons. Le développement des cellules NK repose sur l'acquisition d'un répertoire NK diversifié, l'acquisition de la tolérance au soi et des fonctions effectrices des cellules NK. Une récente étude a identifié les cellules Pré-pro NK comme le stade de différenciation le plus précoce dans le développement des cellules NK. Belz et son équipe ont en effet montré que les cellules $\text{Id2}^+\text{Sca1}^+\text{CD127}^+\text{CD122}^-$ correspondent au stade le plus précoce engagé dans la voie du développement des cellules NK (Carotta et al., 2011). Les cellules Pré-pro NK se différencient ensuite en cellules NKP puis en NK immatures et NK matures. Les cellules NKP se caractérisent par l'expression de la chaîne commune β des récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 (CD122) et par l'absence de marqueurs pour d'autres lignages cellulaires (Lin^-). Les cellules NKP expriment également les récepteurs aux facteurs de croissance c-kit (récepteur du facteur de cellules souches SCF) et Flt3 (FMS-Like Tyrosine kinase 3), ainsi que des facteurs de transcription nécessaires au développement lymphoïde (PU.1, GATA-3, Id2 et Ets1). A ce stade, les cellules NKP ne sont pas cytotoxiques et ne produisent pas de cytokines (Colucci et al., 2003).

Plusieurs modèles de différenciation des cellules NK ont été proposés et reposent sur l'acquisition de différents marqueurs de surface. Les cellules NK immatures sont caractérisées par l'acquisition du récepteur NK1.1 puis par l'induction de molécules d'adhésion comme CD49b (ou DX5) et de différents récepteurs activateurs et inhibiteurs (CD94/NKG2A et Ly49) qui constituent les différentes étapes de maturation et conduisent au développement de cellules NK matures (Colucci et al., 2003). Hayakawa et Smyth ainsi que notre laboratoire avons montré que la maturation des cellules NK peut être subdivisée en 4 étapes: $\text{CD11b}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{low}}$ _ $\text{CD11b}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{high}}$ _ $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{CD27}^{\text{high}}$ _ $\text{CD11b}^{\text{high}}\text{CD27}^{\text{low}}$ (Chiossone et al., 2009; Hayakawa et al., 2006).

Une des limitations majeures de ces classifications réside toutefois dans l'utilisation de marqueurs présents chez la souris mais qui ne sont pas conservés chez l'homme (par exemple

DX5 et NK1.1). Une nouvelle classification des différents stades de maturation des cellules NK de souris basée sur l'acquisition de marqueurs stables et conservés entre l'homme et la souris sera présentée et développée dans la première partie de mémoire (Partie 1, p.45).

III- Fonctions effectrices des cellules NK

Les cellules NK sont essentiellement connues pour leur fonction cytotoxique mais outre cette fonction, elles sont également capables de réguler la réponse immune par le biais de leur production de cytokines/chimiokines et de leur interaction avec les cellules dendritiques et les lymphocytes T effecteurs.

1- Mécanismes de cytotoxicité

La reconnaissance de cellules stressées et/ou infectées par les cellules NK conduit à l'activation des cellules NK et à leur dégranulation, phénomène appelé cytotoxicité naturelle. Les cellules NK reconnaissent également des cellules opsonisées par des anticorps comme notamment les IgG *via* le récepteur CD16 ce qui entraîne la dégranulation et la lyse de la cellule cible par ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity). Outre la voie dépendante de l'exocytose des granules, une autre voie faisant intervenir les interactions entre les récepteurs de mort de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor) et leurs ligands conduit à l'apoptose de la cellule cible. Par cette fonction cytotoxique, les cellules NK jouent un rôle primordial dans l'immunosurveillance des tumeurs et le contrôle de certaines infections microbiennes.

1.1- Exocytose des granules lytiques :

La reconnaissance des cellules stressées par les cellules NK conduit à la mort par apoptose de la cellule cible par l'action des différentes molécules lytiques qui sont libérées par la cellule NK et internalisées par la cellule cible. Le mécanisme de cytotoxicité correspond à l'exocytose de granules lytiques contenant de nombreuses molécules telles que la perforine (molécules de perméabilisation membranaire), les granzymes (sérines protéase) et la granulisine (molécules lytiques antimicrobiennes). La protéine LAMP1 ("Lysosomal-Associated Membrane Protein 1" ou CD107a) est un marqueur témoin des activités cytotoxiques des cellules NK car cette glycoprotéine transmembranaire est contenue à l'intérieur des granules lytiques et se retrouve à la surface membranaire des cellules NK après le processus de dégranulation (Alter et al., 2004).

1.2- La voie des récepteurs de mort

Des mécanismes alternatifs sont également utilisés par les cellules NK pour induire la mort de leurs cibles. Ils dépendent des molécules de la famille du TNF telles que le TNF- α , TRAIL

(TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et FASL (FAS ligand), exprimées par les cellules NK, et de leurs récepteurs respectifs TNF-R, FAS et TRAIL-R exprimés par les cellules cibles. Ces récepteurs font partie de la super famille des récepteurs aux TNF (TNF-R) comportant dans leur partie intra-cytoplasmique des domaines de mort ("death domain"). L'engagement de ces récepteurs entraîne l'activation de caspases qui induisent l'apoptose des cellules. Les cellules NK expriment constitutivement la protéine FAS-L (Arase et al., 1995) alors que la protéine TRAIL est seulement exprimée à la surface sur les cellules NK activées hormis une sous-population particulière de cellules NK dans le foie (Kayagaki et al., 1999; Takeda et al., 2005). A la différence des ligands FASL et TRAIL, le TNF- α est une cytokine sécrétée par les cellules NK activées.

2- Production de cytokines et de chimiokines

Les cellules NK sont essentiellement connues pour leur fonction cytotoxique mais elles sont également capables de sécréter de nombreuses chimiokines et cytokines. Les cellules NK peuvent être activées *via* la stimulation de leurs différents récepteurs de surface incluant les récepteurs « Toll-like » (TLR), les récepteurs activateurs, ou par l'intermédiaire de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-15, l'IL-12 et l'IL-18. Suite à ces différents stimuli, les cellules NK peuvent rapidement produire des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et le TNF- α ou des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGF- β (Transforming Growth Factor). L'IFN- γ est la cytokine la plus abondamment produite par les cellules NK. Elle influence aussi bien la réponse immunitaire innée, en promouvant la phagocytose par les macrophages et la maturation des cellules dendritiques, que la réponse immunitaire adaptative en favorisant la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ vers la voie Th1 (Martin-Fontecha et al., 2004). Cette cytokine joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire contre les virus et les bactéries ainsi que dans la défense antitumorale. Les cellules NK sécrètent également des facteurs de croissance tels que le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) et le G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) et de nombreuses chimiokines incluant CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP1-a), CCL4 (MIP1-b) CCL5 (RANTES), XCL1 (lymphotactin) et CXCL8 (ou IL-8). Bien que la fonction biologique des différents facteurs de croissance sécrétés par les cellules NK reste encore à clarifier, les chimiokines permettent le recrutement et l'activation des macrophages, des cellules dendritiques et des neutrophiles (Moretta et al., 2005; Vivier et al., 2011) et participent à l'orientation de la réponse immunitaire adaptative.

IV- Mécanismes de reconnaissance des cellules cibles

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques de l'antigène mais elles sont néanmoins capables de reconnaître et d'éliminer des cellules infectées ou des cellules stressées tout en épargnant les cellules saines. Leur système de discrimination du soi et du non-soi ou du soi altéré met en jeu des récepteurs inhibiteurs et activateurs. Les récepteurs inhibiteurs interagissent avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Les molécules du CMH-I sont constitutivement exprimées par les tissus sains mais leur expression peut être diminuée à la suite d'un stress causé par une infection ou par l'agent infectieux lui-même ou lors d'une transformation tumorale. Cette diminution du nombre de molécules de CMH-I diminue les signaux inhibiteurs délivrés aux cellules NK les rendant plus sensibles à l'activation. En effet, les cellules stressées et/ou infectées expriment des ligands activateurs dérivés de l'agent infectieux et/ou un certain nombre de molécules de stress qui seront reconnues par les récepteurs activateurs. Une stimulation de ces récepteurs fournit des signaux positifs aux cellules NK. L'activation des cellules NK résulte par conséquent d'une fine balance entre ces signaux positifs et négatifs délivrés par leurs récepteurs de surface (Fig.1).

1- Les récepteurs inhibiteurs

Trois types de récepteurs inhibiteurs peuvent être définis en fonction des ligands qu'ils reconnaissent : les molécules classiques du CMH-I, les molécules non conventionnelles du CMH-I ainsi que les ligands indépendants des molécules du CMH-I. Les protéines du CMH-I classiques sont codées par les différents allèles A, B et C du locus HLA (Human Leukocyte Antigen) chez l'homme et par les allèles D et K du locus H-2 chez la souris. Les molécules du CMH-I sont impliquées dans l'éducation et l'activation des lymphocytes T CD8⁺ et sont reconnues par de nombreux récepteurs inhibiteurs exprimés par les cellules NK. Les molécules non classiques du CMH de classe Ib comprennent les molécules Qa-1^b et H2-M3 chez la souris et HLA-E et HLA-G chez l'homme. Les ligands indépendants des molécules du CMH-I sont très variés et de structures différentes. Parmi ces ligands, on distingue le récepteur CD48, les ligands liés aux récepteurs apparentés aux lectines de type C (CLR> C type Lectin Related), les acides sialiques et des molécules d'adhésion et de jonction cellulaires.

1.1- Les récepteurs KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptor)

Les récepteurs KIR sont présents uniquement chez l'homme et sont codés par un ensemble de gènes polymorphes localisés sur le chromosome 19. Parmi les 14 groupes de gènes KIR décrits, 4 codent pour des récepteurs inhibiteurs qui interagissent spécifiquement avec les molécules du CMH-I (Parham, 2005). Ce locus est soumis à une variation génétique importante à la fois dans le nombre de gènes présents et dans la séquence de chaque allèle KIR (Campbell and Purdy, 2011; Parham, 2005). Deux haplotypes A et B ont été décrits au niveau du locus KIR. Un niveau supplémentaire de complexité provient de la variabilité de l'expression des gènes KIR conduisant à une grande diversité de cellules NK présents dans chaque individu. Les récepteurs KIR possèdent un partie extracellulaire à 2 (KIR2D) ou 3 (KIR3D) domaines de type Immunoglobuline (Lanier, 1998). Ces récepteurs se caractérisent également par leur partie intra-cytoplasmique. Les KIR inhibiteurs possèdent un domaine intracellulaire long (KIR-L) qui contient deux motifs ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) (Daeron et al., 2008).

1.2- Les récepteurs apparentés aux lectines de type C

1.2.1- Famille Ly49

Présents chez certains rongeurs incluant les souris et les rats mais absents chez l'homme, les récepteurs Ly49 constituent la principale famille de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des molécules H-2 polymorphiques chez la souris (Lanier, 1998). Le séquençage du groupe de gènes de la famille Ly49 situé au niveau de locus NKC (NK gene Complex) a révélé de nombreux gènes et pseudogènes polymorphes parmi les différentes souches de souris (Carlyle et al., 2008). Comme pour les récepteurs KIR, l'expression des récepteurs de la famille Ly49 résulte d'une variabilité qui entraîne une population hétérogène et variée de cellules NK. Dans les souris C57BL/6, le locus NKC comprend 9 gènes codant pour des récepteurs inhibiteurs différents (Ly49A, B, C, E, F, G, I, J et Q), 2 pour des récepteurs activateurs (Ly49H et D) et le reste du locus correspond à des pseudogènes. Parmi les récepteurs inhibiteurs, Ly49C et Ly49I reconnaissent les molécules du CMH-I d'haplotype H-2K^b alors que Ly49A reconnaît les molécules du CMH-I d'haplotype H-2D^d et H-2D^k.

1.2.2- Récepteurs CD94/NKG2

Ces récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK sous la forme d'hétérodimères composés de 2 lectines de type C. Ils reconnaissent les molécules non conventionnelles du CMH-I correspondant à Qa-1^b chez la souris et HLA-E chez l'homme. La molécule CD94 est une sous-unité invariante qui se lie de façon covalente avec chacune des sous-unités codées

par un gène de la famille NKG2. Le gène codant pour la molécule CD94 ne présente pas ou peu de polymorphisme allélique (Chang et al., 1995), alors que la famille NKG2 comprend quatre gènes *NKG2A*, *NKG2C*, *NKG2E* et *NKG2D/F* codant pour différentes protéines. NKG2A et NKG2B (qui est un variant de la protéine NKG2A) sont des récepteurs inhibiteurs alors que NKG2C et NKG2E sont activateurs. Contrairement aux autres molécules du CMH-I qui fixent et présentent des peptides du soi, les molécules HLA-E fixent et présentent des peptides dérivés de séquences « signal » des molécules du CMH-I classiques HLA-A, HLA-B, HLA-C et non classique HLA-G. La fixation de ces séquences est indispensable pour la stabilisation et l'expression membranaire des molécules HLA-E. Ainsi, une diminution de l'expression des molécules du CMH-I HLA-A, HLA-B, HLA-C et HLA-G entraîne une réduction de l'expression membranaire de la molécule HLA-E. L'interaction entre les complexes CD94/NKG2 et la molécule HLA-E permet alors aux cellules NK de surveiller indirectement l'expression des autres molécules du CMH-I pour une cellule donnée et de surveiller directement l'expression de la molécule HLA-E en elle-même. NKG2A/B contiennent des motifs ITIM dans leur domaine cytoplasmique (Lanier, 1998).

1.3- Les récepteurs reconnaissant les molécules indépendantes du CMH-I

Les molécules du CMH-I ne sont pas les seuls signaux constitutifs du soi détectés par les cellules NK. Les cellules NK expriment des récepteurs de type lectine (KLR > Killer Lectin Like) qui font partie de la famille NKR-P1 (NK cell Receptor Protein 1) et qui sont codés par des gènes situés dans le locus NKC (NK gene Complex). Ces protéines ne sont pas uniquement restreintes aux cellules NK car elles sont aussi exprimées par les cellules NKT (Natural Killer T) chez la souris. Parmi les différentes protéines de la famille NKR-P1, NKR-P1b et NKR-P1d sont des récepteurs inhibiteurs et reconnaissent la molécule Clr-b (C-type Lectin-Related ou Ocil > Osteoclast inhibitory lectin) qui est exprimée par la plupart des cellules hématopoïétiques selon le même profil d'expression que les molécules du CMH-I (Carlyle et al., 2004).

Les cellules NK murines et humaines expriment également le récepteur KLRG1 (Killer cell Lectin-like Receptor subfamily G member 1) qui reconnaît des protéines de jonctions cellulaires, les cadhérines E, N et R. L'expression de ces protéines est souvent diminuée pendant la transformation cellulaire qui accompagne l'oncogenèse. KLRG1 a été rapporté comme induisant la tolérance des cellules NK indépendamment des molécules du CMH-I mais une récente étude a mis en évidence que le développement et les fonctions effectrices de

cellules NK n'étaient pas affectés dans des souris déficientes pour ce récepteur (Grundemann et al., 2010).

2B4 (CD244), un membre de la famille CD2, est également exprimé par les cellules NK et il reconnaît le récepteur CD48. L'engagement de ce récepteur peut induire un signal activateur ou inhibiteur selon les protéines qui sont recrutées pour transduire la signalisation (Kumar and McNerney, 2005).

D'autres récepteurs inhibiteurs comme les lectines de type immunoglobuline se fixant à l'acide sialique (SIGLEC> Sialic acid-binding Immunoglobulin-type Lectins) ou les récepteurs CEACAM (Carcino Embryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1) reconnaissent des ligands indépendants des CMH-I (Kumar and McNerney, 2005).

1.4- Signalisation des récepteurs inhibiteurs

Tous les récepteurs inhibiteurs possèdent au moins un domaine ITIM dans leur partie intracytoplasmique défini par une séquence d'acides aminés particulière (Daeron et al., 2008). Lors de l'engagement du récepteur inhibiteur, les motifs ITIM sont phosphorylés par des tyrosines kinases de la famille Src ce qui entraîne le recrutement et l'activation de plusieurs phosphatases, notamment les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Src Homology region 2 domain containing Phosphatase 1/2) et la phosphatase SHIP-1 (Src-Homology 2-containing Inositol 5' Phosphatase) (Olcese et al., 1996). Les récepteurs KIR, Ly49 et NKG2A sont préférentiellement associés aux phosphatases SHP-1 et SHP-2, tandis que KLRG1 est principalement associé à SHIP-1. Ces phosphatases bloquent l'activation des cellules NK en déphosphorylant des protéines impliquées dans les voies de signalisation des récepteurs activateurs. En particulier, SHP-1 déphosphoryle la protéine Vav-1 (facteur d'échange de guanine) qui est impliquée dans les voies de signalisation conduisant à la réorganisation du cytosquelette et à la dégranulation ainsi qu'à la production de cytokines (Fig. 2) (Vivier et al., 2004; Yokoyama, 2008).

2- Les récepteurs activateurs

Les cellules NK expriment une batterie de récepteurs activateurs appartenant aux familles de récepteurs de type KIR et Ly49, à la famille des récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) ou encore à la famille des récepteurs apparentés aux lectines de type C (NKG2D et CD94/NKG2C). Ces récepteurs reconnaissent deux types de ligands spécifiques : des molécules endogènes surexprimées pendant un stress cellulaire et des molécules exogènes dérivées des pathogènes.

2.1- Les récepteurs de types KIR et Ly49

Les récepteurs activateurs appartenant aux familles KIR et Ly49 reconnaissent des molécules du CMH-I mais avec une affinité beaucoup plus faible que celle des récepteurs inhibiteurs. Chez l'homme, les KIR activateurs sont composés d'une partie extracellulaire à 2 (KIR2D) ou 3 domaines (KIR3D) et possèdent un domaine cytoplasmique court (KIR-S). On distingue les récepteurs KIR2DS1-S2-S3-S4-S5 et KIR3DS1. Chez la souris, dans la famille Ly49, Ly49H et Ly49D sont les récepteurs activateurs exprimés par de nombreuses cellules NK. Ces récepteurs activateurs ne peuvent pas induire pas eux-mêmes le signal activateur et sont associés au niveau de la membrane plasmique aux molécules adaptatrices DAP12 (ou KARAP pour « Killer cell Activating Receptor-Associated Protein ») contenant des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif) capables de transduire un signal activateur. Les récepteurs activateurs KIR et Ly49 reconnaissent les molécules classiques du CMH-I mais certains de ces récepteurs reconnaissent également des molécules différentes ou apparentées au CMH-I. En effet, chez la souris, le récepteur Ly49H reconnaît spécifiquement la protéine virale m157 dérivée du cytomégalovirus murin (MCMV), qui ressemble aux molécules du CMH-I et qui est exprimée par les cellules infectées par le virus. Cette reconnaissance est cruciale pour le contrôle précoce de la réplication virale (Arase et al., 2002). Chez l'homme, une équipe a montré que le récepteur KIR2DS4 reconnaît un ligand exprimé par des cellules tumorales de mélanomes déficientes pour les molécules du CMH-I et cette interaction entraîne l'activation des cellules NK et la lyse de ces cellules tumorales (Katz et al., 2004).

2.2- NKG2D

NKG2D est un récepteur apparenté aux lectines de type C qui est exprimé sous la forme d'homodimères uniquement. On distingue deux isoformes du récepteur NKG2D, résultant d'un épissage différent de l'ARNm, qui sont caractérisées par leur domaine intracellulaire. NKG2D-S (short) possède un domaine intra-cytoplasmique court et NKG2D-L (long) possède un domaine plus long. Chez l'homme, il n'existe que la forme NKG2D-L qui s'associe aux polypeptidex DAP10 (DNAX-Activating Protein of 10KDa). Chez la souris, NKG2D-S peut s'associer avec les protéines adaptatrices DAP10 et DAP12/KARAP alors que NKG2D-L ne s'associe qu'avec DAP10. NKG2D est exprimé par les cellules NK et les lymphocytes T CD8⁺. Les ligands de NKG2D sont faiblement exprimés sur les cellules normales mais leur expression est augmentée lors d'un stress cellulaire et transformation tumorale. Chez l'homme, NKG2D reconnaît les protéines UL16-binding (ULBP) ainsi que les

molécules ressemblant au CMH-I appelées MICA/B (MHC classe I related molecule A/B). Les ligands identifiés de NKG2D chez la souris sont les membres de la famille du transcrit 1 précoce de l'acide rétinoïque (Rae 1), la molécule du complexe mineur d'histocompatibilité H-60 et le transcrit Mult1 (Murine UL16-binding protein-like transcript 1).

2.3- CD16

CD16 (FcγRIIIA) est un récepteur de faible affinité pour les parties constantes (Fc) des immunoglobulines de type G (IgG). Il est impliqué dans le mécanisme d'ADCC. Chez la souris, CD16 est associé de façon non-covalente aux dimères FcεRIg (sous-unité g du récepteur de forte affinité pour l'IgE ou FcRg), alors qu'il est associé aux homodimères et hétérodimères de FcεRIg et CD3z (une des sous-unités du TCR) chez l'homme. Les polypeptides FcεRIg et CD3z contiennent des motifs ITAM dans leurs domaines cytoplasmiques, relayant ainsi un signal activateur après la fixation des IgG sur le CD16. CD16 est exprimé par la majorité des cellules NK matures (Lanier, 1998). Chez l'homme, CD16 est exprimé les cellules NK CD56^{dim} matures alors que les cellules NK CD56^{bright} immatures ne l'expriment pas ou faiblement (Lanier et al., 1986).

2.4- Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR)

Le groupe des récepteurs NCR comprend les protéines NKp46 (NCR1, CD335), NKp44 (NCR2, CD336) et NKp30 (NCR3, CD337). Ces récepteurs sont principalement impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules tumorales et des cellules infectées par des virus. Les NCR appartiennent à la super famille des immunoglobulines (Ig) et présentent un (NKp30 et NK44) ou 2 (NKp46) domaines extracellulaires, une partie transmembranaire et une courte queue cytoplasmique. Ces récepteurs ne possèdent pas de domaine de signalisation intracellulaire et s'associent au niveau de la membrane plasmique, par l'intermédiaire d'un acide aminé chargé positivement, à des protéines adaptatrices contenant des motifs ITAM permettant de transduire un signal positif aux cellules NK (Fig. 3). NKp30 et NKp44 sont exprimés uniquement chez l'homme alors que NKp46 est conservé chez toutes les espèces de mammifères (Walzer et al., 2007b). L'identification des ligands des NCR est sujette à d'intenses recherches et il reste encore beaucoup de ligands non identifiés (Bloushtain et al., 2004; Hecht et al., 2009; Koch et al., 2013).

NKp46: NKp46 est le premier membre de la famille des NCR à avoir été identifié (Sivori et al., 1997). NKp46 est codé par le gène *NCR1* situé sur le chromosome 19 chez l'homme et sur

le chromosome 7 chez la souris. NKp46 est une glycoprotéine de 46 kDa caractérisée par une partie extracellulaire constituée de deux domaines de type Ig, d'une région transmembranaire contenant l'acide aminé arginine impliqué dans la stabilisation des interactions avec les molécules adaptatrices et d'une courte partie intra-cytoplasmique hautement chargée. NKp46 est couplé aux polypeptides CD3z et FcR_ qui contiennent les motifs ITAM qui transduisent la signalisation et l'activation des cellules NK. NKp46 est, à ce jour, la molécule la plus spécifique des cellules NK car elle est exprimée de manière stable par toutes les cellules NK matures. De plus, ce récepteur est conservé parmi toutes les espèces de mammifères. Cependant, NKp46 est aussi exprimé dans de rares sous populations de lymphocytes Tab et Tgd ainsi que dans une population de cellules lymphoïdes intestinales (ILC) produisant de l'IL-22 (Luci et al., 2009). NKp46 reconnaît les hémagglutinines du virus influenza et les neuraminidases du virus de Sendai (Mandelboim et al., 2001). De plus, les travaux d'A. Moretta et d'O. Mandelboim ont montré l'implication de NKp46 dans la reconnaissance et la lyse de cellules tumorales comme par exemple la lignée tumorale PD1.6 (Halfteck et al., 2009). Ce récepteur reconnaît également des ligands cellulaires exprimés par des cellules autologues hépatiques et pancréatiques (Gur et al., 2012; Gur et al., 2010). Cependant, les ligands reconnus par NKp46 ne sont pas encore tous identifiés (Bottino et al., 2005).

NKp30: NKp30 est une glycoprotéine de 30 kDa codée par le gène *NCR3* situé sur le chromosome 6 et est exprimé par les cellules NK humaines quiescentes et activées. NKp30 s'associe aux molécules adaptatrices CD3z sous forme de dimères ou à CD3_ et FcR_ qui comportent des motifs ITAM relayant un signal activateur. Comme pour NKp46, cette liaison s'effectue par l'acide aminé arginine contenu dans la partie transmembranaire de NKp30. Bien que de nombreuses données suggèrent un rôle central de NKp30 dans l'immunosurveillance, le premier ligand identifié fût la protéine virale pp65 du virus HCMV (Human CytoMégaloVirus) (Arnon et al., 2005). NKp30 reconnaît également la protéine *PfEMP1* (*Plasmodium falciparum* Erythrocyte Membran Protein 1) exprimée par les globules rouges infectés par ce parasite (Mavoungou et al., 2007). Par la suite, des ligands exprimés dans le cadre d'un stress cellulaire ont été identifiés. BAT-3 (HLA-B-Associated Transcript 3), un facteur nucléaire impliqué dans l'apoptose, peut être exposé à la membrane plasmique de cellules transformées ou être sécrété sous l'effet d'un stress. Il peut alors se fixer à NKp30 et induire l'activation des cellules NK (Pogge von Strandmann et al., 2007). BAT-3 a également été détecté à la membrane des exosomes excrétés par les cellules dendritiques (Simhadri et al., 2008). Récemment, nous avons montré que la molécule B7-H6 induite lors d'un stress est reconnue par NKp30 ce qui conduit à l'activation des cellules NK (Brandt et al., 2009).

NKp44 : NKp44 est une glycoprotéine de 44 kDa codée par le gène *NCR2* situé également sur le chromosome 6. Contrairement aux récepteurs NKp46 et NKp30, NKp44 s'associe aux molécules adaptatrices KARAP/DAP12 par l'intermédiaire d'une lysine située dans le domaine transmembranaire. Ce récepteur est exprimé par les cellules NK humaines activées, par une population de cellules NK nommée « NK22 » de l'intestin et sur certains clones de cellules Tgd (Cella et al., 2009; Vitale et al., 1998). NKp44 a initialement été identifié comme un récepteur activateur reconnaissant des ligands exprimés par des cellules tumorales (Vitale et al., 1998). Cependant, l'équipe d'A. Porgador a récemment montré que la reconnaissance du facteur PCNA (Prolifération Cell Nuclear Antigen) par NKp44 était responsable de l'inhibition de l'activation des cellules NK (Rosental et al., 2011). NKp44 reconnaît également les hémagglutinines du virus influenza (Arnon et al., 2001; Ho et al., 2008), les glycoprotéines de l'enveloppe des virus de la Dengue et du West Nile (Hershkovitz et al., 2009) et les protéines de surface de différentes bactéries (*Bacille de Calmette* et Guérin, *Nocardia farcinica* et *Pseudomonas aeruginosa*). Cette reconnaissance conduit à l'activation des cellules NK (Esin et al., 2008).

2.5- Les autres récepteurs activateurs

Des molécules d'adhésion telles que CD2, les intégrines CD11b, CD11c et CD18 sont également impliquées dans l'activation des cellules NK (Kinashi, 2005). Certaines molécules comme DNAM-1 (DNAX Accessory Molecule 1) sont considérées comme des co-récepteurs pour l'activation des cellules NK car leur rôle dans l'activation des cellules NK dépend d'une stimulation concomitante d'autres récepteurs activateurs. La famille de récepteur NKR-P1 comprend également deux récepteurs activateurs, NKR-P1c (NK1.1) et NKR-P1f.

2.6- Signalisation des récepteurs activateurs

Contrairement aux récepteurs inhibiteurs dont la signalisation dépend de motifs ITIM présents dans leur domaine cytoplasmique, la majorité des récepteurs activateurs ne possède pas de motifs de signalisation dans leur courte séquence intra-cytoplasmique. Les récepteurs activateurs s'associent donc à des protéines adaptatrices capables d'induire l'activation des cellules NK. Ces protéines sont divisées en deux types: les adaptateurs contenant des motifs ITAM et DAP10.

> Les cellules NK expriment constitutivement 3 types de protéines adaptatrices: la chaîne z du récepteur des cellules T (CD3z), la chaîne g du récepteur de la partie constante des IgE (FcRg) et la protéine DAP12. L'engagement des récepteurs activateurs entraîne la

phosphorylation des tyrosines contenues dans ces motifs par des tyrosines kinases de la famille Src. La phosphorylation des ITAM induit le recrutement et l'activation des kinases Syk et ZAP-70. Ces deux kinases initient ensuite une cascade de signalisation qui conduit à la production de cytokines et de chimiokines ainsi qu'à la réorganisation du cytosquelette d'actine, essentielle pour la libération des granules cytolytiques (Fig. 4).

> DAP10 est associé au récepteur NKG2D uniquement chez l'homme (Wu et al., 1999). Il ne contient pas de motif ITAM mais permet l'activation des cellules NK par l'intermédiaire de la phosphorylation du résidu tyrosine contenu dans le motif particulier « YINM » (Lanier, 2008). Cette phosphorylation permet le recrutement de la sous-unité p85 de la phosphatidyl inositol-kinase de type 3 et de la protéine Grb2 (Growth factor receptor bound protein 2) (Fig. 5). Il s'en suit alors une cascade de signalisation qui conduit à la dégranulation de granules lytiques et la production de cytokines par les cellules NK.

V- Education et tolérance des cellules NK

1- Mécanismes d'éducation par les molécules du CMH de classe I

Bien que les cellules NK aient été initialement identifiées par leur capacité à lyser des cellules tumorales en absence de sensibilisation préalable, de nombreux mécanismes participent à la calibration et à l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK. L'adaptation des cellules NK au soi (éducation ou "licensing" des cellules NK) est un thème émergent de ce domaine de recherche. La démonstration la plus frappante de l'adaptabilité des cellules NK à leur environnement est le mécanisme d'éducation des cellules NK par les molécules du CMH-I.

1.1- Hypothèse initiale de la reconnaissance du soi manquant

K. Kärre a émis l'hypothèse selon laquelle les cellules NK distinguent les cellules saines des cellules modifiées par l'absence du soi ou « missing self ». Selon cette hypothèse, les cellules du soi saines expriment constitutivement les molécules du CMH-I à leur surface mais leur expression est fortement diminuée ou perdue lors d'un stress tumoral. Les cellules NK seraient donc capables de reconnaître le « soi manquant » sans affecter les cellules saines de l'organisme (Kärre et al., 1986). La découverte des récepteurs spécifiques de ces molécules du CMH-I, les récepteurs inhibiteurs de la famille Ly49 chez la souris et KIR chez l'homme a permis de poser une base moléculaire sur cette hypothèse.

Cependant, la théorie de l'absence du soi n'explique pas à elle seule la tolérance des cellules NK aux cellules saines. En effet, les hématies n'expriment pas de molécules de CMH-I et sont pourtant épargnées par les cellules NK. De plus, alors que les cellules NK d'une souris sauvage peuvent éliminer une greffe de cellules hématopoïétiques qui n'expriment pas les molécules du CMH-I, les cellules NK d'une souris déficientes pour le CMH-I sont incapables de le faire. D'ailleurs, il n'y a pas d'auto-immunité due aux cellules NK chez l'homme comme chez les souris déficientes pour les molécules du CMH-I (Bix et al., 1991; Liao et al., 1991; Zimmer et al., 1998). Le mécanisme sous-jacent à ces observations réside dans un défaut de réponse des cellules NK des souris déficientes pour les molécules du CMH-I, appelées cellules NK "non éduquées", contre leur cibles classiques et en réponse à une stimulation de leurs récepteurs activateurs. Un phénotype similaire est observé pour une fraction des cellules NK dont les récepteurs inhibiteurs ne sont pas engagés par des molécules de CMH-I correspondantes dans des souris sauvages (Anfossi et al., 2006; Fernandez et al., 2005; Kim et al., 2002).

1.2- Théories actuelles de l'éducation des cellules NK

L'éducation des cellules NK ou « licensing » fait référence à un processus selon lequel les cellules NK acquièrent une tolérance au soi en entrant en contact *via* ses récepteurs inhibiteurs avec les molécules du CMH-I qui leur sont présentés par des cellules « éducatrices » (Kim et al., 2005). Ce processus permet l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK. Actuellement, il existe 3 modèles d'éducation des cellules NK par les molécules du CMH-I (Fig. 6)

a) *Le modèle "arming"*: Selon ce modèle, les cellules NK immatures sont hypo-réactives par défaut et elles acquièrent leur réactivité fonctionnelle après avoir rencontré les molécules du CMH-I. Les signaux provenant de l'engagement des récepteurs inhibiteurs favoriseraient donc la maturation fonctionnelle des cellules NK (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006).

b) *Le modèle "disarming"*: Ce modèle postule que les cellules NK sont réactives par défaut dès leur premier stade de développement mais qu'elles ont été rendues anergiques par la suite ce qui permet de prévenir une rupture de la tolérance au soi. L'interaction des récepteurs inhibiteurs avec les molécules du CMH-I permet de restaurer la réactivité fonctionnelle des cellules NK (Raulet, 2006; Raulet and Vance, 2006). Ce modèle serait cohérent avec le rôle conventionnel de l'engagement des récepteurs inhibiteurs consistant à bloquer l'activation des cellules NK.

c) *Le modèle du rhéostat*: De récentes études ont montré que les cellules NK ont une réactivité augmentée ou diminuée selon l'intensité du signal inhibiteur fourni par les

molécules du CMH-I. Le modèle du rhéostat stipule que l'éducation des cellules NK peut être modulée de manière quantitative (et non de façon binaire "on/off") en fonction de l'intensité du signal fourni par les molécules du CMH-I. D. Raulet a ainsi montré que la réactivité des cellules NK était corrélée avec le nombre de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I que les cellules NK expriment. Au plus une cellule NK exprime de récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules du CMH-I, au plus sa réactivité est augmentée face à des cellules cibles et à la suite d'une stimulation de ses récepteurs activateurs (Joncker et al., 2009). Ce dernier modèle est compatible avec les modèles "arming" et "disarming" (Anfossi et al., 2006; Brodin et al., 2009).

2- Mécanismes d'éducation par les récepteurs activateurs

Dans des modèles de souris transgéniques, il a été mis en évidence qu'en réponse à une exposition constante aux ligands de NKG2D et de Ly49H, les cellules NK NKG2D⁺ ou Ly49H⁺ sont tolérantes envers les cellules exprimant ces ligands (Oppenheim et al., 2005; Sun and Lanier, 2008; Tripathy et al., 2008; Wiemann et al., 2005). Les cellules NK NKG2D⁺ et Ly49H⁺ sont également hypo-réactives face à différents stimuli mais cet état d'hypo-réactivité peut être renversé à la suite d'une stimulation plus forte telle que la stimulation par l'acide polyinosinique-polycytidylique (poly-IC), ce qui suggère que la réactivité des cellules NK peut être calibrée selon l'intensité des stimuli fournis. De plus, les cellules NK matures Ly49H⁺ deviennent hypo-réactives après avoir été transférées dans des souris transgéniques qui expriment le ligand de Ly49H (Tripathy et al., 2008). Ces observations sont compatibles avec une éducation des cellules NK selon le modèle du rhéostat. De même, les cellules NK humaines qui expriment le récepteur activateur KIR2DS2 reconnaissant spécifiquement le groupe C des allèles HLA, sont hypo-réactives chez des donneurs homozygotes C2/C2, au contraire des donneurs qui possèdent au moins un allèle de type C1 (Fauriat et al., 2010). Ces études démontrent que la réactivité des cellules NK peut aussi être modulée par les récepteurs activateurs. Cependant, cette régulation par les récepteurs activateurs est encore mal comprise et sera discutée dans la seconde partie de ce mémoire (Partie 2, p.67).

3- Plasticité de la réactivité des cellules NK

De récentes expériences ont révélé que les cellules NK matures peuvent être re-calibrées et devenir tolérantes si elles sont transférées dans un microenvironnement différent avec un nouveau référentiel des molécules du soi. En effet, des études ont montré que la réactivité des cellules NK non éduquées est rétablie lors de leur transfert dans un hôte sauvage et,

réciroquement, que les cellules NK d'une souris sauvage deviennent hypo-réactives après transfert dans un hôte déficient pour les molécules du CMH-I (Joncker et al., 2010). Notre laboratoire a également montré que les cellules NK d'un hôte neutropénique sont hypo-réactives. Ces cellules retrouvent leur réactivité après transfert dans une souris receveuse sauvage ayant un nombre normal de neutrophiles. A l'inverse, les cellules NK sauvages perdent leur réactivité après transfert dans un hôte receveur neutropénique (Jaeger et al., 2012). En résumé, ces travaux suggèrent que la réactivité des cellules NK est plastique, et que ces cellules s'adaptent à leur environnement en régulant leur seuil de réactivité. Une autre notion importante qui résulte de ces études est que le temps d'exposition des cellules NK à leur environnement dicte leur réactivité. Dans une réaction inflammatoire aiguë, lorsque les cellules NK rencontrent des cellules tumorales ou infectées dont le niveau de CMH-I est diminué et/ou qui expriment des ligands reconnus par les récepteurs activateurs, les cellules NK sont activées et contribuent à l'élimination des cellules cibles. C'est lors d'une exposition chronique à l'absence des molécules de CMH-I ou à l'expression ubiquitaire d'un des ligands des récepteurs activateurs que les cellules NK s'adaptent à cet environnement modifié en ajustant leur seuil de réactivité et en devenant hypo-réactives.

VI- "Priming" des cellules NK

En plus du processus d'éducation, les cellules NK subissent un mécanisme de "priming" nécessaire à l'expression des fonctions effectrices des cellules NK. Le terme de "priming" fait référence à un mécanisme qui confère aux cellules NK tout leur potentiel effecteur sans conduire pour autant à leur activation (Vivier et al., 2011). Ce processus conduit également à un programme de transcription spécifique qui entraîne la formation d'un stock d'ARNm codant pour l'IFN- γ , la perforine et le granzyme B (Fehniger et al., 2007; Hodge et al., 2002). Les cellules NK peuvent être pré-activées de façon directe par une interaction avec certaines cellules du système immunitaire ou de façon indirecte par des cytokines et chimiokines produites dans l'environnement. En utilisant un modèle de souris permettant l'élimination spécifique des cellules dendritiques (CD), l'équipe d'A. Diefenbach a montré que les CD sont nécessaires au "priming" des cellules NK *in vivo* et que cette pré-activation est conférée par la trans-présentation de l'IL-15 aux cellules NK par le récepteur IL-15Ra présent sur les CD (Lucas et al., 2007). L'équipe de J. Di Santo a également montré que les cellules NK des souris déficientes pour l'IL-15 présentent des capacités effectrices diminuées (Vosshenrich et al., 2005). Les macrophages sont également impliqués dans le "priming" des cellules NK *via*

la trans-présentation d'IL-15 (Mortier et al., 2009). D'autres études ont aussi montré un rôle des monocytes et des neutrophiles sur la maturation et l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK. Martin-Fontecha et son équipe a montré que l'absence de cellules NK matures fonctionnelles dans les souris déficientes pour le facteur de transcription T-bet (tbx) était due à un défaut de fonctionnalité des monocytes. Leurs résultats suggèrent que la maturation finale des cellules NK est dépendante de l'expression du récepteur IL-15Ra sur les monocytes et de la trans-présentation d'IL-15 aux cellules NK (Soderquest et al., 2011). Notre équipe a aussi montré que les cellules NK de souris neutropéniques présentaient des fonctions effectrices diminuées. Nos résultats montrent que la maturation, l'homéostasie et l'acquisition de la réactivité des cellules NK est dépendante de la présence de neutrophiles (Jaeger et al., 2012). Cependant, les mécanismes par lesquels les neutrophiles pré-activent les cellules NK restent à élucider. Les cellules NK sont également pré-activées par un ensemble de cytokines sécrétées dans le microenvironnement et qui permettent la survie, la prolifération, et l'acquisition des fonctions effectrices des cellules NK. En effet, notre équipe a montré l'implication de l'IL-18 dans le « priming » des cellules NK *in vivo*. En combinaison avec l'IL-12, l'IL-18 est nécessaire à la production d'IFN-g par les cellules NK (Chaix et al., 2008; Guia et al., 2008).

Pour conclure, l'acquisition des capacités effectrices des cellules NK est un processus complexe qui repose sur l'intégration d'une multitude de signaux comprenant la détection des molécules du CMH-I par leurs récepteurs inhibiteurs mais aussi la présence des facteurs sécrétés tels que l'IL-18 ou la trans-présentation de l'IL-15 (Fig. 7).

VII- Rôles biologiques des cellules NK

1- Activité antitumorale

Les premiers travaux montrant l'importance des cellules NK dans la réponse antitumorale ont été réalisés chez la souris et ont montré que les cellules NK ne pouvaient lyser *in vitro* que des cellules tumorales qui n'expriment pas de molécules de CMH-I (Kärre et al., 1986). Une étude réalisée *in vivo* chez des souris déficientes en cellules NK a montré l'importance des cellules NK dans l'élimination des cellules tumorales (Kim et al., 2000). Par la suite, grâce à des modèles expérimentaux de tumeurs induites ou spontanées chez la souris, il a été mis en évidence que les cellules NK jouent aussi un rôle important dans le contrôle de l'initiation, du développement et de la dissémination des tumeurs *in vivo* (Smyth et al., 2002; Vesely et al., 2011). Chez l'homme, les cas de déficiences sélectives des cellules NK sont rares et il est difficile d'évaluer le rôle des cellules NK sur l'incidence des cancers. Cependant, une étude

épidémiologique réalisée sur une période de 11 ans a montré qu'une forte activité NK était corrélée à un risque plus faible de développer un cancer (Imai et al., 2000). Dans le traitement de patients atteints de leucémie aiguë myéloblastique (LAM), l'équipe d'A. Velardi a montré le rôle bénéfique des cellules NK du donneur lors d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques sur l'amélioration de la prise de greffe et sur l'élimination des cellules tumorales. Ils ont observé que ce sont les cellules NK alloréactives du donneur dont les KIR sont incompatibles avec les molécules HLA du receveur qui sont responsables de l'effet « Greffe Versus Leucémie » (GVL). La présence de ces cellules NK corrèlent avec une meilleure survie des patients ainsi traités (Ruggeri et al., 2002). Le rétablissement rapide de la population NK après la greffe semble influencer de façon favorable sur le devenir clinique de ces patients leucémiques. Récemment, il a été montré que la présence de cellules NK intra-tumorales est un facteur pronostique favorable dans le cancer du poumon de type « non à petites cellules », dans le cancer rénal à cellules claires et dans le cancer colorectal (Eckl et al., 2012; Halama et al., 2011; Platonova et al., 2011). Afin de potentialiser le pouvoir antitumoral des cellules NK, différentes stratégies thérapeutiques ont été développées et consistent à exploiter les capacités cytotoxiques des cellules NK (Vivier et al., 2012). Ces stratégies consistent à :

- Injecter directement des cellules NK allogéniques purifiées et pré-activées. Les cellules NK d'un donneur sain sont cultivées *in vitro* et pré-activées et/ou amplifiées avec un cocktail de cytokines puis infusées directement chez des patients atteints de cancer. Des essais de transferts adoptifs de cellules NK allogéniques pré-activées avec de l'IL-2 chez des patients cancéreux se sont révélés efficaces et sans danger (Miller et al., 2005).
- Utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules tumorales afin d'induire l'activation des cellules NK et leur cytotoxicité par l'effet ADCC. L'efficacité de ces traitements a été montrée avec chez des patients atteints de lymphomes B non hodgkiniens traités avec le rituximab, un anticorps anti-CD20 (Berdeja et al., 2007; Veeramani et al.) et chez des patients atteints d'ostéosarcome et de sarcome de Ewing traités avec le cetuximab, un anticorps contre le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Pahl et al., 2011).
- Augmenter la réactivité des cellules NK endogènes en traitant les patients avec des anticorps monoclonaux dirigés contre les récepteurs inhibiteurs KIR des cellules NK afin d'inhiber l'engagement des récepteurs inhibiteurs et de favoriser l'activation des cellules NK. Notre laboratoire a généré l'anticorps humain 1-7F9 dirigé contre les récepteurs KIR2DL1, L2 et L3. Ces récepteurs reconnaissent les molécules HLA-C du CMH-I et sont exprimés par la moitié des cellules NK humaines. L'efficacité de cet anticorps à été montré *in vitro* et dans un

modèle de souris humanisées (Romagne et al., 2009; Sola et al., 2009) et est actuellement testé dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints de LAM et de myélome multiple.

2- Activité antivirale

Le rôle des cellules NK dans la défense contre les infections virales a été mis en évidence à la suite d'observations faites chez des patients présentant des déficiences en cellules NK ou des défauts fonctionnels des cellules NK. En effet, ces patients ont développé une sensibilité accrue aux infections de type Herpès virus (Biron et al., 1989; Orange, 2002). Cependant, le défaut des cellules NK chez ces patients n'a été documenté qu'après l'établissement des maladies cliniques virales et la déficience NK pourrait être la conséquence de l'infection virale. Le groupe de J.L. Casanova a décrit la première forme de déficience NK familiale. Dans cette famille, la fille aînée est décédée d'une infection par le cytomégaloVirus (CMV). Sa cadette était en bonne santé à l'âge de 13 ans malgré une déficience NK persistante (Bernard et al., 2004). Le groupe de C. Feighery a également rapporté une autre forme de déficience NK familiale chez quatre patients appartenant à une famille de parenté consanguine. Ces patients n'ont pas de cellules NK et présentent également un retard de croissance, une insuffisance surrénale, et une susceptibilité accrue aux infections virales (Eidenschenk et al., 2006). Le groupe d'E. Jouanguy a récemment identifié que le phénotype de ces patients résulte d'une mutation ponctuelle homozygote dans le gène *MCM4* (MiniChromosome Maintenance complex component 4) (Gineau et al., 2012).

L'infection par de nombreux virus comme l'herpès Simplex Virus-1 (HSV-1), le virus de la grippe^[EV1] ou le poxvirus Ectromélie peut être contrôlée par les cellules NK (Biron et al., 1999; Lee et al., 2007; Miletic et al., 2013; Vidal et al., 2011), mais la plupart des évidences attestant d'un rôle des cellules NK dans la défense précoce contre les virus ont été obtenues avec un virus de la famille Herpès, le cytomégaloVirus (Biron et al., 1989; Quinnan and Manischewitz, 1979). Les travaux de R.M. Welsh ont montré la susceptibilité des souris au virus MCMV dans lesquelles les cellules NK ont été éliminées *in vivo* et ont permis de montrer l'importance des cellules NK sur le contrôle précoce de la réplication du virus MCMV (Murine CytoMégaloVirus) (Bukowski et al., 1983; Bukowski et al., 1984). Au cours de l'infection, les cellules infectées produisent une grande quantité d'interféron de type I (notamment IFN- α / β). Les macrophages et les cellules dendritiques activés produisent également de l'IL-12 et de TNF- α (courbe rouge sur la figure 8). Ces cytokines participeraient à l'activation des cellules NK (courbe bleue sur la figure 8) et l'engagement de leurs

récepteurs activateurs permettrait leur expansion. Les cellules NK contrôlèrent la réplication virale et la propagation de l'infection à travers la lyse des cellules infectées et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires antivirales telles que le TNF- α et l'IFN- γ . A la fin de la première semaine d'infection, les lymphocytes T CD8⁺ et les lymphocytes B ont proliféré et la sécrétion d'anticorps augmente rapidement (courbe verte > T CD8⁺ et rose > production d'anticorps) ce qui correspond à une immunité stérilisante (Fig. 8).

Les cellules NK peuvent reconnaître les cellules infectées par les virus grâce à leurs récepteurs activateurs. Chez la souris, selon le fond génétique des souris, on distingue différents récepteurs capables de reconnaître des protéines dérivées du virus MCMV. Dans les souris C57BL/6, le récepteur activateur Ly49H reconnaît spécifiquement la protéine virale m157 du MCMV. Cette reconnaissance conduit à l'activation et la prolifération des cellules NK et permet le contrôle du virus (Arase et al., 2002; Brown et al., 2001).

3- Rôles des cellules NK dans la mise en place de la réponse immune

Au-delà de leur fonction effectrice antitumorale et antivirale, les cellules NK jouent un rôle important dans la mise en place de la réponse immunitaire en interagissant de façon directe ou indirecte avec les cellules environnantes, en particulier les cellules dendritiques (CD). Les CD myéloïdes (mCD) sont les cellules clé de l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. En effet, après capture de l'antigène, ces cellules migrent vers les ganglions lymphatiques où elles présentent l'antigène apprêté aux lymphocytes T, initiant ainsi la réponse immune adaptative. Outre leur fonction de présentation de l'antigène, les mCD sont capables d'interagir avec les cellules NK, et ce *via* un contact cellulaire direct. Cette communication croisée ("cross-talk") entre les cellules NK et les CD peut se produire dans les tissus périphériques enflammés et les ganglions lymphatiques, où ces deux types cellulaires sont recrutés par des chimiokines libérées dans les phases précoces de réactions inflammatoires. Ce processus implique la pré-activation des cellules NK naïves, la maturation des CD immatures et l'activation mutuelle des CD matures et des NK fonctionnelles, ce qui conditionne la mise en place de la réponse immune (Moretta et al., 2005). La sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK permet la polarisation de la réponse adaptative vers un profil th1 (Martin-Fontecha et al., 2004; Moretta et al., 2006). Les cellules NK peuvent également promouvoir la génération de la réponse adaptative en tuant les cellules cibles ce qui favorise la présentation antigénique aux lymphocytes T par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Les cellules NK interagissent également avec les cellules dendritiques plasmacytoïdes

(pCD) d'origines lymphoïdes qui sont les cellules de l'immunité innée principalement impliquées dans les réponses antivirales *via* la sécrétion d'IFN de type I et de TNF- α (Gerosa et al., 2005). Les cellules NK interagissent avec les macrophages à travers une interaction directe impliquant de nombreux récepteurs de surface et indirecte *via* la sécrétion de cytokines (Michel et al., 2012; Moretta et al., 2006; Mortier et al., 2009). Les cellules NK peuvent donc avoir un rôle d'intermédiaire entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif à l'instar des CD (Fig. 9).

L'équipe de M. Dalod a montré que les cellules NK pouvaient accélérer la réponse des lymphocytes T CD8⁺ (Robbins et al., 2007) dans le modèle d'infection par le MCMV. Dans ce système expérimental, l'activation des cellules NK pourrait limiter la production d'IFN de type I par les pCD qui est préjudiciable au maintien des cellules dendritiques conventionnelles et donc à l'activation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques du MCMV. Les cellules NK peuvent donc réguler la réponse immune en favorisant l'activation des cellules dendritiques, la présentation d'antigènes aux lymphocytes T grâce à la lyse des cellules infectées et par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ favorisant l'orientation de la réponse adaptative.

PRESENTATION ET OBJECTIFS DES TRAVAUX

Partie 1 : Caractérisation d'une nouvelle lignée de souris NKp46^{iCre} Knock

In

Bien que les connaissances fondamentales sur les cellules NK se soient largement développées ces dernières années, les mécanismes moléculaires et les interactions cellulaires qui gouvernent la biologie des cellules NK restent encore à définir. En effet, la compréhension de ces mécanismes est sévèrement limitée par le manque d'outils d'investigations permettant de cibler et/ou d'éliminer les cellules NK *in vivo*, comme par exemple la difficulté à manipuler des modèles murins dans lesquels ces dernières pourraient être spécifiquement éliminées. En cherchant à identifier un gène exprimé sélectivement dans les cellules NK, notre équipe a identifié la protéine NKp46 comme étant exprimée par toutes

les cellules NK matures et comme étant très conservée parmi toutes les espèces de mammifères (Walzer et al., 2007b).

Notre laboratoire a donc développé un modèle de souris transgéniques (NKp46-DTR-eGFP Tg ou NDE) exprimant le récepteur à la toxine diphtérique (DTR) et la protéine eGFP (enhanced Green Fluorescence Protein) sous le contrôle des séquences régulatrices humaines du gène NKp46 (Walzer et al., 2007a). Les cellules NK exprimant NKp46 expriment alors le récepteur à la toxine diphtérique et l'eGFP. Bien que la sélectivité de l'expression de la fluorescence de l'eGFP mime l'expression endogène de NKp46 dans la plupart des cellules NK des souris NDE, une variéation au niveau du locus du transgène résulte en une variation imprévisible de la pénétrance de l'expression du transgène dans une même portée de souris. Une autre souris transgénique exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur NKp46 a récemment été générée et croisée à une souris reportrice eGFP (Eckelhart et al., 2010). Cependant, seulement environ 80% des cellules NK NKp46⁺ expriment l'eGFP dans cette souris. Ces observations suggèrent donc que la régulation de l'expression du transgène Cre dans ce modèle ne correspond pas à l'expression endogène de NKp46, et restreint l'utilisation de ces souris pour le ciblage sélectif de gènes dans les cellules NK NKp46⁺.

Notre laboratoire a donc généré une lignée de souris par une approche de knock-in dans laquelle le gène codant pour la recombinaise Cre modifiée (improved Cre, *iCre*) a été inséré par recombinaison homologue à l'extrémité 3' non codante du gène NKp46. L'expression de l'*iCre* devrait ainsi être contrôlée par tous les éléments endogènes de régulation du gène NKp46.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a consisté à caractériser et à valider le modèle de souris NKp46^{*iCre*} en vérifiant la fonctionnalité et la spécificité de l'expression de l'*iCre* dans les cellules NK NKp46⁺.

Partie 2 : Etude de la régulation fonctionnelle des cellules NK

Les cellules NK participent à l'immunosurveillance tumorale et au contrôle précoce des infections microbiennes. Elles exercent leurs fonctions effectrices contre ces cellules cibles tout en étant tolérantes aux cellules saines du soi. L'activation des cellules NK doit donc être strictement régulée afin que ces cellules soient efficaces sans être dangereuse pour l'hôte. La reconnaissance des cellules cibles stressées repose sur un système de détection qui est composé de récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les récepteurs inhibiteurs reconnaissent les molécules du CMH-I qui sont constitutivement exprimées par les tissus sains mais dont

l'expression peut être diminuée à la suite du stress causé par une infection ou lors d'un processus tumoral. Cette diminution du nombre de molécules de CMH-I augmente le nombre de récepteurs inhibiteurs non engagés ce qui diminue les signaux inhibiteurs délivrés aux cellules NK et favorise leur activation. Les cellules NK expriment également divers récepteurs activateurs dont l'engagement fournit des signaux positifs et stimule leur activation. Une des thématiques de notre laboratoire consiste à étudier le rôle des cellules NK dans l'immunité anticancéreuse. Nous nous intéressons à manipuler la réactivité des cellules NK afin de favoriser leur pouvoir antitumoral. Dans ce contexte, notre laboratoire a généré un anticorps capable de bloquer les signaux inhibiteurs délivrés aux cellules NK par les molécules du CMH-I qui sont exprimées par les cellules tumorales et cet anticorps favorise donc l'activation des cellules NK. Cet anticorps est en cours d'étude dans un essai clinique de phase II chez des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës et de myélomes multiples.

Afin de proposer de nouvelles thérapies permettant de « booster » l'activité des cellules NK, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'activité effectrice des cellules NK. Pour répondre à cette question, notre stratégie a consisté à développer un programme de mutagenèse aléatoire permettant d'induire des mutations aléatoires dans le génome de souris sauvages par l'injection d'un agent mutagène chimique, l'ENU (N-éthyl-N-Nitrosourée). Nous avons ensuite cherché à étudier des souris mutantes qui présenteraient des défauts d'activation des cellules NK lors d'une stimulation contre des cellules tumorales.

REFERENCES

- Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22.
- Andrews, D.M., Estcourt, M.J., Andoniou, C.E., Wikstrom, M.E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G.R., van der Most, R.G., *et al.* (2010). Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 207, 1333-1343.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetynck, S., Stewart, C.A., Bresnahan, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., *et al.* (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331-342.
- Arase, H., Arase, N., and Saito, T. (1995). Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *JEM* 181, 1235-1238.
- Arase, H., Mocarski, E.S., Campbell, A.E., Hill, A.B., and Lanier, L.L. (2002). Direct Recognition of Cytomegalovirus by Activating and Inhibitory NK Cell Receptors. *Science* 296, 1323-1326.
- Arnon, T.I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., *et al.* (2005). Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol* 6, 515-523.
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., and Mandelboim, O. (2001). Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* 31, 2680-2689.

Berdeja, J.G., Hess, A., Lucas, D.M., O'Donnell, P., Ambinder, R.F., Diehl, L.F., Carter-Brookins, D., Newton, S., and Flinn, I.W. (2007). Systemic interleukin-2 and adoptive transfer of lymphokine-activated killer cells improves antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with relapsed B-cell lymphoma treated with rituximab. *Clin Cancer Res* 13, 2392-2399.

Bernard, F., Picard, C., Cormier-Daire, V., Eidenschenk, C., Pinto, G., Bustamante, J.C., Jouanguy, E., Teillac-Hamel, D., Colomb, V., Funck-Brentano, I., *et al.* (2004). A novel developmental and immunodeficiency syndrome associated with intrauterine growth retardation and a lack of natural killer cells. *Pediatrics* 113, 136-141.

Biron, C.A., Byron, K.S., and Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *New England Journal of Medicine* 320, 1731-1735.

Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., and Salazar-Mather, T.P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Ann. Rev. Immunol.* 17, 189-220.

Bix, M., Liao, N.-S., Zijlstra, M., Loring, J., Jaenisch, R., and Raullet, D. (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 349, 329-331.

Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodavsky, I., Bovin, N.V., and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173, 2392-2401.

Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 26, 221-226.

Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., *et al.* (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206, 1495-1503.

Brodin, P., Karre, K., and Hoglund, P. (2009). NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol* 30, 143-149.

Brown, M.G., Dokun, A.O., Heusel, J.W., Smith, H.R., Beckman, D.L., Blattenberger, E.A., Dubbelde, C.E., Stone, L.R., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (2001). Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* 292, 934-937.

Buch, T., Heppner, F.L., Tertilt, C., Heinen, T.J., Kremer, M., Wunderlich, F.T., Jung, S., and Waisman, A. (2005). A Cre-inducible diphtheria toxin receptor mediates cell lineage ablation after toxin administration. *Nat Methods* 2, 419-426.

Bukowski, J.F., Woda, B.A., Habu, S., Okumura, K., and Welsh, R.M. (1983). Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo. *J. Immunol.* 131, 1531-1538.

Bukowski, J.F., Woda, B.A., and Welsh, R.M. (1984). Pathogenesis of murine cytomegalovirus infection in natural killer cell-depleted mice. *J. Virol.* 52, 119-128.

Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* 112, 461-469.

Campbell, K.S., and Purdy, A.K. (2011). Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*.

Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., and Raullet, D.H. (2004). Missing self-recognition of Ocl/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3527-3532.

Carlyle, J.R., Mesci, A., Fine, J.H., Chen, P., Belanger, S., Tai, L.H., and Makrigiannis, A.P. (2008). Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems. *Semin Immunol* 20, 321-330.

Carotta, S., Pang, S.H., Nutt, S.L., and Belz, G.T. (2011). Identification of the earliest NK cell precursor in the mouse bone marrow. *Blood* 117, 5449-5452.

Cella, M., Fuchs, A., Vermi, W., Facchetti, F., Otero, K., Lennerz, J.K., Doherty, J.M., Mills, J.C., and Colonna, M. (2009). A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 457, 722-725.

Chaix, J., Tessmer, M.S., Hoebe, K., Fuseri, N., Ryffel, B., Dalod, M., Alexopoulou, L., Beutler, B., Brossay, L., Vivier, E., and Walzer, T. (2008). Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol* 181, 1627-1631.

Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (1995). Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *Eur.J Immunol.* 25, 2433-2437.

Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* *113*, 5488-5496.

Colucci, F., Caligiuri, M.A., and Di Santo, J.P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* *3*, 413-425.

Coudert, J.D., Scarpellino, L., Gros, F., Vivier, E., and Held, W. (2008). Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood*.

Daeron, M., Jaeger, S., Du Pasquier, L., and Vivier, E. (2008). Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future. *Immunol Rev* *224*, 11-43.

Dovat, S., Montecino-Rodriguez, E., Schuman, V., Teitell, M.A., Dorshkind, K., and Smale, S.T. (2005). Transgenic expression of Helios in B lineage cells alters B cell properties and promotes lymphomagenesis. *J Immunol* *175*, 3508-3515.

Dymecki, S.M., and Tomasiewicz, H. (1998). Using Flp-recombinase to characterize expansion of Wnt1-expressing neural progenitors in the mouse. *Dev Biol* *201*, 57-65.

Eckelhart, E., Warsch, W., Zebedin, E., Simma, O., Stoiber, D., Kolbe, T., Rulicke, T., Mueller, M., Casanova, E., and Sexl, V. (2010). A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK cell survival and development. *Blood*.

Eckl, J., Buchner, A., Prinz, P.U., Riesenberger, R., Siegert, S.I., Kammerer, R., Nelson, P.J., and Noessner, E. (2012). Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *Journal of molecular medicine* *90*, 55-66.

Eidenschenk, C., Dunne, J., Jouanguy, E., Fourlinnie, C., Gineau, L., Bacq, D., McMahon, C., Smith, O., Casanova, J.L., Abel, L., and Feighery, C. (2006). A novel primary immunodeficiency with specific natural-killer cell deficiency maps to the centromeric region of chromosome 8. *Am J Hum Genet* *78*, 721-727.

Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F.L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G., and Campa, M. (2008). Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect Immun* *76*, 1719-1727.

Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.G., Malmberg, K.J., and Michaelsson, J. (2010). Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* *115*, 1166-1174.

Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, A.R., and Ley, T.J. (2007). Acquisition of Murine NK Cell Cytotoxicity Requires the Translation of a Pre-existing Pool of Granzyme B and Perforin mRNAs. *Immunity* *26*, 798-811.

Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., and Raulet, D.H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* *105*, 4416-4423.

Gazit, R., Gruda, R., Elboim, M., Arnon, T.I., Katz, G., Achdout, H., Hanna, J., Qimron, U., Landau, G., Greenbaum, E., *et al.* (2006). Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene Ncr1. *Nat Immunol*.

Georgel, P., Du, X., Hoebe, K., and Beutler, B. (2008). ENU mutagenesis in mice. *Methods in molecular biology* *415*, 1-16.

Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G. (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J Immunol* *174*.

Gineau, L., Cognet, C., Kara, N., Lach, F.P., Dunne, J., Veturi, U., Picard, C., Trouillet, C., Eidenschenk, C., Aoufouchi, S., *et al.* (2012). Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J Clin Invest* *122*, 821-832.

Grundemann, C., Schwartzkopff, S., Koschella, M., Schweier, O., Peters, C., Voehringer, D., and Pircher, H. (2010). The NK receptor KLRG1 is dispensable for virus-induced NK and CD8+ T-cell differentiation and function in vivo. *Eur J Immunol* *40*, 1303-1314.

Guia, S., Cognet, C., de Beaucoudrey, L., Tessmer, M.S., Jouanguy, E., Berger, C., Filipe-Santos, O., Feinberg, J., Camcioglu, Y., Levy, J., *et al.* (2008). A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood* *111*, 5008-5016.

Gur, C., Doron, S., Kfir-Erenfeld, S., Horwitz, E., Abu-Tair, L., Safadi, R., and Mandelboim, O. (2012). NKp46-mediated killing of human and mouse hepatic stellate cells attenuates liver fibrosis. *Gut* 61, 885-893.

Gur, C., Porgador, A., Elboim, M., Gazit, R., Mizrahi, S., Stern-Ginossar, N., Achdout, H., Ghadially, H., Dor, Y., Nir, T., *et al.* (2010). The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 11, 121-128.

Hahm, K., Cobb, B.S., McCarty, A.S., Brown, K.E., Klug, C.A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I.L., Fisher, A.G., and Smale, S.T. (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 12, 782-796.

Halama, N., Braun, M., Kahlert, C., Spille, A., Quack, C., Rahbari, N., Koch, M., Weitz, J., Kloor, M., Zoernig, I., *et al.* (2011). Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 678-689.

Halfteck, G.G., Elboim, M., Gur, C., Achdout, H., Ghadially, H., and Mandelboim, O. (2009). Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 182, 2221-2230.

Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., and Smyth, M.J. (2006). Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 214, 47-55.

Hecht, M.L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J.L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A., and Seeberger, P.H. (2009). Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res* 8, 712-720.

Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L.A., Navarro-Sanchez, M.E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Briant-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J.W., *et al.* (2009). NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183, 2610-2621.

Ho, J.W., Hershkovitz, O., Peiris, M., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Nal, B., Chu, K., Kudelko, M., Kam, Y.W., Achdout, H., *et al.* (2008). H5-type influenza virus hemagglutinin is functionally recognized by the natural killer-activating receptor NKp44. *Journal of virology* 82, 2028-2032.

Hodge, D.L., Martinez, A., Julias, J.G., Taylor, L.S., and Young, H.A. (2002). Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control. *Mol Cell Biol* 22, 1742-1753.

Hoglund, P., and Brodin, P. (2010). Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 10, 724-734.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795-1799.

Jaeger, B.N., Donadieu, J., Cognet, C., Bernat, C., Ordonez-Rueda, D., Barlogis, V., Mahlaoui, N., Fenis, A., Narni-Mancinelli, E., Beaupain, B., *et al.* (2012). Neutrophil depletion impairs natural killer cell maturation, function, and homeostasis. *J Exp Med* 209, 565-580.

Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2009). NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182, 4572-4580.

Joncker, N.T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D.H. (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J Exp Med* 207, 2065-2072.

Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defense strategy. *Nature* 319, 675-678.

Katz, G., Gazit, R., Arnon, T.I., Gonen-Gross, T., Tarcic, G., Markel, G., Gruda, R., Achdout, H., Drize, O., Merims, S., and Mandelboim, O. (2004). MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol* 173, 1819-1825.

Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Nakayama, M., Takeda, K., Akiba, H., Tsutsui, H., Okamura, H., Nakanishi, K., Okumura, K., and Yagita, H. (1999). Expression and Function of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells. *J Immunol* 163, 1906-1913.

Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5, 112-117.

- Kim, S., Iizuka, K., Aguila, H.L., Weissman, I.L., and Yokoyama, W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*
- Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.S., Dokun, A., French, A.R., Greco, S., and Yokoyama, W.M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol* 3, 523-528.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., and Yokoyama, W.M. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709-713.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol* 5, 546-559.
- Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., and Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 34, 182-191.
- Kumar, V., and McNerney, M.E. (2005). A new self: MHC-class-I-independent Natural-killer-cell self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 5, 363-374.
- Kung, S.K. (2010). Introduction of shRNAs into primary NK cells with lentivirus. *Methods Mol Biol* 612, 233-247.
- Lang, P.A., Lang, K.S., Xu, H.C., Grusdat, M., Parish, I.A., Recher, M., Elford, A.R., Dhanji, S., Shaabani, N., Tran, C.W., *et al.* (2012). Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 1210-1215.
- Lanier, L.L. (1998). NK Cell Receptors. *Annual Review of Immunology* 16, 359-393.
- Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9, 495-502.
- Lanier, L.L., Le, A.M., Civin, C.I., Loken, M.R., and Phillips, J.H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136, 4480-4486.
- Lee, S.H., Kim, K.S., Fodil-Cornu, N., Vidal, S.M., and Biron, C.A. (2009). Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med* 206, 2235-2251.
- Lee, S.H., Miyagi, T., and Biron, C.A. (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol* 28, 252-259.
- Levy, C., Khaled, M., Iliopoulos, D., Janas, M.M., Schubert, S., Pinner, S., Chen, P.H., Li, S., Fletcher, A.L., Yokoyama, S., *et al.* (2010). Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol Cell* 40, 841-849.
- Liao, N.-S., Bix, M., Zilstra, M., Jaenish, R., and Raulat, D. (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* 253, 199-202.
- Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A. (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503-517.
- Luci, C., Reynders, A., Ivanov, I.I., Cognet, C., Chiche, L., Chasson, L., Hardwigsen, J., Anguiano, E., Banchereau, J., Chaussabel, D., *et al.* (2009). Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46(+) cell populations in gut and skin. *Nat Immunol* 10, 75-82.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055-1060.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5, 1260-1265.
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L., and Kremsner, P.G. (2007). A duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells. *J Infect Dis* 195, 1521-1531.
- Michel, T., Hentges, F., and Zimmer, J. (2012). Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front Immunol* 3, 403.
- Miletic, A., Krmpotic, A., and Jonjic, S. (2013). The evolutionary arms race between NK cells and viruses: Who gets the short end of the stick? *Eur J Immunol* 43, 867-877.

Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltsis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., *et al.* (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* *105*, 3051-3057.

Mitrovic, M., Arapovic, J., Jordan, S., Fodil-Cornu, N., Ebert, S., Vidal, S.M., Krmpotic, A., Reddehase, M.J., and Jonjic, S. (2012). The NK cell response to mouse cytomegalovirus infection affects the level and kinetics of the early CD8(+) T-cell response. *Journal of virology* *86*, 2165-2175.

Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M., and Moretta, L. (2005). Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* *26*, 668-675.

Moretta, L., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M. C., Moretta, A. (2000). Human NK-cell receptors. *Immunology today* *21*, 420-422.

Moretta, L., Ferlazzo, G., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Mingari, M.C., and Moretta, A. (2006). Effector and regulatory events during natural killer-dendritic cell interactions. *Immunol Rev* *214*, 219-228.

Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., Malynn, B.A., and Ma, A. (2009). Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* *31*, 811-822.

Narni-Mancinelli, E., Chaix, J., Fenis, A., Kerdiles, Y.M., Yessaad, N., Reynders, A., Gregoire, C., Luche, H., Ugolini, S., Tomasello, E., *et al.* (2011). Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 18324-18329.

Narni-Mancinelli, E., Jaeger, B.N., Bernat, C., Fenis, A., Kung, S., De Gassart, A., Mahmood, S., Gut, M., Heath, S.C., Estelle, J., *et al.* (2012). Tuning of natural killer cell reactivity by NKp46 and Helios calibrates T cell responses. *Science* *335*, 344-348.

Oestreich, K.J., and Weinmann, A.S. (2012). Ikaros changes the face of NuRD remodeling. *Nat Immunol* *13*, 16-18.

Olcese, L., Lang, P., Vély, F., Cambiaggi, A., Marguet, D., Blery, M., Hippen, K.L., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., *et al.* (1996). Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* *156*, 4531-4534.

Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M., and Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol* *6*, 928-937.

Orange, J.S. (2002). Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect* *4*, 1545-1558.

Pahl, J.H., Ruslan, S.E., Buddingh, E.P., Justo Santos, S., Szuhai, K., Serra, M., Gelderblom, H., Hogendoorn, P.C., Egeler, R.M., Schilham, M.W., and Lankester, A.C. (2011). Anti-EGFR antibody cetuximab enhances the cytolytic activity of natural killer cells towards osteosarcoma. *Clin Cancer Res.*

Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* *5*, 201-214.

Paust, S., Gill, H.S., Wang, B.Z., Flynn, M.P., Moseman, E.A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P.W., Compans, R.W., and von Andrian, U.H. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol* *11*, 1127-1135.

Pembroke, T., Rees, I., Gallagher, K., Jones, E., Mizen, P., Navruzov, T., Freedman, A., Fielding, C., Humphreys, I.R., Wang, E.C., *et al.* (2012). Rapid early innate control of hepatitis C virus during IFN-alpha treatment compromises adaptive CD4(+) T-cell immunity. *European journal of immunology.*

Peng, H., Jiang, X., Chen, Y., Sojka, D.K., Wei, H., Gao, X., Sun, R., Yokoyama, W.M., and Tian, Z. (2013). Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest* *123*, 1444-1456.

Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., Andre, P., Dieu-Nosjean, M.C., Alifano, M., Regnard, J.F., *et al.* (2011). Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* *71*, 5412-5422.

Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V.R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V.L., Borchmann, P., *et al.* (2007). Human leukocyte antigen-B-

associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity* 27, 965-974.

Quinnan, G.V., and Manischewitz, J.E. (1979). The role of natural killer cells and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 150, 1549-1554.

Raulet, D.H. (2006). Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol* 18, 145-150.

Raulet, D.H., and Vance, R.E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6, 520-531.

Reynders, A., Yessaad, N., Vu Manh, T.P., Dalod, M., Fenis, A., Aubry, C., Nikitas, G., Escaliere, B., Renauld, J.C., Dussurget, O., *et al.* (2011). Identity, regulation and in vivo function of gut NKp46+RORgammat+ and NKp46+RORgammat- lymphoid cells. *The EMBO journal* 30, 2934-2947.

Robbins, S.H., Bessou, G., Cornillon, A., Zucchini, N., Rupp, B., Ruzsics, Z., Sacher, T., Tomasello, E., Vivier, E., Koszinowski, U.H., and Dalod, M. (2007). Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog* 3, e123.

Romagne, F., Andre, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Jr., Blaser, B.W., *et al.* (2009). Pre-clinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR therapeutic antibody that augments NK-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114, 2667-2677.

Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M.Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L.A., Aharoni, A., Cerwenka, A., *et al.* (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol* 187, 5693-5702.

Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., *et al.* (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097-2100.

Satoh-Takayama, N., Lesjean-Pottier, S., Vieira, P., Sawa, S., Eberl, G., Vosshenrich, C.A., and Di Santo, J.P. (2010). IL-7 and IL-15 independently program the differentiation of intestinal CD3-NKp46+ cell subsets from Id2-dependent precursors. *J Exp Med* 207, 273-280.

Simhadri, V.R., Reiners, K.S., Hansen, H.P., Topolar, D., Simhadri, V.L., Nohroudi, K., Kufer, T.A., Engert, A., and Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS ONE* 3, e3377.

Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., and Moretta, A. (1997). p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 186, 1129-1136.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861.

Soderquest, K., Walzer, T., Zafirova, B., Klavinskis, L.S., Polic, B., Vivier, E., Lord, G.M., and Martin-Fontecha, A. (2011). Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J Immunol* 186, 3304-3308.

Sola, C., Andre, P., Lemmers, C., Fuseri, N., Bonnafous, C., Blery, M., Wagtmann, N.R., Romagne, F., Vivier, E., and Ugolini, S. (2009). Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12879-12884.

Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N., Mebius, R.E., *et al.* (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nature reviews. Immunology* 13, 145-149.

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1, 4.

Sun, J.C., and Lanier, L.L. (2008). Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. *J Exp Med* 205, 1819-1828.

Takeda, K., Cretney, E., Hayakawa, Y., Ota, T., Akiba, H., Ogasawara, K., Yagita, H., Kinoshita, K., Okumura, K., and Smyth, M.J. (2005). TRAIL identifies immature natural killer cells in newborn mice and adult mouse liver. *Blood* 105, 2082-2089.

Tripathy, S.K., Keyel, P.A., Yang, L., Pingel, J.T., Cheng, T.P., Schneeberger, A., and Yokoyama, W.M. (2008). Continuous engagement of a self-specific activation receptor induces NK cell tolerance. *J Exp Med* 205, 1829-1841.

Veeramani, S., Wang, S.Y., Dahle, C., Blackwell, S., Jacobus, L., Knutson, T., Button, A., Link, B.K., and Weiner, G.J. Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism. *Blood* 118, 3347-3349.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* 29, 235-271.

Vidal, S.M., Khakoo, S.I., and Biron, C.A. (2011). Natural Killer Cell Responses during Viral Infections: Flexibility and Conditioning of Innate Immunity by Experience. *Curr Opin Virol* 1, 497-512.

Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., and Moretta, A. (1998). Nkp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp.Med.* 187, 2065-2072.

Vivier, E., Nunes, J.A., and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44-49.

Vivier, E., Spits, H., and Cupedo, T. (2009). Interleukin-22-producing innate immune cells: new players in mucosal immunity and tissue repair? *Nat Rev Immunol* 9, 229-234.

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510.

Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews. Immunology* 12, 239-252.

Vonarbourg, C., Mortha, A., Bui, V.L., Hernandez, P.P., Kiss, E.A., Hoyler, T., Flach, M., Bengsch, B., Thimme, R., Holscher, C., *et al.* (2010). Regulated Expression of Nuclear Receptor RORgammat Confers Distinct Functional Fates to NK Cell Receptor-Expressing RORgammat(+) Innate Lymphocytes. *Immunity* 33, 736-751.

Vosshenrich, C.A., Ranson, T., Samson, S.I., Corcuff, E., Colucci, F., Rosmaraki, E.E., and Di Santo, J.P. (2005). Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol* 174, 1213-1221.

Waggoner, S.N., Cornberg, M., Selin, L.K., and Welsh, R.M. (2011). Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* 481, 394-398.

Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S.H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., *et al.* (2007a). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via Nkp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3384-3389.

Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E. (2007b). Natural killer cells: from CD3(-)Nkp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol* 19, 365-372.

Walzer, T., and Vivier, E. (2011). G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration. *Trends Immunol* 32, 486-492.

Wiemann, K., Mittrucker, H.W., Feger, U., Welte, S.A., Yokoyama, W.M., Spies, T., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2005). Systemic NKG2D Down-Regulation Impairs NK and CD8 T Cell Responses In Vivo. *J Immunol* 175, 720-729.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Xie, X., Stadnisky, M.D., Coats, E.R., Ahmed Rahim, M.M., Lundgren, A., Xu, W., Makrigiannis, A.P., and Brown, M.G. (2010). MHC class I Dk expression in hematopoietic and nonhematopoietic cells confers natural killer cell resistance to murine cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8754-8759.

Yokoyama, W.M. (2008). Inhibitory receptors signal activation. *Immunity* 29, 515-517.

Yokoyama, W.M., and Kim, S. (2006). Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol Rev* 214, 143-154.

Yokoyama, W.M., Kim, S., and French, A.R. (2004). The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22, 405-429.

- Zafirova, B., Mandaric, S., Antulov, R., Krmpotic, A., Jonsson, H., Yokoyama, W.M., Jonjic, S., and Polic, B. (2009). Altered NK cell development and enhanced NK cell-mediated resistance to mouse cytomegalovirus in NKG2D-deficient mice. *Immunity* *31*, 270-282.
- Zhang, D.J., Wang, Q., Wei, J., Baimukanova, G., Buchholz, F., Stewart, A.F., Mao, X., and Killeen, N. (2005). Selective expression of the Cre recombinase in late-stage thymocytes using the distal promoter of the Lck gene. *J Immunol* *174*, 6725-6731.
- Zimmer, J., Donato, L., Hanau, D., Cazenave, J.P., Tongio, M.M., Moretta, A., and Salle, H. (1998). Activity and Phenotype of Natural Killer Cells in Peptide Transporter (TAP)-deficient Patients (Type I Bare Lymphocyte Syndrome). *J Exp Med* *187*, 117-122.