

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ALLOREACTIVITE
NK EN GREFFE ALLOGENIQUE DE CELLULES
SOUCHES HEMATOPOIETIQUES :
IMPLICATION DES RECEPTEURS KIR**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIQUE

Discipline : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par

DENIS laure

A Nantes, le 21 octobre 2005, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : **Professeur Jean-Claude BENSA**, *Grenoble*
Professeur Jean-François MOREAU, *Bordeaux*
Examineurs : **Professeur Jean-Yves MULLER**, *Nantes*
Docteur Marc BONNEVILLE, *Nantes*
Docteur Françoise MECHINAUD, *Nantes*
Directeur de thèse : **Docteur Jean-Denis BIGNON**, *Nantes*

SOMMAIRE

ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION : GENERALITES	6
1 La greffe allogénique de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH)	7
1.1. Les objectifs d'une greffe	7
1.2. Immunologie de la greffe	9
1.2.1. Généralités sur les acteurs du système immunitaire impliqués en greffe de CSH	9
1.2.2. La situation allogénique : réactions bénéfiques et délétères	11
1.2.3. Les marqueurs d'histocompatibilité HLA	15
1.3. Les différents paramètres définissant la greffe de CSH	20
1.3.1. Les sources de greffons de CSH	20
1.3.2. Le choix du donneur dans les greffes de CSH	21
1.3.3. Les conditionnements pré-greffe	22
1.3.4. Traitement prophylactique et curatif de la réaction du greffon contre l'hôte	23
1.4. La reconstitution hématopoïétique post-greffe de CSH	24
2 Les Cellules Natural Killer (NK)	28
2.1. Généralités	28
2.1.1. Ontogénie des cellules NK	28
2.1.2. Caractérisation phénotypique des cellules NK	29
2.2. Fonctions des cellules NK : deux types de cytotoxicité	30
2.3. La régulation des cellules NK : les récepteurs activateurs et inhibiteurs	33
3 Les Récepteurs KIR (Killer-cell-Immunoglobulin-like-Receptors)	36
3.1. Les gènes KIR	36
3.1.1. Historique	36
3.1.2. Structure des gènes KIR	39
3.2. Structure des récepteurs KIR	41
3.3. Nomenclature	43
3.4. Diversité génétique « KIR »	46
3.4.1. Niveaux de diversité	46
3.4.2. Diversité des gènes KIR dans les populations : marqueurs génétiques	51
3.5. Fonctionnalité des récepteurs KIR	54
3.5.1. Les ligands majoritaires : les molécules HLA de classe I	54
3.5.2. Le répertoire KIR : expression protéique et fonction	57
3.5.3. Régulation des récepteurs KIR	61
4 Les Cellules NK et les Récepteurs KIR en greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques	63
4.1. Expérience sur le modèle murin (Barao 2003)	63

4.2. Implication des récepteurs KIR des cellules NK dans le devenir de la greffe de CSH : travaux réalisés chez l'homme	65
LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	71
RESULTATS	74
1 PUBLICATION N°1 : incompatibilités des gènes KIR en Greffe de CSH	75
1.1. Introduction	76
1.2. Résultats	77
1.3. Conclusion - Discussion	78
2 PUBLICATION N°2 : Diversité ethnique des gènes KIR	82
2.1. Introduction	83
2.2. Résultats	84
2.3. Discussion – Conclusion	85
3 PUBLICATION N°3 : Régulation transcriptionnelle des gènes KIR en greffe de cellules souches hématopoïétiques	88
3.1. Introduction	89
3.2. Résultats	90
3.3. Conclusion – Discussion	91
4 ETUDE 4 : Expression des gènes KIR	94
4.1. Introduction	95
4.2. Matériels et méthodes	97
4.2.1. Matériels	97
4.2.2. Méthodes	98
4.3. Résultats	103
4.3.1. Influence du milieu de culture sur l'amplification des cellules CD3 ⁻ CD56 ⁺	103
4.3.2. Amplification des cellules CD3 ⁻ CD56 ⁺ et analyse phénotypique du répertoire KIR de ces cellules en milieu de culture Cellgro et en présence de la lignée BLCL-1.	105
4.3.3. Influence du génotype HLA de la lignée B-LCL utilisée, sur l'amplification des cellules NK en culture en milieu Cellgro et sur leur répertoire KIR exprimé	116
4.3.4. Fonctionnalité des cellules CD3 ⁻ CD56 ⁺ amplifiées en milieu Cellgro à partir des 3 BLCL testées : test de cytotoxicité au chromosome 51	128
4.4. Conclusion – Discussion	131
CONCLUSION – DISCUSSION	136
BIBLIOGRAPHIE	149

ABBREVIATIONS

ADCC : Antibody-Dependent-Cellular-Cytotoxicity
Ag : Antigène
AND : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ATG : Anti-Thymocyte Globulin
BCR : B-Cell Receptors
B-LCL : B-Lymphoblastoid Cell Lines
Bu : Busulfan
CMH : Complexe majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène
CSH : Cellules Souches Hématopœïétiques
CSP : Cellules Souches Périphériques
DC : Dendritic Cell
DLI : Donor Lymphocyte Injection
EDX : Endoxan
Fc : Fragment constant
Fluda : Fludarabine
GvHD : Graft versus Host Disease
GvL : Graft versus Leukemia
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPRT : Hypoxanthine guanine Phosphoribosyl Transferase
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif
KIR : Killer-cell-Immunoglobulin-like Receptor
HvG : Host-versus-Graft
LAIR : Leukocyte-Associated-Inhibitory Receptors
LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique
LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen-1
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LRC : Leukocyte Receptor Complex
LILR : Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors
LGL : Large Granular Lymphocyte
MICA : MHC Class I chain-related-gene A
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
NCR : Natural Cytotoxic Receptors
NK : Natural Killer
NKC : Natural Killer Complex
NKR : Natural Killer cell Receptors
PBL : Peripheral Blood Lymphocytes
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells
PCR : Polymerase Chain Reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SAL : Serum Anti-Lymphocytaire
SBT : Sequence Based Typing
SCID : severe combined immune deficiency
SSP : Sequence Specific Primer
SSO : Sequence Specific Oligonucleotide
TBI : Total Body Irradiation
TCR : T-Cell-Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAIL : Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand
ULBP : UL16-binding protein

INTRODUCTION : GENERALITES

1 LA GREFFE ALLOGENIQUE DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES (CSH)

Parmi les greffes de CSH, on distingue les greffes autologues des greffes allogéniques. Les greffes autologues prédominent dans le traitement des lymphomes et des tumeurs solides. Elles consistent à administrer au patient ses propres cellules souches recueillies au niveau du sang périphérique par cytophérèse et purgées de leurs cellules leucémiques. A l'inverse, les greffes allogéniques de CSH consistent à administrer les cellules souches hématopoïétiques d'un donneur apparenté ou non chez un receveur. Ainsi, ce type de greffe instaure une situation allogénique susceptible d'induire une réaction dans deux directions opposées : une reconnaissance des antigènes du donneur par les cellules du receveur qui provoque une réaction de rejet de greffe et une reconnaissance des antigènes du receveur par les cellules du donneur qui provoque une réaction délétère du greffon contre l'hôte (GvH), mais pouvant également conduire à un effet bénéfique du greffon contre la leucémie (GvL), très recherché en greffe de CSH. Ainsi, dans le but d'étudier cette alloréactivité post-greffe de CSH, nous aborderons dans ce travail uniquement les greffes allogéniques de CSH.

1.1. Les objectifs d'une greffe

La greffe allogénique de CSH fait partie de l'arsenal thérapeutique depuis le début des années 70, permettant de suppléer à une moelle pathologique ou aplasique, par transplantation de cellules souches hématopoïétiques d'un donneur vers un receveur. Elle représente le traitement de plusieurs types de pathologies : malignes comme les leucémies aiguës, les myélomes (Harousseau 2005), les lymphomes ou certaines tumeurs solides (cancer du sein, neuroblastome) mais aussi non malignes comme les déficits constitutionnels ou acquis

(déficits immunitaires, aplasies médullaires). A titre d'exemple, la répartition par diagnostic des patients candidats à une greffe de CSH non apparentée (« greffes fumeurs ») en 2004 est indiquée dans la Figure 1.

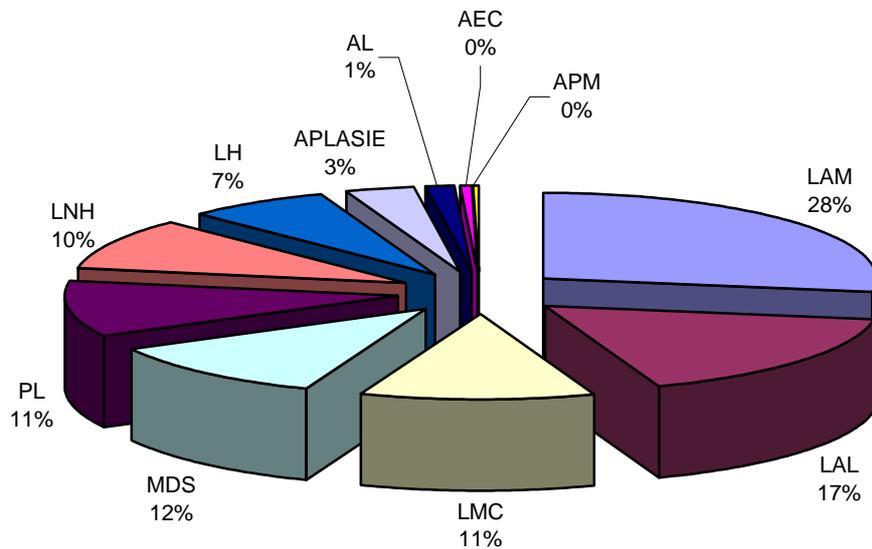


Figure 1 Indications des greffes de CSH non-apparentées Répartition par diagnostic Patients nationaux inscrits (724 adultes) dans l'année 2004 sur le registre France Greffe de Moelle (Rapport d'activité 2004, FGM)

- ACSI : Désordres Constitutionnels primitifs du Système Immunitaire
- AEC : Anomalies Erythrocytaires Constitutionnelles
- AH : Anomalies Histiocytaires
- AL : Autres Leucémies
- APC : Anomalies Plaquettaires Constitutionnelles
- APLASIE
- APM : Autres syndromes Myéoprolifératifs
- DMC : Désordres Métaboliques Constitutionnels
- LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique
- LAM : Leucémie Aigue Myéloblastique
- LH : Lymphome Hodgkinien
- LMC : Leucémie Myéloide Chronique
- LNH : Lymphome Non Hodgkinien
- MDS : Myélodysplasie
- PL : Proliférations Lymphoplasmocytaires

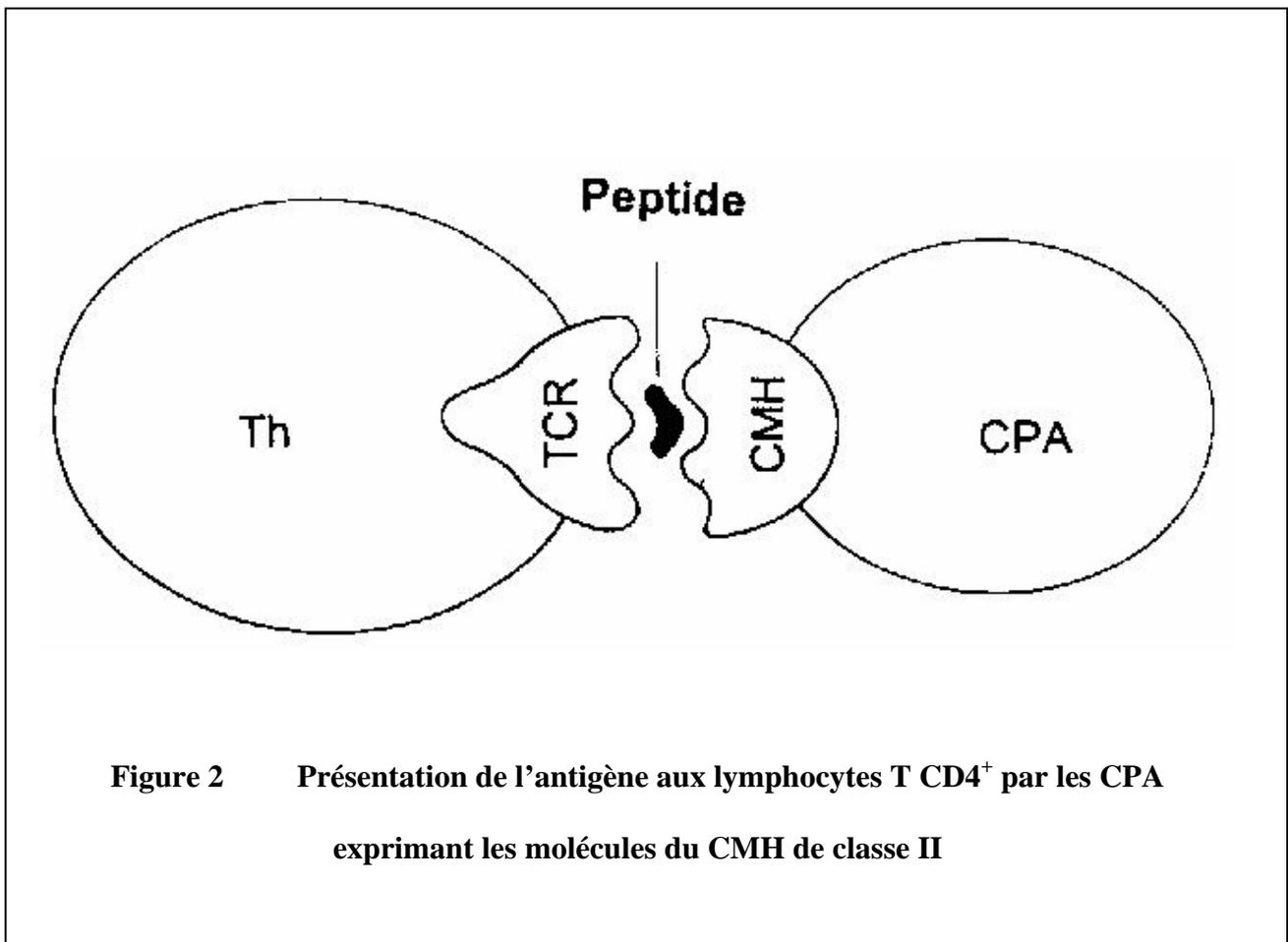
Les objectifs d'une greffe sont d'une part la reconstitution des cellules hématopoïétiques à court et long termes, après destruction de la moelle pathologique du receveur à l'aide de traitements cytotoxiques destinés à détruire la maladie tumorale (chimiothérapie, irradiation corporelle totale), et d'autre part l'éradication de la maladie résiduelle in vivo, en éliminant toute rechute.

1.2. Immunologie de la greffe

1.2.1. Généralités sur les acteurs du système immunitaire impliqués en greffe de CSH

Le système immunitaire permet à l'organisme de reconnaître et tolérer ce qui lui appartient (« le soi ») et de reconnaître et rejeter ce qui lui est étranger (« le non-soi »). Il met en jeu deux processus distincts : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tous les individus en l'absence d'immunisation préalable et qui constitue la première barrière de défense vis-à-vis de divers agents pathogènes et cellules tumorales. Elle est assurée par les anticorps naturels préformés, les cellules phagocytaires (monocytes, polynucléaires) et les lymphocytes NK qui ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'antigène (nous détaillerons ces cellules ultérieurement). A l'inverse, l'immunité adaptative dépend d'une reconnaissance d'un ou plusieurs antigènes étrangers au soi. Ces antigènes sont présentés sous forme de peptides de longueur variable par l'intermédiaire de cellules présentatrices d'antigènes « CPA ». Les CPA sont principalement représentées par les monocytes sous forme circulante, les macrophages tissulaires, les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les cellules endothéliales stimulées. Elles sont capables de

présenter des peptides endogènes en association avec les molécules HLA de classe I qu'elles expriment et/ou après endocytose des peptides exogènes en association avec les molécules HLA de classe II. Ces peptides présents dans le contexte des molécules HLA de classe I ou de classe II seront reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD8 et CD4 respectivement par l'intermédiaire de leur récepteur à l'antigène (TCR) (Figure 2).



On distingue les lymphocytes T helper CD4⁺ (Th) sécréteurs de cytokines, des effecteurs cytotoxiques CD8⁺ (Tc). Les lymphocytes Th sont définis en fonction de leur profil de production de cytokines : les lymphocytes Th1 sécrètent l'IL-2, IFN- γ , TNF- β , IL-3 et GM-CSF qui agissent principalement sur l'immunité cellulaire, alors que les lymphocytes Th2

sécrètent les IL-4, -5 ; -6, -10, -13, -3 et GM-CSF qui agissent principalement dans l'aide à la production d'anticorps. Les cytokines produites par les Th1 inhibent les lymphocytes Th2 et inversement.

D'autre part, les lymphocytes Th participent à la maturation des lymphocytes B en plasmocytes sécrétant d'anticorps, représentant la forme soluble de leurs récepteurs spécifiques BCR. Les lymphocytes B participent à l'immunité à médiation humorale.

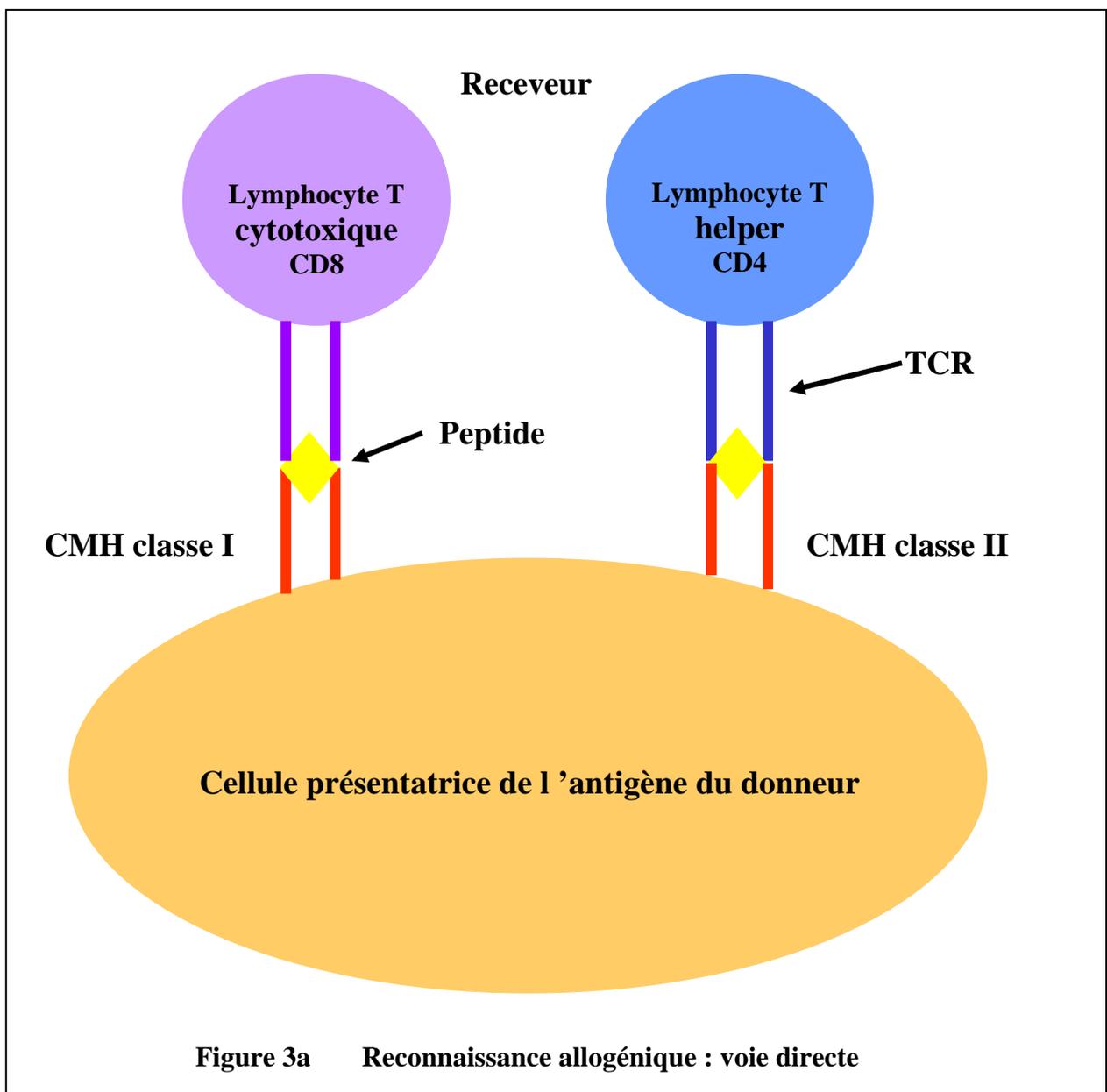
Un nouveau contact avec l'antigène entraîne une réponse dite « secondaire » ; les cellules mémoires (B et T) sont immédiatement activées. La réponse est donc plus rapide et plus intense que la réponse primaire et plus spécifique, grâce à une sélection des lymphocytes possédant des récepteurs de haute affinité pour l'antigène.

Les cellules de l'immunité exercent leurs fonctions d'une part par cytotoxicité cellulaire directe en particulier par l'intervention des lymphocytes T cytotoxiques et d'autre part par l'intermédiaire de molécules qu'elles produisent : les anticorps, les molécules d'adhésion et les cytokines. De plus les protéines du système du complément interviennent dans la lyse cytotoxique. Ces réactions cellulaires et humorales peuvent conduire en situation allogénique à des réactions délétères (rejet et réaction GvH) et/ou bénéfique (effet GvL).

1.2.2. La situation allogénique : réactions bénéfiques et délétères

Le rejet est une réaction immunologique essentiellement cellulaire entraînant l'activation des lymphocytes, la production de médiateurs (IL-1, IL-2, IL-6, IFN γ , TNF) et une attaque du greffon conduisant à sa destruction. Ce rejet est parfaitement bien défini en transplantation d'organes. Ainsi, deux voies de reconnaissance allogénique coexistent et contribuent au rejet de greffe de CSH, définies par l'origine des cellules présentant l'antigène, donneur ou receveur (Figures 3 a et b). Lors de la reconnaissance directe, les CPA du donneur

présentent leurs CMH (associés à des peptides étrangers) aux lymphocytes T alloréactifs du receveur. En cas de reconnaissance indirecte, ce sont les CPA du receveur qui internalisent les molécules du CMH du donneur provenant de la destruction cellulaire du greffon, les apprêtent et présentent les fragments peptidiques de ces molécules aux lymphocytes T du receveur en tant que peptides allogéniques associés aux molécules du CMH du receveur. La voie directe est prédominante dans le rejet aigu (Batchelor 1982; Lechler 1982), alors que la voie indirecte est prédominante dans le rejet chronique. Ces deux voies peuvent cependant coexister et être impliquées dans le rejet simultanément ou non.



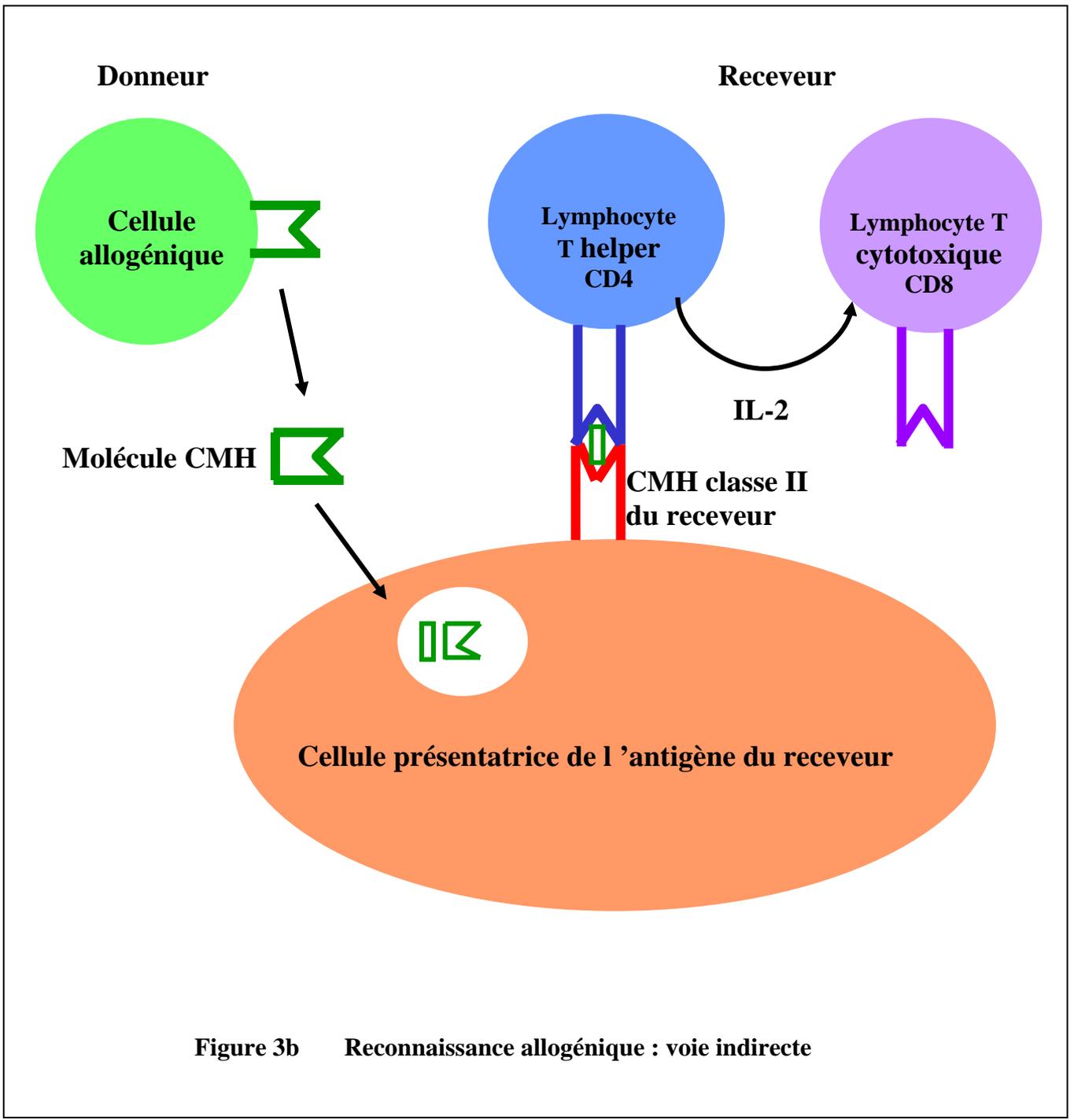


Figure 3b Reconnaissance allogénique : voie indirecte

Le traitement du phénomène de rejet est une balance entre l'induction d'une immunosuppression efficace et la prévention des complications infectieuses induites par cette immunosuppression.

Mises à part les réactions de rejet et les complications infectieuses post-greffe, la réussite d'une greffe de CSH dépend aussi de l'équilibre qui va s'installer entre les réactions

immunologiques du greffon contre l'hôte (GvH) et du greffon contre la leucémie (GvL). La réaction GvH aigue résulte de la reconnaissance et de la destruction des tissus du receveur par les cellules du donneur, principalement attribuée aux lymphocytes T du donneur (Sullivan 1994) et probablement par mécanisme de reconnaissance directe. D'autre part, les CPA possèdent une demi-vie relativement longue. Ainsi, malgré la destruction de leurs précurseurs dans la moelle osseuse par les traitements conditionnants, certaines CPA du receveur restent présentes parfois plusieurs mois après la greffe (Perreault 1985), permettant ainsi la présentation des antigènes du receveur aux lymphocytes du donneur. Elles sont ensuite progressivement remplacées par les CPA issues de la nouvelle hématopoïèse. Pour ces raisons, les CPA sont impliquées dans la réaction allogénique de GvH aigue en greffe de CSH (Shlomchik 1999). La réaction GvH se caractérise par des atteintes cutanées, hépatiques et digestives. La réaction GvL est le versant positif de cette reconnaissance allogénique puisqu'elle correspond à la lyse des cellules leucémiques du receveur par les cellules du donneur.

Dans un contexte HLA identique, la reconnaissance allogénique porte essentiellement sur les antigènes mineurs d'histocompatibilité (voir plus loin).

Les lymphocytes T activés au cours de ces réactions immunologiques, sécrètent des cytokines impliquées dans les dommages systémiques et tissulaires de la GvHD. Les tissus de l'hôte également endommagés par le conditionnement libèrent des cytokines inflammatoires responsables d'une surexpression des molécules HLA et des molécules d'adhésion facilitant la reconnaissance par les lymphocytes T.

La déplétion du greffon en lymphocytes T représente une stratégie intéressante de prévention de la réaction GvH (Maraninchi 1987). Cependant, en contre-partie ont été observées une augmentation des rejets, des non-prises de greffe et une incidence importante des rechutes sans bénéfice en terme de survie (Blaise 1993). En effet, la situation allogénique

provoquée, bénéfique par son effet GvL, est capitale pour la réussite de la greffe comme le démontre l'étude de Horowitz (Horowitz 1990). Ceci explique pourquoi les greffes entre jumeaux identiques, ne générant pas d'effet GvH et par conséquent pas d'effet GvL, ont un risque augmenté de rechute comparé aux greffes entre germains identiques. Le bénéfice de cet effet GvL a également été démontré par une étude dans laquelle les lymphocytes T du donneur réinjectés au patient pouvaient induire une rémission cytogénétique complète chez des patients en rechute de LMC (Horowitz 1990).

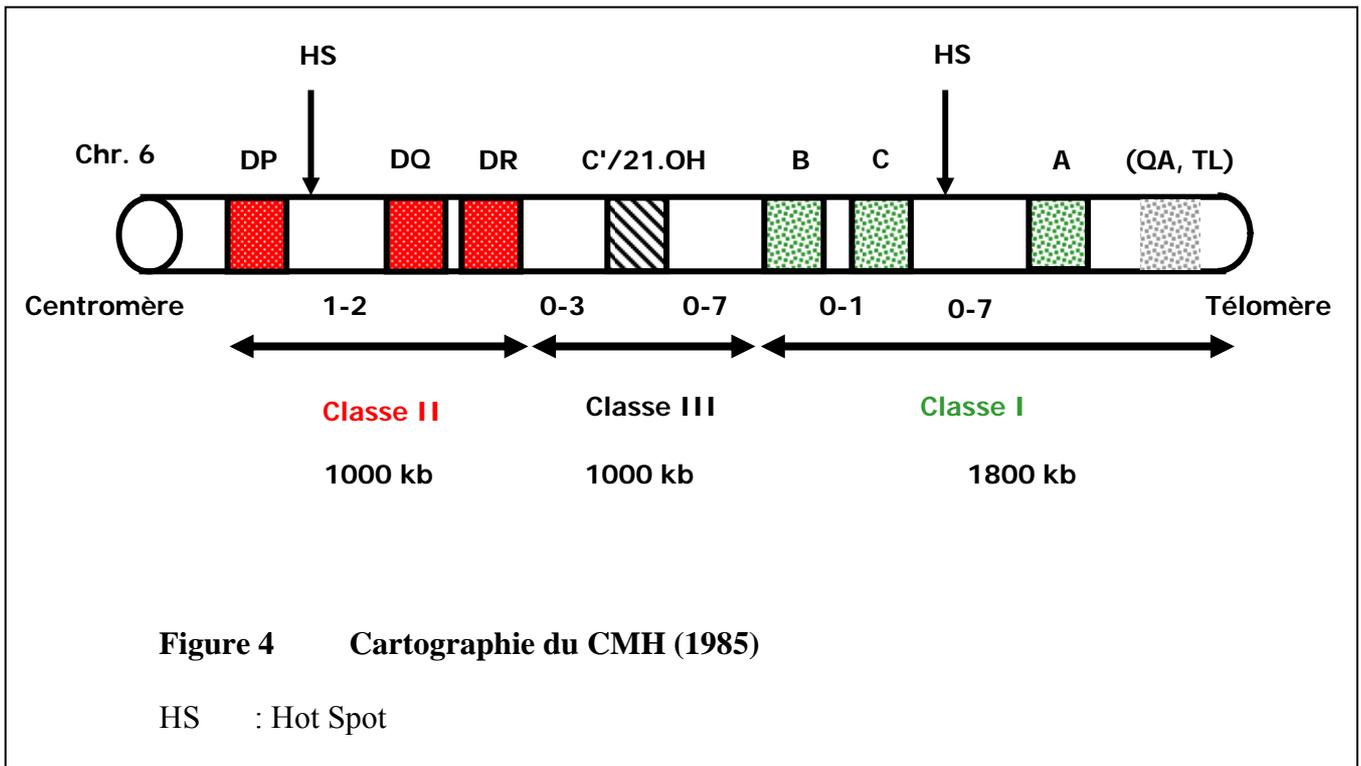
Les mécanismes *in vivo* et la compréhension de ces réactions immunologiques restent cependant complexes à interpréter et sont multifactoriels.

Ce qui est établi depuis 50 ans, c'est que l'ensemble des réactions immunologiques observées en greffe de CSH est sous la dépendance des antigènes majeurs d'histocompatibilité HLA exprimés à la surface des cellules de l'organisme et caractérisés par une forte diversité inter-individuelle.

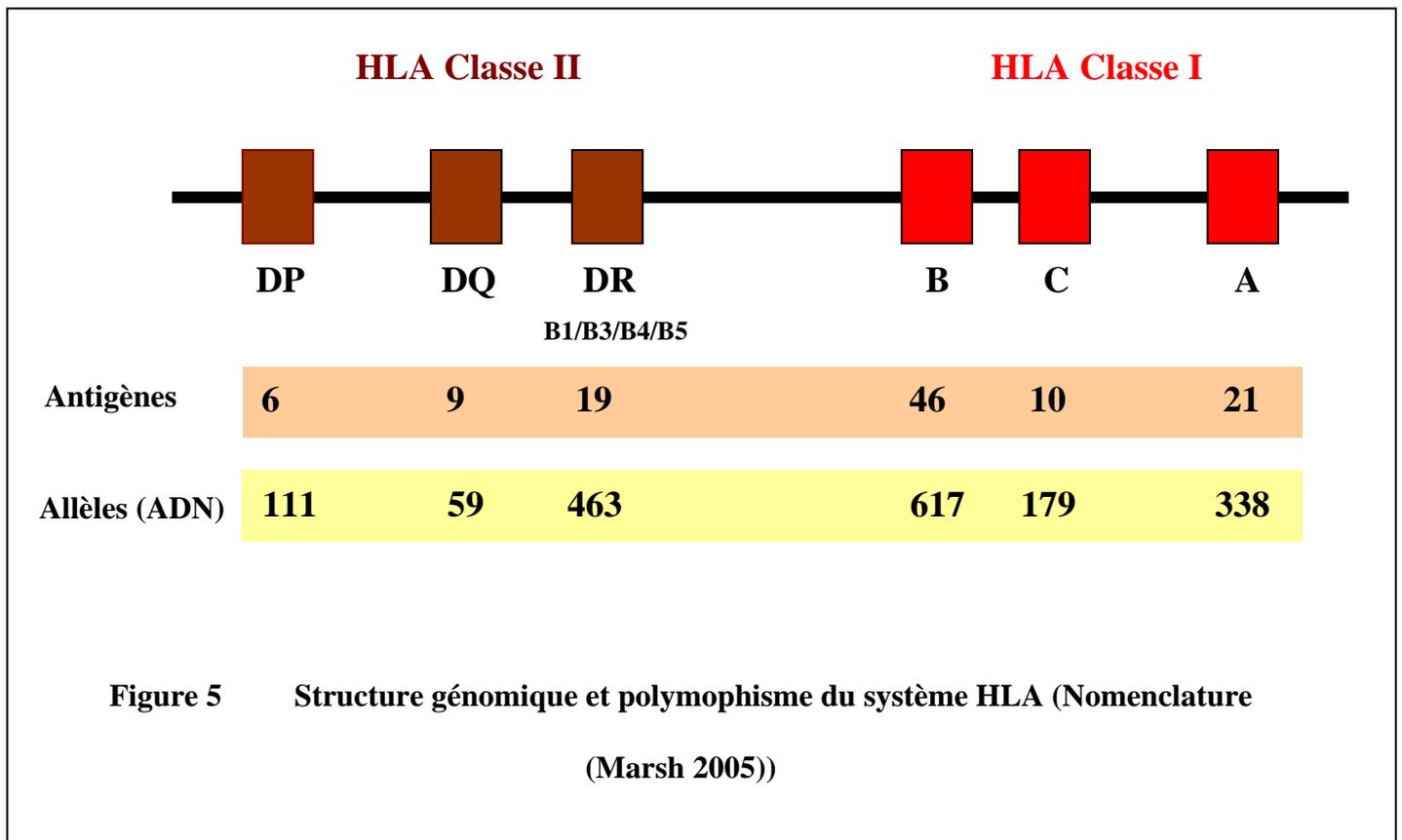
1.2.3. Les marqueurs d'histocompatibilité HLA

Les glycoprotéines responsables des incompatibilités tissulaires entre individus et capables d'induire une forte réponse immunitaire allogénique lors de greffes, sont représentées principalement par les molécules HLA *Human Leucocyte Antigen*. Classiquement, les molécules HLA-A, -B, -Cw de classe I présentent les peptides aux cellules T CD8+ et sont exprimées à la surface de toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que les molécules HLA-DR, -DQ, -DP de classe II présentent les peptides aux cellules T CD4+ et sont exprimées à la surface des lymphocytes B, monocytes, macrophages et lymphocytes T activés.

Le système immunogénétique HLA appartient au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) localisé chez l'homme sur le bras court du chromosome 6 (Figure 4).



La propriété essentielle de ce complexe est son polymorphisme très important défini par de très nombreuses formes alléliques de molécules et ce à chaque locus de classe I et classe II, rendant chaque individu quasiment unique par son typage HLA (excepté dans certaines situations familiales) (Figure 5). Ce phénomène est d'autant plus vrai que chaque individu hérite de 2 gènes pour chaque locus, le gène maternel et le gène paternel, augmentant ainsi le nombre de combinaisons différentes possibles. Chaque individu possède donc son propre répertoire HLA, reconnu comme répertoire du « soi » par les lymphocytes T. Précisons que les fréquences des marqueurs HLA sont très variables d'un locus à l'autre et sont fonction de l'ethnie considérée.



La seconde propriété capitale de ce complexe est la grande proximité existant entre les différents loci au niveau d'une région chromosomique limitée de 3500 à 4000 kb, qui détermine un « haplotype » transmis en bloc à la descendance. Chaque individu se caractérise par deux haplotypes HLA, l'un provenant du père et l'autre de la mère. L'ensemble de ces deux haplotypes définit le génotype de l'individu. L'expression de tous ces gènes est codominante (hormis les allèles nuls) et permet l'établissement d'un phénotype HLA représenté par les molécules HLA exprimées à la surface des cellules.

Enfin, la troisième propriété caractéristique du CMH est l'existence de déséquilibres de liaison au niveau des différents loci. Ainsi, certains haplotypes très particuliers sont observés en fréquences très supérieures ou inférieures aux fréquences calculées théoriquement par le produit des fréquences de chaque allèle constituant l'haplotype étudié.

La fonction immunitaire des molécules HLA est de distinguer le soi du non-soi dans le but d'éliminer ce dernier. Le polymorphisme extrêmement important existant au niveau des gènes du CMH explique l'apparition en greffe de CSH de fortes réactions immunologiques entre un donneur et un receveur, « médiées » par les lymphocytes T vis-à-vis des marqueurs HLA. Ces réactions se traduisent cliniquement par un rejet ou une réaction du greffon contre l'hôte. Une compatibilité maximale ou « optimale » entre les molécules HLA de classe I et II du donneur et celles du receveur est donc primordiale à la réussite d'une greffe de CSH.

Jusque dans les années 80, le typage des antigènes HLA-A, -B, -DR, -DQ était effectué par technique sérologique dont la technique de référence était la lymphocytotoxicité dépendante du complément (Terasaki 1964). Elle ne permettait cependant pas de différencier les multiples formes alléliques de chacun des loci. Ainsi, les techniques de biologie moléculaire se sont imposées petit à petit, tout d'abord pour le typage des molécules de classe II puis plus récemment pour celui des molécules de classe I. Après la technique RFLP (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism) (Bidwell 1991), ces techniques sont basées sur l'amplification des gènes HLA d'intérêt par PCR (Polymerase-Chain-Reaction) suivie d'une hybridation spécifique SSP (Sequence-Specific-Primer) (Olerup 1992) ou SSO (Sequence-Specific-Oligonucleotide) (Bignon 1997). Plus récemment se sont développées les techniques de séquençage SBT (Sequence-Based-Typing) (Rozemuller 1996).

Il y a quelques années, seules les incompatibilités au niveau des molécules HLA-A, -B, -DR et -DQ semblaient être importantes en greffe de CSH (Davies 2000 ; Petersdorf 1998). L'effet des molécules HLA-C et HLA-DP, exprimées à des taux inférieurs à la surface des cellules, était considéré moins déterminant immunologiquement jusqu'à la découverte d'une reconnaissance par les lymphocytes T cytotoxiques de ces disparités Cw et/ou DP (Grundschober 1997). Aujourd'hui, de nombreuses équipes attribuent une responsabilité

importante au locus HLA-Cw dans les événements immunologiques post-greffe de CSH (Flomenberg 2004; Tiercy 2004).

Au final, chaque locus pris distinctement semble influencer les événements post-greffes. Le risque de GvHD par exemple est augmenté lors d'incompatibilités au niveau des molécules HLA de classe II alors que des incompatibilités au niveau des molécules HLA-A, -B, -C et-DR diminuent la prise de greffe (Petersdorf 2003 ; Schaffer et al. 2003).

Ainsi, le système HLA représente le facteur clef déterminant la réussite d'une greffe de CSH. Les antigènes mineurs d'histocompatibilité (HA-1, -2, -3, H-Y...) sont également fortement impliqués dans les réactions d'incompatibilités post-greffe allogénique de CSH. Ils sont définis comme des peptides immunogènes dérivés de protéines du soi possédant une variabilité allélique. Les gènes des antigènes mineurs ségrègent indépendamment de ceux des antigènes HLA. Les antigènes mineurs provoquent une réponse lorsqu'ils sont présentés en tant que peptides allogéniques associés aux molécules du CMH. A l'inverse des antigènes majeurs, ils provoquent des réactions immunologiques d'intensité moins importante, sans production d'anticorps anti-antigènes (Goulmy 1997a; Goulmy 1997b ; Goulmy 1996).

D'autres paramètres interviennent à chaque étape de la greffe (du conditionnement pré-greffe à la sortie d'aplasie du patient), influençant également son évolution. Nous allons détailler quelques unes des étapes qui faciliteront ultérieurement la compréhension des résultats.

1.3. Les différents paramètres définissant la greffe de CSH

1.3.1. Les sources de greffons de CSH

Les greffes allogéniques de CSH peuvent s'effectuer à partir de greffons provenant de la moelle osseuse, de sang périphérique (CSP) ou de sang de cordon.

La ponction des cellules de la moelle osseuse s'effectue au niveau du bassin (crête iliaque) du donneur et nécessite une intervention chirurgicale sous anesthésie générale ou épidurale.

A l'inverse, les CSP sont recueillies par voie veineuse (cytaphérèse) après administration chez le donneur sain de facteurs de croissance (G-CSF) permettant la mobilisation des cellules souches de la moelle vers le sang périphérique (Goldman 1995). Les greffes de CSP présentent certains avantages comparées aux greffes de moelle osseuse : la facilité du recueil, une alternative lorsque le prélèvement de moelle est impossible et la richesse en progéniteurs hématopoïétiques permettant une durée d'aplasie raccourcie (10 jours contre 14 jours). En contre-partie, la mobilisation est parfois médiocre. Elle nécessite ainsi plusieurs cytaphérèses qui consistent à séparer les différentes populations cellulaires du sang par centrifugation, pouvant potentiellement induire une déstabilisation de l'hématopoïèse du donneur.

Les doses de cellules souches CD34+ administrées au patient par kilo de poids diffèrent selon la source, de 4 à 5 millions dans le cas d'une greffe de moelle osseuse et de 5 à 10 millions dans le cas d'une greffe de CSP.

Les greffons utilisant le sang de cordon sont particulièrement riches en cellules primitives dont les capacités d'autorenouveaulement sont réduites, mais dont les capacités de

prolifération et de différenciation sont supérieures à celles des cellules souches, plus précoces dans l'ontogénie des cellules hématopoïétiques et caractérisées par des capacités d'autorenouvellement très importantes (Wagner 1995). De plus, ces greffons, riches en cellules naives, produisent moins de cytokines. Ils représentent pour cela des greffons immatures et tolérants, diminuant potentiellement le risque de réactions GvH aiguës et chroniques et permettant plus de souplesse au niveau de la barrière d'histocompatibilité HLA entre le donneur et le receveur. La limite à l'utilisation de ces greffons est essentiellement liée au faible nombre de cellules souches recueillies. Ainsi, ces greffons étaient jusqu'à maintenant exclusivement destinés aux greffes pédiatriques. Cependant, le nombre de patients adultes greffés avec une (voire deux) unité(s) de sang placentaire est en augmentation. Depuis la première greffe de sang de cordon en 1989, 2000 greffes ont été réalisées, représentant 2% des allogreffes totales en Europe.

1.3.2. Le choix du donneur dans les greffes de CSH

Pour la plupart, les greffes de CSH sont intrafamiliales, réalisées à partir d'un donneur HLA identique 10/10 (c'est-à-dire identique au niveau des deux allèles de chaque locus HLA-A, -B, -C, -DR et -DQ, et même 12/12 avec le locus HLA-DP) appartenant à la fratrie. En pratique, 30% environ des patients en attente de greffe de CSH disposent d'un donneur familial HLA identique.

Ces greffes sont dites HLA « géno-identiques » puisque l'identité se situe pour l'ensemble des gènes des 2 haplotypes dont l'ensemble des gènes HLA. Dans ce cas, les éléments d'incompatibilité tissulaire se situent au niveau d'antigènes mineurs d'histocompatibilité.

Parmi les greffes intrafamiliales, les greffes réalisées à partir de donneurs n'appartenant pas à la fratrie sont dans la majorité des cas et au minimum identiques au niveau d'un haplotype. On parle alors de greffe HLA « haploidentique ».

Les greffes intra-familiales avec donneur HLA différent par plus d'un haplotype ne sont quasiment jamais réalisées du fait des risques de réactions GvH.

En cas d'absence de donneur compatible disponible dans la fratrie, une recherche de donneur non familial HLA identique est effectuée à l'aide des fichiers de donneurs volontaires. Au total, près de 10 millions de donneurs sont disponibles dans les différents fichiers internationaux, dont 130000 inscrits sur le fichier national (rapport d'activité FGM 2004). Ces greffes réalisées avec donneurs « fichiers » HLA identiques sont dites HLA « phéno-identiques ». Dans le cas d'une greffe avec un donneur HLA non identique, les incompatibilités tissulaires sont essentiellement dus à des différences au niveau des antigènes majeurs d'histocompatibilité. Dans ce cas, le risque de réactions GvH est très élevé.

1.3.3. Les conditionnements pré-greffe

Avant l'injection des cellules souches hématopoïétiques, le receveur reçoit un traitement de conditionnement dit « myéloablatif » associant une chimiothérapie intense : cyclophosphamide (Endoxan) et une irradiation à 12 gray sur 3 jours (TBI pour irradiation corporelle totale). Ce schéma de conditionnement classiquement utilisé varie en fonction de l'indication et des protocoles locaux. Ce conditionnement a pour but d'une part de détruire la moelle osseuse du receveur hôte et permettre une bonne reconstitution hématopoïétique à partir des cellules greffées et d'autre part de détruire les cellules tumorales (Thomas 1969).

Le conditionnement myéloablatif joue un rôle non négligeable sur l'incidence de la réaction GvH par la libération de cytokines par les tissus lésés facilitant ainsi la

reconnaissance des antigènes allogéniques de l'hôte par les lymphocytes T du donneur, eux-même activés par ces cytokines.

Il y a quelques années, les greffes à conditionnement atténué, dites greffes « non myéloablatives » ont été introduites dans l'arsenal thérapeutique des conditionnements de greffe de CSH afin de diminuer la toxicité extra-hématologique des traitements myéloablatifs lourds (Mielcarek 2002; Sykes 1997). Ce conditionnement immunosuppresseur consiste classiquement à associer Busulfan, Fludarabine et sérum antilymphocytaire (SAL). Il permet l'établissement d'un chimérisme hématologique entre le donneur et le receveur à partir duquel peut se développer un double effet immunologique dirigé contre les cellules normales et tumorales du patient (effets GvH et GvL). Ce chimérisme partiel peut subsister plusieurs mois, nécessitant souvent l'injection de lymphocytes du donneur (DLI) dans le but d'activer la prise de greffe et obtenir un « chimérisme complet » caractérisé par la seule présence des cellules de phénotype du donneur. Cette approche permet de réduire la morbidité et la mortalité liées à la réaction GvH du fait d'un traumatisme moins sévère des tissus. Elle permet d'élargir l'accessibilité de cette thérapeutique à des patients plus âgés ou dont l'état général n'est pas un élément de bon pronostic.

Ces greffes à conditionnement atténué représentent environ 30% des allogreffes.

1.3.4. Traitement prophylactique et curatif de la réaction du greffon contre l'hôte

La réaction GvH aiguë survient généralement dans les 100 premiers jours suivant la greffe, la plupart du temps entre 2 et 5 semaines. Elle est classée en 4 grades de gravité croissante, selon le degré d'atteinte des organes cibles (peau, foie, tube digestif) et le niveau d'altération plus ou moins marquée de l'état général : grades I et II de pronostic favorable,

grade III de pronostic réservé et grade IV presque toujours mortel. Une prophylaxie efficace est donc nécessaire et primordiale.

La déplétion ex vivo des lymphocytes T présents dans le greffon allogénique et/ou une immunosuppression après la greffe sont actuellement les deux méthodes utilisées pour prévenir les effets délétères de la réaction allogénique GvH après la greffe, en plus d'une bonne compatibilité HLA. Cependant, la déplétion ex-vivo du greffon en lymphocytes T est associée à une augmentation du risque de rejet de la greffe et de rechute leucémique (Marmont 1991).

L'immunosuppression après la greffe consiste en l'administration de méthotrexate avec soit la ciclosporine soit le mycophénolate mofétil, associée ou non à une corticothérapie. Elle est moins efficace en terme de prévention de la GvHD mais n'interfère pas avec la prise d'un greffon allogénique et permet de conserver un effet GvL.

L'utilisation d'ATG (globulines anti-thymocytes) en pré-greffe provoque une profonde déplétion en lymphocytes T et représente un traitement prophylactique efficace contre la GvHD.

Ainsi, il existe un équilibre stratégique entre la prophylaxie de la GvHD, l'intensité du conditionnement, l'incidence de la GvHD et le taux de rechute.

1.4. La reconstitution hématopoïétique post-greffe de CSH

La reconstitution immunitaire après conditionnement immunoablatif est d'une importance capitale dans l'induction de tolérance vis-à-vis des antigènes allogéniques et des autoantigènes. Après une greffe de CSH, la reconstitution des lignées cellulaires du système hématopoïétique résulte à la fois des cellules matures immunocompétentes présentes dans le greffon allogénique et des cellules qui apparaissent de novo à partir des cellules souches

hématopoïétiques nouvellement greffées. Cette reconstitution est influencée par de nombreux paramètres extrinsèques tel que le passé clinique du patient et ses traitements associés incluant le conditionnement pré-greffe, la composition cellulaire du greffon injecté, l'immunosuppression post-greffe (Zauch 2001) et également par des paramètres intrinsèques tels que le contexte cytokinique.

La reconstitution précoce post-greffe de CSH est dominée par la population de lymphocytes Natural Killer (NK) et de cellules dendritiques (Atkinson 1990 ; Ottinger 1996). Les cellules NK sont détectables au niveau du sang périphérique dès le 7^{ème} jour après la greffe (Chklovskaja 2004). Leur expansion qui suit est rapide et importante, atteignant des valeurs normales dès 1-2 mois (Auletta 2005 ; Petersen 2003). La reconstitution des cellules NK dans la moelle osseuse est encore plus rapide que dans le sang périphérique. Plus précisément, la population de cellules NK de phénotype $CD56^{low}CD16^{high}$ caractérisée par des fonctions cytotoxiques et habituellement prédominante chez un individu sain, est fortement réduite pendant la période post-greffe précoce. Inversement, la population NK $CD56^{high}CD16^{-/Low}$ caractérisée par des fonctions prolifératives, est fortement augmentée. Le ratio $CD56^{low}CD16^{high}/CD56^{high}CD16^{-/low}$ est donc diminué après la greffe par rapport à celui observé au niveau du sang périphérique de témoins sains, et cette inversion persiste jusqu'à 6 mois après la greffe. Les fonctions cytotoxiques de ces cellules NK en reconstitution post-greffe allogénique sont très diminuées, certainement due à la diminution de la population $CD56^{low}CD16^{high}$ (Chklovskaja 2004). A l'inverse, cette population cellulaire NK $CD56^{high}/CD16^{-/low}$ semble avoir acquis précocement après la greffe les capacités de réponse à des stimuli extérieurs et de production de grandes quantités d'IFN. Dans les greffes haploidentiques (Handgretinger 2001) et les greffes de sang de cordon (Thomson 2000), les cellules NK $CD56^{high}CD16^{-/low}$ qui réapparaissent précocement après la greffe, sont dotées de fonctions cytotoxiques normales.

D'autre part, des études effectuées chez la souris ont montré le rôle important des cellules NK dans la stimulation de l'hématopoïèse et donc sur la prise de greffe de CSH (Murphy 1992 ; Murphy 1996). Les cellules NK activées sécrètent des cytokines stimulant l'hématopoïèse telles que GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-6, ainsi que des cytokines inhibitrices de croissance : IFN- γ , TNF- α , TGF- β (Murphy 1992). Des travaux réalisés chez la souris montrent que le transfert adoptif de cellules NK de donneur, activées par l'IL-2, active la reconstitution hématopoïétique après greffe de moelle osseuse chez une souris syngénique ou allogénique, en particulier lorsqu'il y a T-déplétion (Siefer 1993). Les résultats suggèrent l'importance d'un ou de plusieurs clones plus spécifiquement actif(s) sur la régulation de l'hématopoïèse, à l'intérieur de la population NK globale.

A l'inverse, la reconstitution de la population de lymphocytes T est globalement lente, observée 6 mois après la greffe. Elle dépend de la fonction thymique, détériorée par l'âge et les conditionnements utilisés (Roux 2000). La reconstitution en cellules T mémoires périphériques thymo-indépendantes précède l'expansion des cellules T naïves thymo-dépendantes. Ainsi, les cellules T CD8⁺ cytotoxiques prédominent dans la phase précoce post-greffe. On observe également une inversion du ratio CD4/CD8 et une diminution du pool de cellules T naïves (CD4⁺CD45RA⁺) (Morecki 2001; Shenoy 1999). Le pool de cellules T CD4⁺ retrouve des valeurs normales plus tardivement, 1 an après la greffe, conduisant à un ratio CD4/CD8 supérieur à 1.

La reconstitution post-greffe des cellules hématopoïétiques diffère en fonction de la source du greffon et des conditions de greffe. Ainsi, la reconstitution des cellules T après greffe de CSP est plus rapide que la reconstitution post-greffe de moelle osseuse (Storek 2001 ; Talmadge 1997). A l'inverse, après une greffe de CSP positivement sélectionnée en

cellules CD34+, la reconstitution en cellules T est retardée comparée à une greffe de moelle osseuse, du fait d'un délai dans la réapparition des cellules T de phénotype mémoire (Eyrich 2003). Les études effectuées comparant la reconstitution immune chez des patients greffés ayant reçu un conditionnement myéloablatif ou un conditionnement non myéloablatif pré-greffe montrent une protection contre les infections chez ces derniers par réduction de la cytotoxicité et de la myélosuppression et par amélioration observée dans la réapparition des cellules (leucocytes et lymphocytes) fonctionnelles du système immunitaire (Friedman 2001 ; Mohty 2002; Saito 2003).

La précocité d'apparition des cellules NK par rapport aux lymphocytes T caractérise les cellules NK comme une population cellulaire primordiale fonctionnellement et numériquement lors de la reconstitution post-greffe précoce. L'expansion rapide de ces cellules originaires du donneur, pourrait être fortement impliquée dans la fonctionnalité précoce du système immunitaire en post greffe de CSH, et notamment dans les effets immunologiques de GvHD/GvL observés pendant cette période. Ces observations sur la réapparition précoce des cellules NK, cellules de l'immunité innée, par rapport aux autres populations cellulaires en reconstitution post-greffe et sur leurs fonctions cytotoxiques, ont amené de nombreuses équipes à s'intéresser aux cellules NK et à leur régulation par les récepteurs qu'elles expriment, en greffe de CSH.

Avant d'aborder le rôle des cellules NK dans l'immunologie de la greffe de CSH, la seconde partie présentera cette population cellulaire ainsi que ses spécificités fonctionnelles.

2 LES CELLULES NATURAL KILLER (NK)

2.1. Généralités

Les cellules Natural Killer (NK) sont une sous-population de lymphocytes, distincte des lymphocytes B et T et constituent une composante cellulaire majeure du système immunitaire inné. Ces grands lymphocytes granuleux (Large Granular Lymphocytes LGL) contiennent des granules cytoplasmiques riches en perforine et granzymes. Chez l'adulte, elles représentent 5 à 20% des lymphocytes du sang circulant et sont présentes dans de nombreux organes comme le foie, la rate, les poumons, les ganglions lymphatiques, le placenta et les intestins. Elles reconnaissent et éliminent les cellules anormales ou du non soi, notamment les cellules infectées par des virus ou les cellules tumorales {Trinchieri.G, 1989 #25}, soit par cytotoxicité naturelle sans immunisation préalable, soit par une cytotoxicité dite dépendante des anticorps (ADCC).

2.1.1. Ontogénie des cellules NK

Les cellules NK dérivent d'un progéniteur médullaire commun aux lymphocytes T (Durum 1998 ; Spits 1995), mais contrairement aux lymphocytes T et B, n'expriment pas de récepteur spécifique pour l'antigène (TCR ou Immunoglobuline). Leur maturation est extra-thymique et s'effectue au contact du micro-environnement médullaire (Bennett 1987; Williams 1999), dans un contexte cytokinique particulier. En particulier, l'IL-15 induit spécifiquement une différenciation NK (Fehniger 1997 ; Kennedy 2000 ; Kundig; Liu 2000 ; Parrish-Novak 2000) et l'IL-21 est impliquée dans le développement et la différenciation du

compartiment NK (Parrish-Novak 2000). Le mécanisme d'acquisition de l'expression de récepteurs à leur surface reste à déterminer.

2.1.2. Caractérisation phénotypique des cellules NK

Les lymphocytes NK se caractérisent par l'absence des récepteurs spécifiques de l'antigène des lymphocytes B (Immunoglobulines Ig) et des lymphocytes T (TCR/CD3). Chez l'homme, ces cellules expriment un récepteur de basse affinité pour le fragment Fc des IgG, CD16 (Fc γ RIIIA) ainsi qu'une molécule d'adhérence du système nerveux, CD56 (Neural Cell Adhesion Molecule NCAM). Ainsi, les cellules NK sont de phénotype caractéristique CD3⁻ CD16⁺ CD56⁺ (Robertson 1990).

Les cellules NK expriment également de nombreuses molécules de costimulation telles que CD40-ligand, CD2, 2B4, des molécules d'adhésion telles que DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1), LFA-1 (Leukocyte function antigen-1), CD62L, CD44, CD49e et CD18/CD11. Elles présentent également des récepteurs aux cytokines : IL1-R, IL-2R, c-kit, IL-12R, IL-15R, IL-18R et IL-21R et aux chémokines : CXCR3, CXCR1 et CX₃CR1.

La densité des molécules CD56 à la surface des cellules NK permet de distinguer deux sous-populations (CD56^{bright}, CD56^{dim}), fonctionnellement différentes dans le sang circulant (Lanier 1986). La grande majorité des cellules NK (90%) expriment faiblement CD56 (CD56^{dim}) et fortement CD16 (CD16^{bright}); elles ont des capacités cytotoxiques importantes et prolifèrent mal en réponse à l'IL2. A l'inverse, les cellules NK CD56^{bright} CD16^{dim} ou CD16^{neg}, représentent 10% des NK, sont peu cytotoxiques et capables de proliférer en réponse à de faibles doses d'IL2. Ces dernières produisent en grande quantité des cytokines comme l'IFN γ , IL10, TNF α , TNF β (Cooper 2001).

Les seuls marqueurs spécifiques des cellules NK du sang périphérique sont représentés par les molécules NKp46 et NKp30.

2.2. Fonctions des cellules NK : deux types de cytotoxicité

Les cellules NK jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée via leurs fonctions de cytotoxicité. Elles peuvent exercer deux types de cytotoxicité (Figure 6): la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) et la cytotoxicité NK dite « naturelle ».

- 1- La cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) au cours de laquelle la molécule CD16 exprimée à la surface des cellules NK reconnaît le fragment Fc des IgG fixées sur les cellules cibles, provoquant secondairement leur lyse.
- 2- La cytotoxicité dite « naturelle », au cours de laquelle l'activation des cellules NK est régulée par un équilibre entre des signaux activateurs et inhibiteurs, passant par des récepteurs, qui reconnaissent essentiellement les molécules du CMH de classe I ou classe I-like. L'interaction entre ces récepteurs inhibiteurs et leurs ligands exprimés à la surface des cellules cibles inhibe l'activation du programme de lyse et de production des cytokines. Chaque clone NK d'un individu exprime au minimum un récepteur inhibiteur spécifique d'une molécule CMH de classe I du soi et permet ainsi la protection des cellules autologues non altérées. Au contraire, l'absence ou le nombre insuffisant de molécules de CMH de classe I et la présence de ligands activateurs (qui restent à identifier) à la surface des cellules cibles conduit à l'activation de la

lyse, traduit par l'hypothèse du "soi manquant" (Hoglund 1990). Ces événements se produisent fréquemment dans les infections virales ou les pathologies tumorales (Bauer 1999 ; Hoglund 1990 ; Moretta 2001). Ces réactions d'immunosurveillance naturelles sont donc complémentaires à celles acquises des lymphocytes T CD8+ (et T CD4+) cytotoxiques qui, à l'inverse, ne peuvent lyser que des cibles, CMH classe I positives, présentant un antigène spécifique.

La cytotoxicité NK naturelle semble emprunter le plus fréquemment la voie dépendante de la perforine et des granzymes par exocytose des granules cytotoxiques. Elle utilise secondairement la voie des ligands de Fas et TRAIL (Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand) exprimés par les cellules NK, pour lyser les cellules cibles (Takeda 2001).

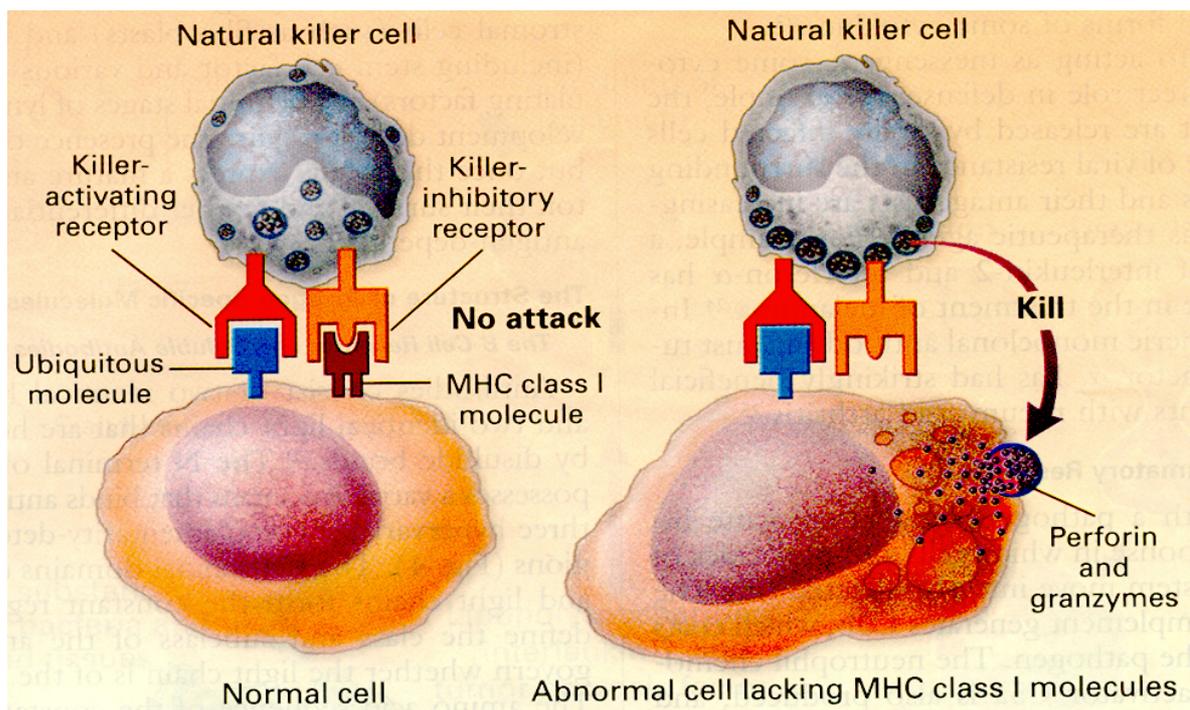


Figure 6 Mécanisme de la cytotoxicité NK (Delves 2000)

Par ailleurs, les cellules NK activées et en particulier la sous-population NK CD56^{bright} chez l'homme, sécrètent un grand nombre de cytokines de type Th1, Th2 ou pro-inflammatoires, des chimiokines (Biron 1999) et interviennent ainsi dans la coopération cellulaire et l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. L'IFN γ (cytokine Th1), joue un rôle majeur dans la défense antivirale impliquant les cellules NK. D'autre part, les réactions inflammatoires s'accompagnent souvent de la libération locale de cytokines qui peuvent ainsi activer les cellules NK (les cellules NK exprimant de nombreux récepteurs pour les cytokines et chimiokines) et augmenter l'expression des ligands HLA membranaires.

Ainsi, les fonctions NK sont étroitement régulées par un ensemble de récepteurs. Ces récepteurs inhibiteurs ou activateurs sont appelés NCR pour natural cytotoxicity receptors et

NKR pour natural killer cell receptors. Ils ne sont pas tous spécifiques des cellules NK puisque certains sont également exprimés par des sous-populations lymphocytaires T.

2.3. La régulation des cellules NK : les récepteurs activateurs et inhibiteurs

Les cellules NK expriment de nombreux récepteurs activateurs et inhibiteurs à leur surface (Figure 7) et leurs fonctions cytotoxiques sont la résultante de signaux activateurs et de signaux inhibiteurs (Lanier 1998 ; Long 1999 ; Moretta 1997; Raullet 2001).

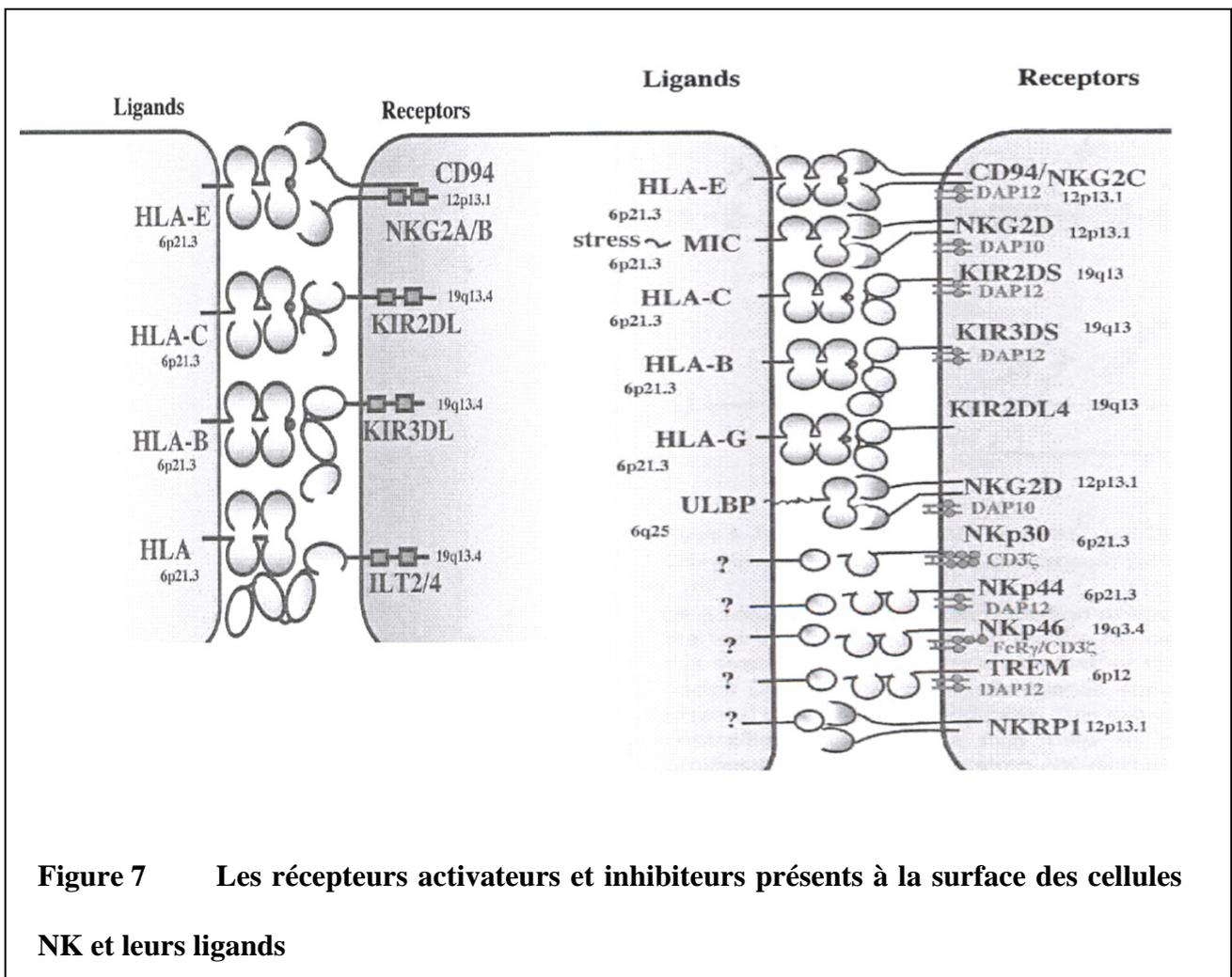


Figure 7 Les récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à la surface des cellules NK et leurs ligands

On distingue deux familles de récepteurs des cellules NK :

- Les récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines sont constitués des KIRs (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors), des LILR (Leucocyte Immunoglobulin-Like Receptors), des LAIR (Leucocyte-Associated-Inhibitory-Receptor) et enfin, des NCR (Natural Cytotoxicity Receptors), récepteurs activateurs incluant NKp30, NKp44 et NKp46. Les gènes correspondants aux récepteurs KIR, LILR, LAIR et NKp46 sont localisés sur le chromosome 19 au niveau de la région LRC (Leukocyte Receptor Complex). Les récepteurs NKp30 et NKp44 sont codés par des gènes localisés sur le chromosome 6.

Les récepteurs KIR et LILR sont majoritairement inhibiteurs et la plupart possèdent comme ligands les molécules HLA de classe I, alors que les NCR sont activateurs et leurs ligands spécifiques sont encore inconnus comme pour les KIR activateurs.

Les NCR permettent l'activation directe des cellules NK (Besostri 2000), par des protéines adaptatrices avec reconnaissance et lyse des cellules de diverses tumeurs.

- Les récepteurs de la famille des lectines de type C sont des hétérodimères formés par l'association d'une molécule CD94, chaîne « invariante », et d'une glycoprotéine codée par un gène de la famille des NKG2. Cette famille comporte 5 gènes codés chez l'homme par le chromosome 12, au niveau de la région NKC (Natural Killer Complex). Le ligand des complexes CD94/NKG2 (A/C/E) est la molécule HLA-E, molécule HLA de classe I non classique chargée de peptides issus de la séquence « signal » des molécules HLA de classe I classiques (Braud et al. 1998). Ces récepteurs exercent des fonctions inhibitrices (NKG2A ou B) ou activatrices (NKG2C). La molécule NKG2D homodimère, non liée à CD94, récepteur activateur, reconnaît à la surface cellulaire les molécules HLA non classiques MICA, MICB (Steinle 2001) et ULBP (UL16-binding protein) (Cosman 2001), protéine virale du CMV. Ces

molécules sont surexprimées dans des situations de stress ou dans un environnement tumoral. Notons que NKG2D est également considéré comme un récepteur NCR.

Dans la seconde partie de ce chapitre nous détaillerons plus particulièrement les récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs évoqués ci-dessus, récepteurs exprimés à la surface des cellules NK qui possèdent comme ligands connus des molécules HLA de classe I classiques et non classiques.

3 LES RÉCEPTEURS KIR (KILLER-CELL-IMMUNOGLOBULIN-LIKE-RECEPTORS)

3.1. Les gènes KIR

3.1.1. Historique

Les similarités au niveau des séquences entre les différents gènes KIR permettent de confirmer leur émergence récente dans l'évolution.

Les événements de duplication de gènes qui ont permis la génération de la région des gènes KIR semblent dater de 30-45 millions d'années (Gomez-Lozano 2002). Cette région KIR du génome humain est très certainement apparue rapidement (quelques millions d'années) durant la divergence des primates à partir des autres mammifères, conséquence à long terme de l'évolution rapide des gènes du CMH de classe I classique (Canavez 2001 ; Hershberger 2001; Hershberger et al. 2005 ; Khakoo 2000).

Chez la souris, les premières études ont permis d'identifier des gènes codant pour des récepteurs Ly49, spécifiques de ligands codés par le système H-2, équivalent murin du système HLA, situé sur le chromosome 17 (Daniels 1994; Karlhofer 1992). Ces récepteurs appartiennent à la famille des lectines de type II qui reconnaissent les molécules H-2 de classe I : H-2D et H-2K (Long 1996 ; Ryan 1997; Yokoyama 1995).

Chez l'homme, les gènes codant pour les récepteurs KIR ont ensuite été identifiés ; ils présentent eux aussi des spécificités pour des ligands du MHC classe I : HLA de classe I, (Colonna 1995) ainsi que des fonctions identiques aux récepteurs Ly49 (Barten 2001 ; Trowsdale 2001a ; Trowsdale 2001b). Ces molécules transmembranaires de type I possèdent néanmoins des structures protéiques distinctes puisque les gènes KIR codent pour des protéines appartenant à la superfamille des Ig. Les gènes KIR sont localisés sur le

chromosome 19 (région 19q13.4) (Steffens et al. 1998 ; Trowsdale 2001b ; Wilson 1997) dans la région LRC pour Leukocyte Receptor Complex (environ 1 Mb) qui contient également les autres membres de la superfamille des Ig (LIRs, LAIRs, NKp46) (Figure 8). Le LRC possède une région homologue chez la souris sur le chromosome 7; cependant malgré de nombreuses similitudes entre les LRC humains et murins, aucun équivalent structural des gènes KIR humains n'a été retrouvé chez la souris. L'homologue murin le plus proche de la famille des récepteurs KIR des cellules NK est le KIR-like-1 (KIRL1) récemment découvert (Welch 2003).

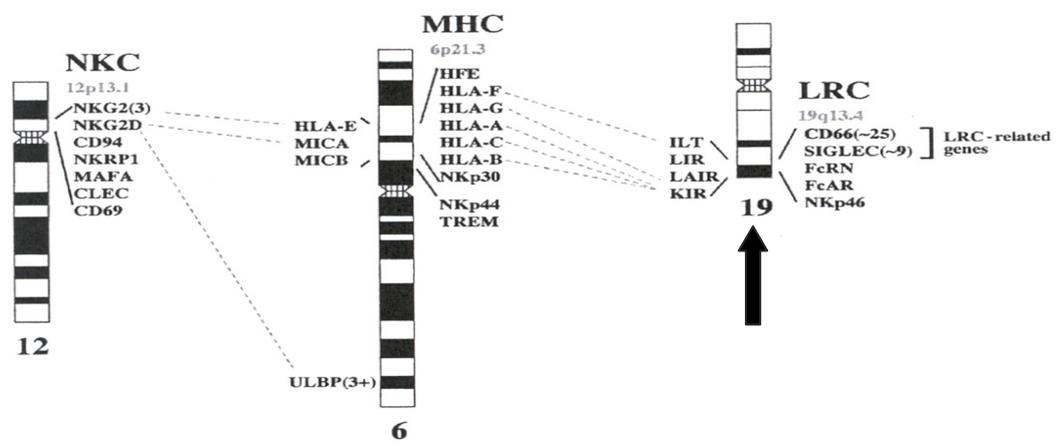
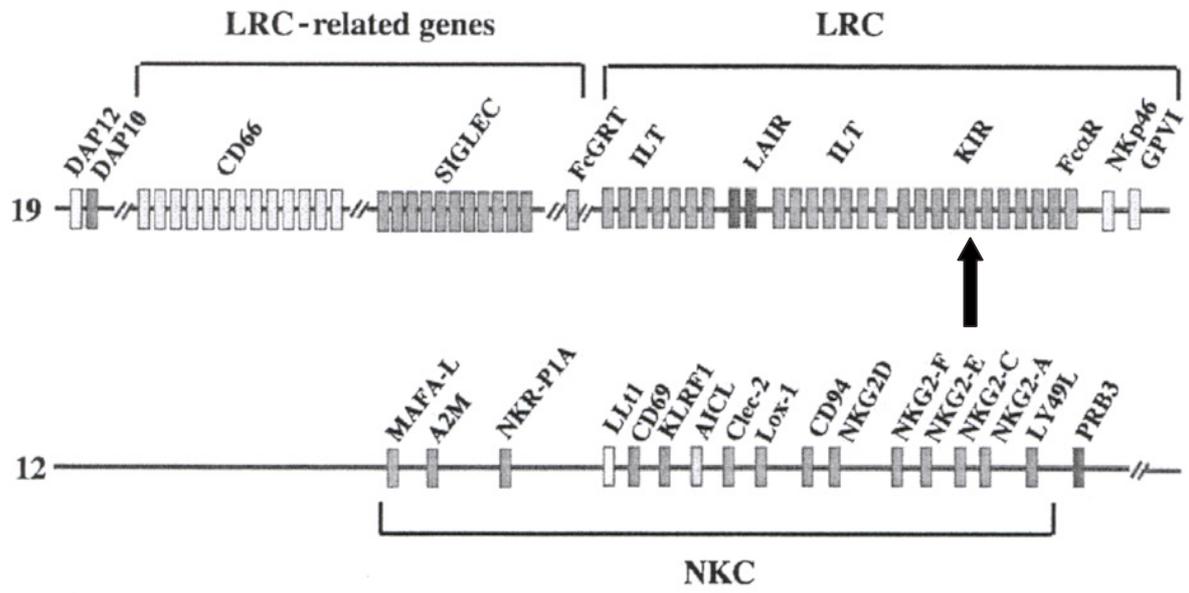


Figure 8 Organisation des gènes des récepteurs des cellules NK chez l'homme (Hsu 2002).

Aujourd'hui, 16 gènes et pseudogènes ont été caractérisés, se répartissant de la façon suivante: KIR2DL1, 2, 3, 4, 5 (A et B), KIR2DS1, 2, 3, 4, 5, KIR 3DL1, 2, 3, KIR3DS1, KIR2DP1, KIR3DP1.

3.1.2. Structure des gènes KIR

Les gènes KIR sont organisés en 9 exons (Figure 9) qui correspondent à des régions et des fonctions différentes de la protéine: les exons 1 et 2 codent chacun pour un peptide signal ainsi que pour les deux premiers acides aminés du polypeptide mature. Les exons 3, 4, 5 codent pour les domaines immunoglobulines, D0, D1 et D2 respectivement. L'exon 6 permet la connection entre D2 et la région trans-membranaire codée par l'exon 7; le fragment intracytoplasmique est codé par les exons 8 et 9.

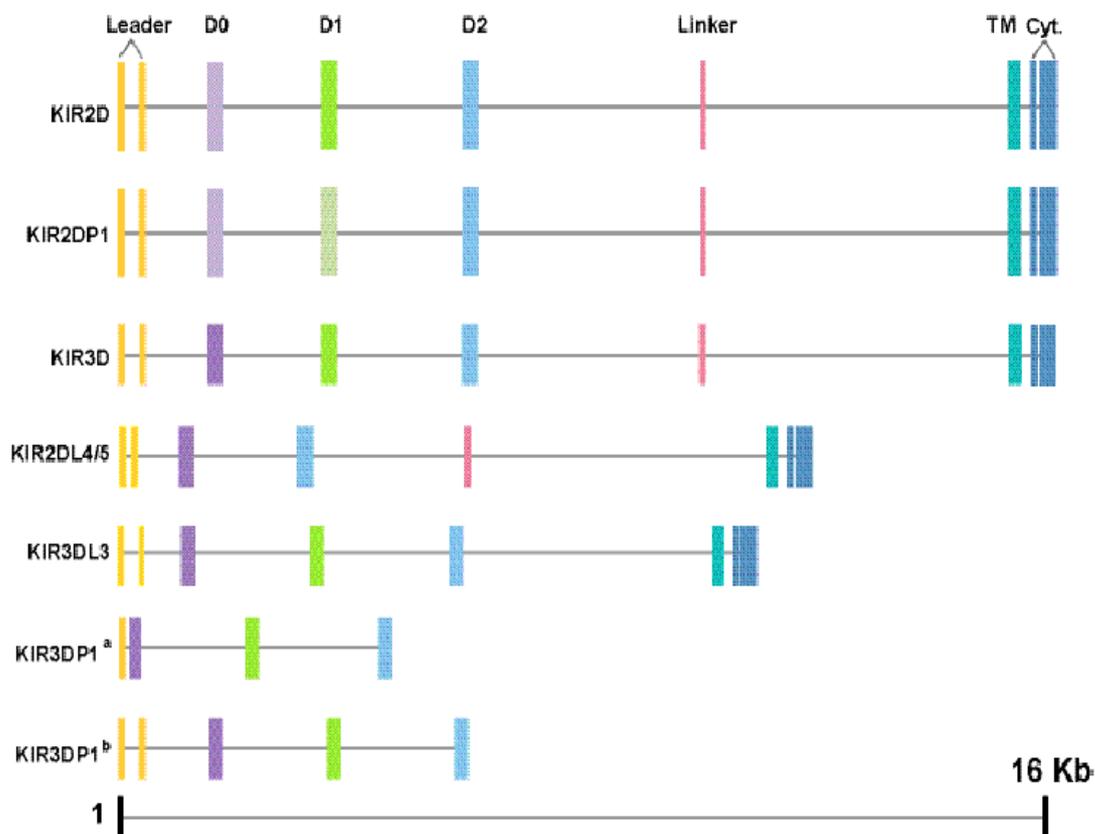


Figure 7 Structure des exons-introns des gènes KIR (The KIR Gene Cluster, Carrington, Mary and Norman, Paul)

Les exons codant pour les différents domaines des molécules KIR sont les suivants : exons 1 et 2 pour la séquence du signal leader (jaune), exons 3 à 5 pour les domaines Immunoglobulines D0, D1 et D2 respectivement (violet, vert, bleu), exons 6 et 7 pour la région « Linker » et la région transmembranaire respectivement (rose et turquoise), exons 8 et 9 pour le domaine cytoplasmique (bleu foncé).

Le 1^{er} groupe de KIR à 2D (KIR2DL-1/-2/-3 et tous les 2DS) possèdent une organisation génomique identique aux KIR 3D, mais l'exon 3 (D0) de ce 1^{er} groupe est un pseudogène (violet clair) ; l'exon 3 correspond également à un pseudogène sur KIR2DP1 qui possède en outre un pseudo-exon 4 (vert clair). Le second groupe de KIR à 2D (2DL4, 2DL5A et 2DL5B) est caractérisé par une absence complète de l'exon 4.

3.2. Structure des récepteurs KIR

Les récepteurs KIR sont structurellement caractérisés par 2 ou 3 domaines extracellulaires immunoglobulines « 2D » ou « 3D » qui reconnaissent spécifiquement les molécules du groupe HLA-C (p58 ou KIR2DL1-3) (Colonna 1995; Moretta 1993), HLA-B (p70 ou KIR3DL1) (Biassoni 1996; Gumperz 1995) et certains allèles HLA-A (p140) (D'Andrea et al. 1996).

Les récepteurs inhibiteurs, caractérisés par un long « L » domaine intracytoplasmique, agissent par l'intermédiaire de motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs), définis par la séquence I/V/L/SxYxxL/V (Mason 1997); (Campbell 1996); (Vivier 1997). Lors de la liaison avec le ligand HLA de classe I spécifique, les tyrosines sont alors phosphorylées, permettant le recrutement de protéines tyrosine phosphatases à domaine SH2, qui pourront, par leur activité phosphatase, inhiber la cascade de signalisation induite par les récepteurs activateurs (Anfossi et al. 2004).

Les récepteurs activateurs possèdent un domaine cytoplasmique tronqué (« S » pour short), sur lequel les motifs ITIM sont absents. Les gènes codant pour les formes activatrices des récepteurs KIR observent un changement de paire de bases au niveau de l'exon cytoplasmique qui aboutit à un codon stop précoce et la perte du motif ITIM. La présence d'un acide aminé chargé dans leur région transmembranaire permet leur association au polypeptide transmembranaire DAP12, qui possède des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) définis par un enchaînement YxxL/I (x)₆₋₈YxxL/I (Biassoni 1995). Ces motifs sont phosphorylés sur les résidus tyrosine après engagement de ces récepteurs. Les protéines phosphorylées permettent alors le recrutement de protéines tyrosine kinases à domaines SH2, initiateurs de la cascade de transduction du signal (Braud 1998).

Le récepteur KIR2DL4 représente une exception parmi les KIR puisqu'il possède à la fois un résidu arginine chargé positivement dans sa région transmembranaire et un motif ITIM au niveau d'un long domaine intracytoplasmique, expliquant ses fonctions activatrices et inhibitrices.

Lorsque 2 ou plusieurs gènes possèdent des structures très similaires, les deux gènes ne sont distingués que par une lettre finale : KIR2DL5A et KIR2DL5B, ou encore par l'annotation « variant » : KIR3DP1 et KIR3DP1v. Ces gènes sont certainement issus d'une duplication génique récente.

Le récepteur KIR à partir duquel dérivent tous les autres est un KIR à long domaine intra-cytoplasmique, avec 3 domaines Ig-like extra-membranaires, représenté chez l'homme par KIR3DL1, KIR3DL2 et KIR3DL3.

Cependant, la majorité des KIR humains ont 2 domaines extracellulaires Ig-like qui sont de deux types: les KIR2D qui possèdent des domaines homologues à D1 et D2 de KIR3DL (2DL1-3 et 2DS1-5) et les KIR2D qui possèdent des domaines homologues à D0 et D2 de KIR3DL (KIR2DL4 et KIR2DL5) (Vilches 2000a ; Vilches 2000b)

La diversité structurale caractéristique des récepteurs KIR est représentée sur la figure 10 ci-dessous :

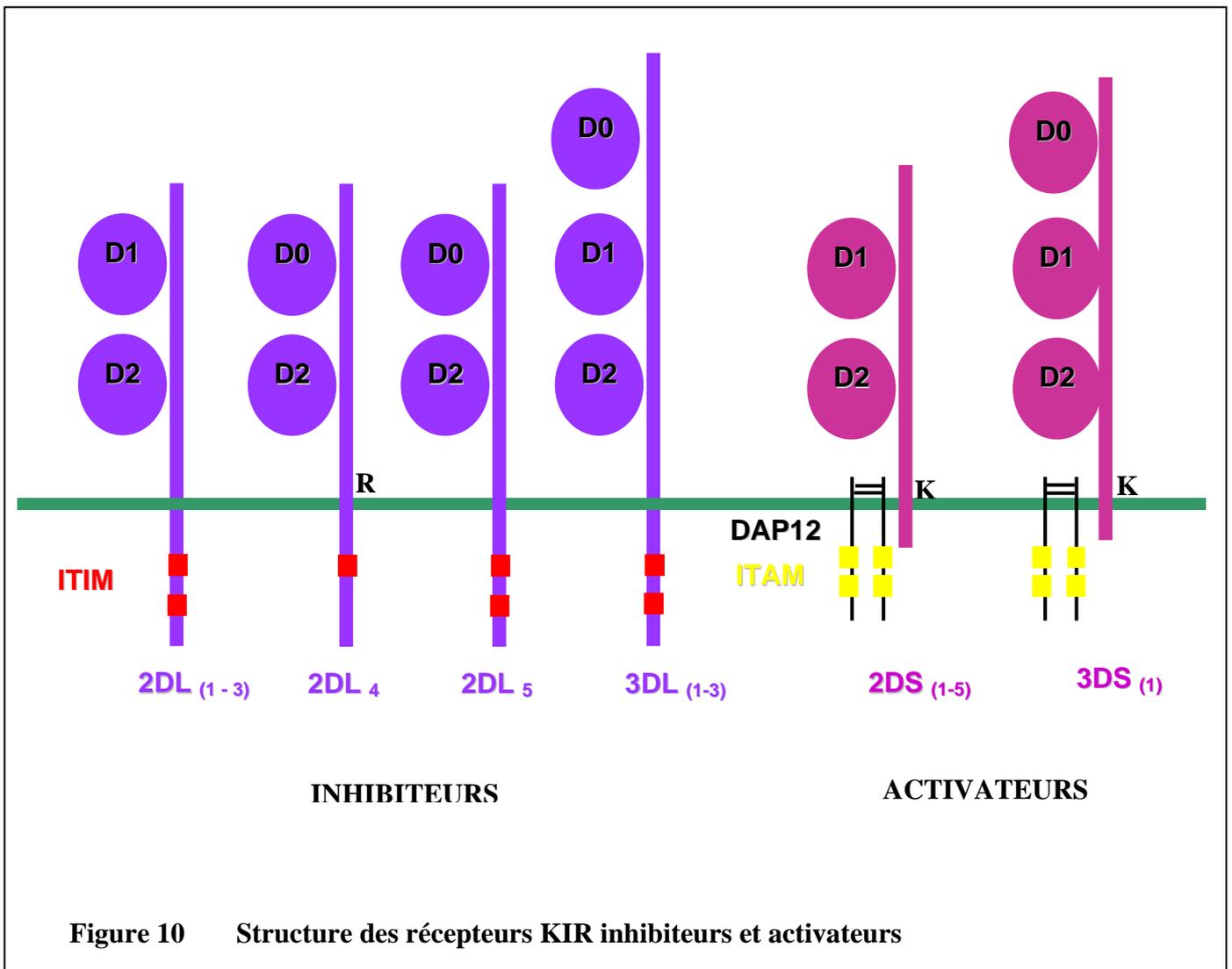


Figure 10 Structure des récepteurs KIR inhibiteurs et activateurs

3.3. Nomenclature

Le premier récepteur KIR défini était un récepteur inhibiteur, expliquant l'appellation "Killer-cell Inhibitory Receptor" initialement choisie. Malgré le fait que cette famille de molécules inclut aujourd'hui aussi bien des récepteurs activateurs qu'inhibiteurs, l'acronyme KIR a été conservé mais signifie aujourd'hui "Killer-cell Immunoglobulin-Like Receptor" (Long 1996).

La nomenclature (Garcia 2003) des gènes KIR (Tableau 1) a été déterminée par le comité de nomenclature du génome HUGO (HGNC) en 2002 ; elle est basée sur la structure des molécules qu'ils codent.

De nombreuses mises à jour ont été apportées très récemment concernant cette nomenclature, au vu des découvertes de nouveaux allèles et variants et des connaissances sur l'expression de ces allèles.

D'autre part, D. Middleton a créé un site (<http://www.allelefrequencies.net/>) regroupant les différents gènes et allèles KIR ainsi que leurs fréquences respectives, sur le même modèle que le système HLA.

La nomenclature utilisée afin de nommer les allèles KIR a été calquée sur celle appliquée aux allèles HLA; le nom du gène est ainsi suivi d'un astérisque, le séparant de la désignation numérique de l'allèle précisé par les 3 premiers digits. Les deux digits suivant permettent de distinguer les allèles ne différant que par des mutations silencieuses à l'intérieur de la séquence codante. Enfin les deux derniers digits distinguent les allèles qui diffèrent par des substitutions dans les introns, le promoteur, ou autre région non codante de la séquence.

Gène	Nom	Autres noms : CD	Anticorps	N° accession	Nombre allèles	Référence
KIR2DL1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 1	CD158a	EB6, HP3E4	L41267	9	1
KIR2DL2	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 2	CD158b1	GL183, CH-L	L76669	5	2
KIR2DL3	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 3	CD158b2	GL183, CH-L	L41268	6	1
KIR2DL4	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 4	CD158d	FES175	AF034771	20	3
KIR2DL5 A	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 5A	CD158f		AF217485	2	4
KIR2DL5 B	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique long, 5B			AF217486	3	5
KIR2DS1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique court, 1	CD158h	EB6, HP3E4	X89892	4	6
KIR2DS2	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique court, 2	CD158j	GL183, CH-L	L41347	7	1
KIR2DS3	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique court, 3			L76670	3	2
KIR2DS4	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique court, 4	CD158i		L76671	9	2
KIR2DS5	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, bras cytoplasmique court, 5	CD158g		L76672	5	2
KIR2DP1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 2 domaines, pseudogène 1	KIRZ, KIR2DL6		AF204908	2	4
KIR3DL1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 3 domaines, bras cytoplasmique long, 1	CD158e1	DX9, Z27	L41269	16	1
KIR3DL2	Killer cell immunoglobulin like receptor, 3 domaines, bras cytoplasmique long, 2	CD158k	DX31	L41270	13	1
KIR3DL3	Killer cell immunoglobulin like receptor, 3 domaines, bras cytoplasmique long, 3	CD158z		AF072407	5	7
KIR3DS1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 3 domaines, bras cytoplasmique court, 1	CD158e2		L76661	5	2
KIR3DP1	Killer cell immunoglobulin like receptor, 3 domaines, pseudogène 1	KIRX, KIR2DS6, CD158c		AF204915	5	4

Tableau 1 Nomenclature des gènes KIR (<http://www3.ebi.ac.uk>)

- 1 : (Colonna 1995)
- 2 : (Dohring 1996)
- 3 : (Uhrberg 1997)
- 4 : (Vilches 2000a)
- 5 : (Vilches 2000a)
- 6 : (Biassoni 1996)
- 7 : (Torkar 1998)

3.4. Diversité génétique « KIR »

3.4.1. Niveaux de diversité

L'analyse des séquences clonées à partir de l'ADN de différents individus, ainsi que l'étude de la région 19q13.4, ont permis d'individualiser les différents niveaux de variabilité génétique.

Tout d'abord, chaque individu possède dans son génome un panel variable de ces gènes KIR, portant sur le nombre de gènes et/ou sur la proportion entre les gènes activateurs et inhibiteurs (Husain 2002 ; Santourlidis 2002 ; Uhrberg 1997 ; Wilson 2000). Ces différents gènes peuvent donc être présents à l'état hétéro- ou homozygote, ou absents dans le génome.

Le typage des 14 gènes KIR codants et 2 pseudogènes actuellement caractérisés est effectué par technique de PCR-SSP (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Primers) le plus couramment et/ou par PCR-SSO (Polymerase Chain Reaction Sequence Specific Oligonucleotides).

Les résultats obtenus à partir d'études de populations ont permis de distinguer plus de 100 génotypes KIR différents, associant un nombre et/ou des spécificités de gènes variables (Crum 2000 ; Norman 2002 ; Norman 2001 ; Toneva 2001; Uhrberg 1997 ; Witt 1999). Ces génotypes sont représentés par un nombre de gènes KIR variant de 7 à 14. Le génotype le plus fréquent représente environ 27% de l'ensemble des individus et est caractérisé par un nombre de gènes restreint (n=7) ne comprenant qu'un unique gène codant pour un récepteur activateur (KIR2DS4).

L'étude des génotypes KIR a de plus montré la présence de déséquilibres de liaison entre plusieurs de ces gènes, faisant émerger la notion d'haplotype. Deux approches ont permis de définir les haplotypes KIR chez les individus (Figures 11 et 12) : la première, la

plus répandue est représentée par des études familiales et la seconde utilise une analyse génomique directe par séquençage nucléotidique de la région LCR (Wilson 2000).



Figure 11 Ordre et nature des gènes KIR dans les haplotypes A et B (Carrington M. et al.)

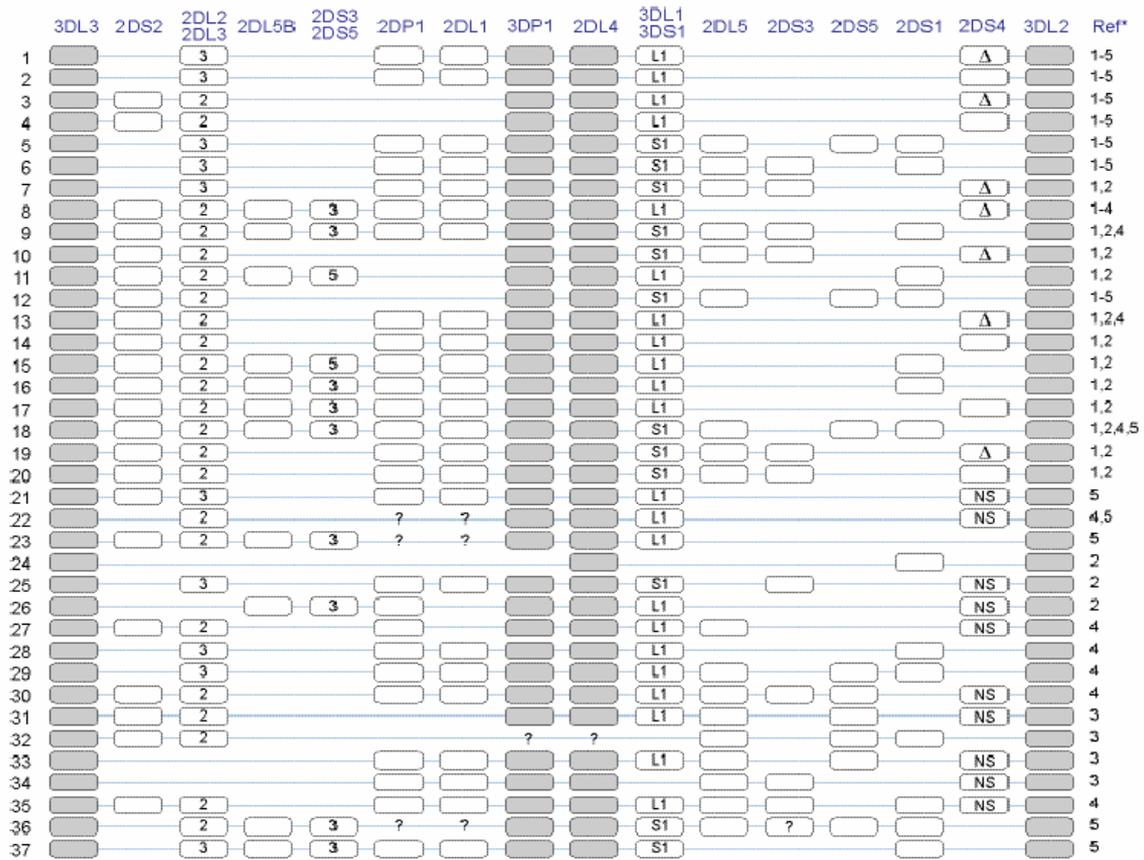


Figure 12 Les différentes possibilités d'haplotypes KIR, basées sur leur contenu en gènes KIR (Carrington M. et al.)

Les haplotypes KIR partagent 3 régions conservées au niveau de la région LCR. Une région centromérique constituée du gène KIR3DL3, une région centrale constituée du gène KIR2DL4 et du pseudogène KIR3DP1 et une région télomérique constituée du gène KIR3DL2. Les deux segments génomiques déterminés par ces 3 régions ubiquitaires sont caractérisés par la présence de gènes KIR variant dans leur nombre et leur nature. Martin et al. ont récemment proposé un modèle de duplication de la région chromosomique des gènes KIR et des haplotypes durant l'évolution des primates, expliquant l'organisation haplotypique de la région LRC (Martin et al. 2004).

En fonction des gènes KIR présents, deux groupes principaux d'haplotypes « A » et « B » ont été décrits (Uhrberg 1997 ; Witt 1999) (Vilches et al. 2000), basés sur différentes définitions :

Uhrberg et al ont différencié l'haplotype B par la présence d'un fragment supplémentaire Hind III de 24 Kb dans la région télomérique, mis en évidence par une technique de RFLP (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism) (Uhrberg 1997).

Witt et al ont défini l'haplotype A par la présence des loci inhibiteurs KIR2DL1 et KIR2DL3 et l'absence du KIR2DL2 au niveau de la région centromérique variable (Witt 1999). Les haplotypes du groupe A ont également été identifiés par la présence du KIR2DS4 comme unique gène codant pour un récepteur activateur, au niveau de la région variable télomérique alors que les haplotypes B étaient caractérisés par de multiples gènes KIR activateurs excluant le KIR2DS4.

Ainsi, les haplotypes du groupe B sont caractérisés par un nombre de gènes KIR activateurs important, alors que les haplotypes du groupe A n'en possèdent qu'un seul, voire deux lorsque l'on considère la double fonctionnalité activatrice et inhibitrice du récepteur KIR 2DL4 (Barten 2001 ; Gomez-Lozano 2002; Uhrberg 1997) Vilches C, 2000 #676 ; Trowsdale J 2001 ; Vilches C 2002b}.

Les études de ségrégation familiale dans les populations Caucasoïdes ont montré l'existence de plus de 20 haplotypes différents pour ces deux groupes « A » et « B ».

L'haplotype A représente de 47 à 59 % des haplotypes totaux (Uhrberg 1997), contre 41 à 53% pour l'ensemble des haplotypes B. Parmi les haplotypes B, le plus répandu représente 12% des sujets du panel étudié (Hsu 2002 ; Rajalingam 2002; Santourlidis 2002).

D'autre part, le troisième degré de polymorphisme tient aux variations alléliques mises en évidence par l'étude comparative des séquences d'ADNc des KIR pour chacun des locus KIR (Selvakumar and Dupont 1997). Le degré de variation allélique correspond au facteur de diversité le plus important, mais reste à définir. Actuellement, les nombres d'allèles identifiés les plus importants concernent ceux des gènes KIR2DL4 et KIR3DL1 avec respectivement 20 et 16 allèles (Tableau 1 page 46) (Rajalingam 2002; Uhrberg 1997). Ainsi les haplotypes identiques au niveau des gènes KIR peuvent être subdivisés et précisés en fonction de leur combinaison allélique (Rajalingam 2002; Uhrberg 1997).

Certaines séquences qui varient par la présence ou l'absence de motifs ITIM peuvent être positionnées au niveau d'un même locus et peuvent donc être considérées comme des allèles (par exemple les gènes inhibiteurs KIR3DL1 et activateurs KIR3DS1).

En conclusion, la diversité des génotypes KIR chez l'homme peut s'expliquer par d'une part la composition en gènes KIR des haplotypes, d'autre part le polymorphisme allélique et enfin la combinaison des haplotypes maternel et paternel. Ces 3 composantes expliquent pourquoi des individus non apparentés possèdent généralement des génotypes KIR différents et pourquoi des populations provenant d'éthnies différentes possèdent des fréquences de génotypes KIR différentes. Ce polymorphisme explique également les variations du répertoire KIR observées au niveau phénotypique.

Cependant, les implications fonctionnelles de cette diversité KIR restent encore fragmentaires, malgré les connaissances établies sur leurs interactions avec le système HLA.

3.4.2. Diversité des gènes KIR dans les populations : marqueurs génétiques

Quelques études effectuées dans des populations Caucasoïdes ont permis de déterminer les bases actuelles de la génétique des gènes KIRs.

Dans ces populations Caucasoïdes, les gènes KIR sont présents à des fréquences très différentes, variant de 27 à 100% (Tableau 2). Trois gènes KIR sont ubiquitaires dans ces populations : il s'agit des gènes KIR2DL4, -3DL2, -3DL3. Les gènes codant pour les récepteurs KIR activateurs sont présents à des fréquences inférieures comparées à celles des gènes des récepteurs inhibiteurs. En particulier, le gène KIR2DS3 est caractérisé par la fréquence antigénique la plus faible (27%).

D'autre part, il est important de préciser l'existence d'un variant du gène 2DS4, défini par une délétion de 22 pb au niveau du domaine Ig D2. Ce nouvel allèle « KIR1D », également référencé KIR2DS4*003, ne s'exprime pas à la surface des cellules. Il est cependant caractérisé par une fréquence génique proche de 80% dans la population Caucasoïde alors que le gène KIR2DS4 codant (allèles *001, *002, *004) n'est présent qu'à environ 35%.

Enfin, ces études de population ont révélé le comportement allélique d'au moins deux couples de gènes KIR : 3DL1/3DS1 et 2DL2/2DL3. Ainsi, ces gènes, s'excluant mutuellement, ne peuvent être portés que sur 2 chromosomes différents chez un même individu.

De nombreux déséquilibres de liaison ont également été découverts, que nous ne détaillerons pas dans ce travail.

La diversité des fréquences des gènes, génotypes et haplotypes KIR, mise en évidence à travers quelques récentes études (Canavez 2001 ; Niokou 2003; Norman 2002 ; Rajalingam

2002 ; Whang 2005 ; Yawata et al. 2002), permettent de définir les gènes KIR comme de bons marqueurs génétiques de populations humaines.

KIR	caucasoïde ^a n=90 *n=85	caucasoïde ^b n=233	caucasoïde ^c n=136	caucasoïde ^d n=465	caucasoïde ^e n=698	africains ^f
KIR2DL1	96 (0,80)	89 (0,67)	91 (0,70)	93,8 (0,75)	92,2 (0,72)	79 (0,54)
KIR2DL2	51 (0,30)	50 (0,29)	49 (0,28)	44 (0,25)	46 (0,26)	52 (0,30)
KIR2DL3	95 (0,77)	88 (0,65)	92 (0,72)	92,7 (0,73)	91,1 (0,70)	85 (0,62)
KIR2DL4	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,0)
KIR2DL5	56 (0,34)	nt	nt	52 (0,30)	nt	52 (0,30)
KIR2DS1	42 (0,24)	43 (0,24)	45 (0,26)	47,7 (0,28)	46 (0,26)	23 (0,12)
KIR2DS2	51 (0,30)	54 (0,32)	51 (0,30)	51,8 (0,30)	52,5 (0,31)	45 (0,26)
KIR2DS3	27 (0,14)	37 (0,20)	24 (0,13)	26,5 (0,14)	30 (0,16)	19 (0,10)
KIR2DS4	35 (0,20)	88 (0,65)	96 (0,79)	91,2 (0,70)	90 (0,68)	97 (0,82)
KIR1D	79 (0,54)*	nt	nt	nt	nt	nt
KIR2DS5	35 (0,20)*	21 (0,11)	32 (0,18)	33,6 (0,18)	29,4 (0,16)	24 (0 ;13)
KIR2DP1	96 (0,80)	nt	nt	nt	nt	nt
KIR3DL1	96 (0,80)	90 (0,68)	97 (0,83)	94 (0,75)	92,5 (72,6)	98 (0,87)
KIR3DL2	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,00)	100 (1,0)
KIR3DL3	100 (1,00)	100 (1,00)	nt	nt	nt	nt
KIR3DS1	47 (0,27)	46 (0,26)	42 (0,24)	41,9 (0,24)	43,3 (0,25)	13 (0,07)
KIR3DP1	93 (0,72)*	nt	nt	nt	nt	nt
KIR3DP1v	32 (0,17)*	nt	nt	nt	nt	nt

Tableau 2 Fréquences antigéniques (et géniques) des récepteurs KIR dans différentes populations Caucasoïdes et une population Africaine (données de la littérature).

a : Caucasoïdes, Irlande (Marsh 2003), * : Caucasoïdes, Etats-Unis (Hsu 2002)

b : Caucasoïdes, Grèce (Niokou 2003)

c : 136 Caucasoïdes, Grande-Bretagne (Norman 2001)

d : 52 Caucasoïdes, Etats-Unis (Uhrberg 1997) + 147 Caucasoïdes, Australie (Witt 1999) + 90 Caucasoïdes, Irlande (Crum 2000) + c + 49 caucasoïdes, Australie (Toneva 2001)

e : Caucasoïdes a + b + c + d.

f : Africains, Trinidad (Norman 2002)

3.5. Fonctionnalité des récepteurs KIR

3.5.1. Les ligands majoritaires : les molécules HLA de classe I

Différentes approches ont permis d'établir la relation « récepteur-ligand » que partagent les récepteurs KIR vis à vis des molécules HLA de classe I : étude de neutralisation par des anticorps monoclonaux, expériences de "binding" (Allan 1999; Fan 1997 ; Winter 1998) et enfin transfert direct de gènes (Biassoni 1995). Fonctionnellement, les molécules KIR2D reconnaissent majoritairement les ligands HLA-C (Biassoni 1995; Colonna 1993) et HLA-G alors que les molécules KIR3D interagissent avec les allèles HLA-A et HLA-B (D'Andrea et al. 1996; Dohring 1996 ; Litwin 1994).

Deux groupes d'allotypes HLA-C ont été identifiés en fonction de la nature des acides aminés en position 77 et 80 de l'hélice $\alpha 1$ de la molécule HLA-C :

Le premier groupe (groupe 1) d'allèles HLA-Cw possèdent les résidus Serine et Asparagine en position 77 et 80 (Ser77/Asn80) respectivement et regroupe entre autre HLA-Cw*01, -Cw*03, -Cw*07, -Cw*08, -Cw*12, -Cw*13, -Cw*14, -Cw*1601, -Cw*1603. Les NKR inhibiteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les allèles HLA-C de ce groupe; le récepteur activateur KIR2DS2, portant les mêmes domaines extra-cellulaires que le récepteur inhibiteur correspondant reconnaît ce même groupe 1 d'allèles HLA-Cw.

Le groupe 2 d'allèles HLA-C possède les résidus Asparagine et Lysine en position 77 et 80 (Asn77/Lys80) respectivement et incluent les molécules HLA-Cw*02, -Cw*04, -Cw*05, -Cw*06 -Cw*15, -Cw*1602, -Cw*1701, -Cw*18. Les récepteurs KIR2DL1 inhibiteur et KIR2DS1 activateur reconnaissent les allèles HLA-Cw du groupe 2.

Ainsi, ces molécules possèdent un polymorphisme très intéressant en positions 80 et 77, au niveau de la séquence de l'acide aminé qui détermine deux déterminants inhibiteurs distincts : par exemple, chez un individu possédant les deux allotypes HLA-C avec une lysine en position 80 et HLA-C avec une asparagine en position 80, la tolérance au soi dépendra de l'interaction via la lysine 80 et le KIR2DL1 par une partie de la population de cellules NK et de l'interaction entre l'asparagine 80 et les KIR2DL2 et KIR2DL3 pour une autre part de la population de cellules NK. Ainsi les cellules NK chez cet individu provoqueront la lyse des cellules allogéniques d'un individu homozygote en position 80, par l'une ou l'autre des populations NK. Ceci définit le modèle du soi manquant (Karre 2002).

Les récepteurs inhibiteurs semblent avoir une meilleure affinité que leurs équivalents activateurs pour les allèles HLA-C du groupe correspondant. Ainsi, à interactions inhibitrices et activatrices égales, les cellules NK développent préférentiellement un signal inhibiteur de la lyse (Biassoni 1997 ; Vales-Gomez 1998).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, le récepteur KIR2DL4 est unique parmi les membres de la famille KIR2D puisqu'il possède, outre sa double fonction inhibiteur-activateur, les domaines Ig dans une configuration D0-D2, alors que les autres KIR2D sont en configuration D1-D2. Ce récepteur se lie spécifiquement à la molécule HLA-G de classe I non classique.

Les molécules KIR 3DL1 et KIR 3DS1 reconnaissent les allotypes HLA-B possédant le motif Bw4 au niveau des résidus 80-83 dans le domaine α 1 de la chaîne lourde HLA.

Enfin, le KIR3DL2 reconnaît certains allèles HLA-A (A*03 et A*011).

Les ligands des récepteurs inhibiteurs KIR2DL5 et KIR3DL3 ainsi que ceux des 6 récepteurs activateurs (KIR2DS1-5 et KIR3DS1) sont actuellement mal définis et pourraient inclure des ligands non-HLA de classe I (Gomez-Lozano 2002).

Le récepteur KIR2DS4 est particulier parmi les KIR2D puisqu'il est constitué des résidus reconnaissant à la fois les molécules HLA-Cw des groupes 1 et 2. Katz et al ont montré que ce récepteur interagissait avec la molécule HLA-Cw4 (groupe 2) avec une très faible affinité, mais non avec la molécule Cw6 (groupe 2) (Katz 2001). Plus récemment, cette même équipe a révélé l'existence de ligands autres que les molécules HLA de classe I (Katz et al. 2004), de type protéique, exprimé sur des lignées cellulaires de mélanome.

La reconnaissance des récepteurs KIR avec leurs ligands dépend vraisemblablement d'autres résidus au niveau de la molécule HLA, puisque par exemple, la présence de résidus Serine et Asparagine, en position 77 et 80 de certains allèles HLA-B (identiques aux marqueurs HLA-C de groupe 1) ne permet pas la reconnaissance KIR2DL2 attendue. Egalement, le récepteur KIR2DS2 activateur ne se lie pas aux molécules HLA-Cw3, reconnues par le récepteur KIR2DL2 inhibiteur, malgré une homologie en acide aminé extracellulaire de 99 %. Ainsi, une variation minime au niveau des acides aminés impliqués dans la structure tridimensionnelle de la molécule KIR peut altérer les capacités de reconnaissance de la molécule HLA classe I (Saulquin 2003).

Dans ce même contexte, des études de cristallographie au niveau de la structure du KIR2DL2 « complexé » avec son ligand HLA-Cw3 chargé de son peptide, suggèrent la probable présence d'une région de liaison au ligand sur le récepteur (Boyington 2000; Fan 1997), ainsi que la nécessité d'un peptide préférentiellement en position P8 de la poche à peptide. Cette reconnaissance peptide spécifique au niveau du résidu 8 (Fan 1997) a été

récemment confirmée entre le récepteur KIR3DL2 et les molécules HLA-A3 et A11 (Hansasuta 2004).

Les récepteurs inhibiteurs spécifiques des molécules HLA de classe I représentent d'importants médiateurs de la tolérance au soi au niveau des cellules NK. Ces récepteurs spécifiques des molécules HLA incluent également le CD94 :NKG2A qui est spécifique des molécules HLA-E chargées en peptides dérivés de peptides signal des molécules HLA de classe I (Borrego et al. 2002 ; Braud et al. 1998) et LIR 1 un autre récepteur inhibiteur codé au niveau du LCR et se liant au domaine alpha 3 des molécules HLA de classe I (Willcox 2003).

3.5.2. Le répertoire KIR : expression protéique et fonction

Les gènes KIR sont exprimés majoritairement à la surface des cellules NK. Quelques populations de lymphocytes T expriment également les marqueurs KIR : les lymphocytes CD8⁺ mémoires (Anfossi et al. 2004), une très faible proportion de lymphocytes CD4⁺ ainsi que certains lymphocytes $\gamma\delta$ (Mingari 1996) ; Lafarge, 2005 #221}. Cependant, au niveau des cellules T, ces marqueurs et plus généralement les récepteurs NKRs exprimés, agissent comme des molécules de co-stimulation en augmentant ou non la stimulation des récepteurs des cellules T (TCR), mais ne fournissent pas de signal d'activation ou d'inhibition complet, contrairement à l'action de ces mêmes récepteurs exprimés à la surface des cellules NK (Namekawa 2000).

Bien que 14 gènes KIR fonctionnels aient été identifiés (Uhrberg 1997 ; Wilson 2000), les fonctions de ces récepteurs ont été attribuées au produit de quelques uns d'entre eux seulement, représentés par les récepteurs inhibiteurs qui ont pour ligands des molécules HLA de classe I connus : HLA-A (3DL2), HLA-B (KIR3DL1) et HLA-Cw (KIR2DL1-3).

Chaque clone NK du sang périphérique circulant exprime différentes combinaisons de récepteurs KIR dont le nombre varie de 1 à 8 parmi les récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs présents au niveau du génotype (Uhrberg 1997). La plupart des gènes KIR sont clonalement exprimés au niveau des cellules NK, à l'exception de 2 gènes KIR : premièrement le gène KIR2DL4, qui est toujours transcrit dans les cellules NK, mais dont l'expression ubiquitaire à la surface des cellules NK reste encore controversée (Goodridge 2003; Rajagopalan 1999 ; Uhrberg 1997). Deuxièmement, le gène KIR3DL3 est exprimé à de très faibles (voire indétectables) niveaux sur les cellules NK du sang périphérique (Long et al. 2001; Torkar 1998). Le processus normal de développement des cellules NK implique que les cellules NK circulantes soient tolérantes vis à vis des cellules saines autologues, par l'intermédiaire des interactions entre les récepteurs KIR inhibiteurs exprimés sur les cellules NK et les ligands HLA de classe I à la surface des cellules autologues. Par conséquence, toutes les cellules NK expriment au minimum un récepteur inhibiteur spécifique d'un ligand HLA de classe I autologue (Uhrberg 1997).

Néanmoins, Grau et al démontrent dans une récente étude (Grau et al. 2004) l'existence de clones NK potentiellement autoréactifs exprimant des récepteurs KIR pour lesquels les ligands correspondants sont absents. Ces clones expriment cependant le récepteur CD94 : NKG2A dont le signal inhibiteur ne nécessite pas d'interaction avec les molécules HLA-C. L'existence de ces clones pourrait ainsi s'expliquer par la présence d'un signal inhibiteur dominant « médié » par le récepteur CD94 :NKG2A.

Etant donné le polymorphisme des molécules HLA de classe I, les populations de cellules NK tolérantes vis à vis des molécules HLA de classe I autologues ne le sont pas nécessairement vis-à-vis des cellules exprimant des molécules HLA de classe I allogéniques. De manière complémentaire aux populations de cellules T, les cellules NK sont réactives vis-à-vis de différences particulières au niveau des molécules HLA de classe I. L'alloréactivité

NK est observée lorsque les molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules allogéniques n'incluent pas tous les déterminants inhibiteurs HLA de classe I correspondant à la spécificité HLA de classe I de la cellule NK. Dans ces circonstances, une partie de la population de cellules NK ne sera pas inhibée par les molécules HLA de classe I allogéniques et ces cellules NK pourront lyser les cellules allogéniques (Uhrberg 1997).

Cette alloréactivité NK peut être intéressante pour des patients recevant des cellules souches hématopoïétiques allogéniques, dans un contexte de greffe.

Le fait que les populations NK puissent être tolérantes au soi mais réactives vis à vis de cellules allogéniques soulève l'hypothèse d'interactions entre les récepteurs KIR et les molécules HLA de classe I influençant le répertoire d'expression des récepteurs KIR au niveau des cellules NK du sang périphérique, la transmission des gènes KIR et HLA étant indépendante (Rajalingam 2002). Le répertoire phénotypique KIR est dépendant du génotype KIR. L'influence du génotype HLA est beaucoup plus subtile avec un effet principalement observé sur les fréquences des cellules exprimant les récepteurs KIR et non sur les niveaux d'expression.

Les récepteurs KIR exprimés au niveau des cellules NK et T CD8 mémoires sont caractérisés par une régulation post-transcriptionnelle (Dolstra 2001). Pour cette raison, l'expression des gènes KIR est très variable d'une cellule à l'autre et d'un individu à l'autre. Les différences observées dans les niveaux d'expression des gènes KIR sont également dues au polymorphisme allélique des gènes KIR (Gardiner 2001), avec la présence de variants alléliques non exprimés comme par exemple, certains allèles KIR3DL1.

En ce qui concerne les récepteurs KIR activateurs, les ligands et les fonctions sont très mal connues. De nombreux individus homozygotes pour l'haplotype A ne possèdent que très

peu de récepteurs KIR activateurs. De plus, les gènes activateurs de l'haplotype A, KIR2DL4 et KIR2DS4, possèdent des formes alléliques non fonctionnelles (Hsu 2002; Martin 2000). Ainsi, certains individus ne possèdent aucun gène KIR activateur dans leur génome. Au contraire, des individus ne possédant pas de récepteurs KIR inhibiteurs n'ont jusqu'à maintenant pas été observés. Les récepteurs activateurs pourraient avoir un rôle moins indispensable que les récepteurs KIR inhibiteurs.

Néanmoins, de nombreuses études en clinique ont montré l'implication de récepteurs KIR activateurs dans certaines pathologies auto-immunes ou tumorales. Certaines démontrent une corrélation entre la présence du gène KIR activateur et l'absence du ligand HLA-Cw correspondant au récepteur KIR inhibiteur : KIR2DS1 et KIR2DS2 dans l'arthrite psoriasique (Gomez-Lozano et al. 2002), KIR2DS2 en greffe de CSH chez des patients atteints de LAM (Cook 2004). D'autres études révèlent un effet délétère dans le diabète (van der Slik et al. 2003), ou l'arthrite rhumatoïde (Yen 2001). Les interprétations restent cependant compliquées du fait de la présence de différentes formes alléliques de ces gènes KIR et des nombreux déséquilibres de liaison établis notamment entre 2DS2 et 2DL2 ne permettant pas de savoir lequel des 2 gènes est impliqué.

De plus, le répertoire des récepteurs KIR exprimé à la surface des cellules reste difficile à évaluer puisqu'il n'existe aujourd'hui pas d'anticorps monoclonal réellement spécifique d'un récepteur. Les seuls anticorps disponibles sont représentés par l'anticorps anti-CD158a (anti-KIR2DL1/2DS1), l'anticorps anti-CD158b (anti-KIR2DS2/2DL2/2DL3), l'anticorps anti-p70 (anti-KIR3DL1) et l'anticorps anti-p50 (anti-KIR2DS4).

3.5.3. Régulation des récepteurs KIR

Les gènes KIR, tout comme les gènes HLA, sont caractérisés par un fort polymorphisme. Ainsi, 99% des individus non apparentés présentent un génotype KIR ou HLA différent. Ces deux familles de gènes sont localisées sur deux chromosomes différents (19 et 6) et ségrègent donc indépendamment. D'après ces caractéristiques génétiques, en greffe allogénique apparentée HLA identique, environ 25% des couples présentent des génotypes KIR identiques contre 75% différents. En greffe de CSH allogénique non apparentée, ce dernier pourcentage approche les 100% et rend intéressante l'étude de la reconstitution du répertoire NK « donneur » dans un contexte de greffe de CSH allogénique « receveur ». La reconstitution du répertoire des récepteurs à la surface des cellules NK a été étudiée en 2003 par Shilling et al (Shilling 2003) dans des greffes allogéniques HLA identiques. Cette étude effectuée sur une période de 3 ans post-greffe a permis de caractériser 3 groupes de profil de reconstitution différents : le premier montrait une reconstitution de l'expression des récepteurs KIR, pendant la première année post-greffe, de phénotype du donneur, différent du phénotype KIR du receveur déterminé avant la greffe ; le second groupe présentait des fréquences d'expression des récepteurs KIR inférieures et des récepteurs CD94 :NKG2A supérieures à celles du donneur pendant la première année qui se normalisaient par la suite pour certains receveurs ; enfin, le troisième groupe dont le profil d'expression était moins bien défini, regroupait des patients ayant eu de sévères complications cliniques. Ces résultats confirment que en greffe de CSH allogénique, le répertoire KIR reconstitué chez le receveur correspond au phénotype KIR du donneur qui, nous l'avons évoqué plus haut, dépend principalement du génotype KIR. Par ailleurs, et comme l'ont montré les travaux précédents, quelque soit le profil, l'expression des récepteurs KIR immédiatement après la greffe est basse puis

augmente progressivement pour atteindre des valeurs proches de celles du donneur et inversement, le répertoire d'expression des récepteurs CD94 :NKG2A est plus précoce et mature après la greffe.

L'étude de N'guyen et al (Nguyen et al. 2005) sur le phénotype des cellules NK en reconstitution post-greffe de CSH apparentées haploidentiques et T déplétées a en partie confirmé ces premiers résultats sur 10 jeunes adultes atteints de LAM. Ainsi, en période post-greffe précoce, la fréquence des cellules NK exprimant des récepteurs KIR (tout comme pour le récepteur NKp30) reste faible pendant les 4 premiers mois post-greffe alors que la plupart des cellules NK expriment les récepteurs CD94 :NKG2A. La reconstitution des cellules NK est très précoce avec une population CD3⁻CD56^{bright} très majoritaire et peu cytotoxique, par rapport à la population CD3⁻CD56^{dim} cytotoxique (CD16⁺). Le phénotype des cellules NK semble devenir mature plus tardivement, avec une inversion du ratio de CD3⁻CD56^{bright} / CD3⁻CD56^{low} associée à l'apparition de fonctions cytotoxiques, et une régulation de l'expression des récepteurs : augmentation des clones positifs en récepteurs KIR, diminution de l'expression CD94 :NKG2A et augmentation de l'expression du marqueur NKp30. Malgré la présence de greffons incompatibles au niveau des ligands des KIR dans le sens GvH, aucune amplification de clone alloréactif n'est retrouvée, associée à une absence d'effet GvL. Le fort taux d'expression du récepteur CD94 :NKG2A est certainement responsable non seulement de l'absence d'autoréactivité NK mais aussi par conséquent de l'absence d'effet GvL.

4 LES CELLULES NK ET LES RÉCEPTEURS KIR EN GREFFE

DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

4.1. Expérience sur le modèle murin (Barao 2003)

L'alloréactivité des cellules NK peut s'exercer dans deux sens opposés : le sens du greffon vers l'hôte (Graft-versus-Host ou GvH) et celui de l'hôte vers le greffon (Host-vs-Graft ou HvG).

Le sens « Host-versus-Graft » correspond au modèle de résistance hybride. Ce modèle présente des souris F1 issues de parents congéniques incompatibles au niveau de la région H2. Ainsi, les souris hybrides sont homozygotes pour la plupart du génome et hétérozygotes au niveau de cette région H2. Ces souris F1 létalement irradiées sont capables de rejeter la moelle osseuse des deux parents homozygotes H2 différents de la même façon que s'il s'agissait d'une souris irradiée allogénique (H-2 incompatible) (Cudkowicz 1971); Ces résultats défient les lois de transplantation connues par la transmission héréditaire des antigènes parentaux à la descendance, qui induit systématiquement une tolérance de la descendance vis-à-vis des antigènes d'histocompatibilité parentaux. Les cellules responsables de ce phénomène de résistance hybride sont des cellules radiorésistantes identiques aux cellules lymphoïdes, caractérisées plus tard pour leur capacité à lyser les cellules tumorales et les cellules infectées par les virus dépourvues de marqueurs HLA à leurs surfaces (Biron 1999; Herberman 1981 ; Murphy 1993 ; Trinchieri 1989). Ces cellules tueuses ont été dénommées cellules « Natural Killer ». D'autres études réalisées en 1987 ont permis de confirmer la capacité des cellules NK à induire le rejet de greffe de moelle osseuse à partir

d'un modèle de souris SCID (Severe Combined Immune Deficiency), caractérisées par l'absence de cellules T et B mais avec une fonction cellulaire NK normale (Bennett 1987).

L'alloréactivité NK dans le sens Graft-versus-Host suscite depuis quelques années un vif intérêt depuis les travaux d'une équipe italienne réalisés sur un modèle murin qui démontre le rôle bénéfique des cellules NK sur les réactions immunologiques post-greffe. Des clones NK obtenus à partir de splénocytes de souris H2 b*d ont été purifiés et testés pour leur alloréactivité contre des souris cibles receveuses H2b ou H2d. Les clones de cellules NK alloréactives du donneur constitués du récepteur spécifique pour H-2d, étaient activés et provoquaient la lyse des cellules cibles du receveur (H-2b) sans provoquer de GvHD. Cette lyse était comparable à celle observée lors de l'injection de grandes quantités de cellules NK alloréactives chez une souris irradiée. Ces résultats étaient similaires lorsque les clones de cellules NK exprimant le récepteur spécifique de H-2b étaient administrés à une souris H-2d (Ruggeri 2001 ; Ruggeri 2002 ; Shlomchik 1999).

En 1994, Zeis et al (Zeis 1994) ont établi la contribution des cellules NK au contrôle du développement de la tumeur sans génération de GvHD. L'injection de cellules NK allogéniques activées par l'IL2 chez une souris atteinte de leucémie induisait un effet antileucémique (GvL) post-greffe de moelle, sans induire d'effet GvH. En comparaison, l'effet GvL induit par l'injection de cellules NK syngéniques était inférieur. De plus, la plupart des souris qui avaient reçues une greffe de moelle allogénique mais sans administration de cellules NK subissaient une GvHD sévère.

D'autres études ont montré que le transfert adoptif de cellules NK activées de souris H-2d chez des souris H-2b atteintes de tumeur solide métastatique après greffe de moelle osseuse, provoquait un effet antitumeur, protégeait contre la GvH et améliorait la survie des souris (Asai 1998; Murphy 1997). Dans cette étude, l'effet protecteur contre la GvH semblait

dû à la sécrétion de TGF beta immunosuppresseur puisque l'injection simultanée d'un anticorps neutralisant anti-TGF beta annulait cet effet protecteur.

4.2. Implication des récepteurs KIR des cellules NK dans le devenir de la greffe de CSH : travaux réalisés chez l'homme

L'utilisation de conditionnement myéloablatif intense chez l'homme élimine la quasi-totalité des cellules (NK et T) du receveur avant la greffe et rend la réaction de rejet du greffon par le receveur difficilement analysable in vivo. Dans les greffes à conditionnement atténué, le rôle des cellules NK du receveur dans le rejet du greffon est plus controversé à cause de la présence également de cellules T, très impliquées dans les réactions de rejet.

Etant donné la reconstitution rapide des cellules NK en post-greffe, de nombreuses équipes se sont ainsi intéressées aux réactions de GvH et GvL contrôlées par ces cellules NK, et ce malgré l'absence de déplétion T des greffons.

L'analyse du rôle des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK a débuté par les travaux de Tanaka et al qui se sont plus particulièrement intéressés aux récepteurs qui possédaient comme ligands les molécules HLA de classe I (Tanaka 2000).

Au laboratoire, Gagne et al (Gagne 2002) ont étudié l'influence des génotypes KIR des receveurs et donneurs en greffe de CSH allogénique. Dans les greffes non apparentées HLA identiques, la combinaison selon laquelle le receveur possédait un génotype KIR inclus (tous les gènes KIR du receveur sont ainsi présents chez le donneur) dans celui du donneur a été définie comme une combinaison à fort risque de GvHD. Au contraire, aucune GvHD n'a été observée dans les greffes apparentées présentant cette même combinaison à risque. Parmi les gènes KIR présents dans le génotype du donneur et absents du génotype du receveur selon

cette combinaison, les gènes KIR activateurs étaient majoritaires et en particulier le gène KIR2DS3. Nous avons ensuite vérifié ces résultats sur une cohorte plus importante de patients en nous focalisant plus particulièrement sur le récepteur KIR2DS3 activateur. Les résultats n'ont pas permis de confirmer le rôle de ce récepteur activateur, mais ont confirmé cette combinaison KIR D/R à risque de GvHD.

L'intérêt des récepteurs KIR en greffe de CSH s'est accentué avec l'étude d'une équipe italienne sur l'alloréactivité des cellules NK dans le cadre de greffes de CSH haploidentiques (Ruggeri 2002). Ruggeri et al ont montré le bénéfice apporté en terme de survie et de protection contre la GvHD, d'incompatibilités au niveau des molécules ligands des récepteurs KIR dans le sens de la GvH (présence de ligands sur les cellules du donneur, non retrouvés sur les cellules du receveur) en greffe de CSH T-déplétée et chez les seuls patients atteints de LAM. Les incompatibilités concernaient plus particulièrement les groupes C1 et C2 des molécules ligands HLA-Cw des récepteurs KIR. L'hypothèse évoquée afin d'expliquer ces résultats était une destruction des cellules CPA du receveur par les cellules NK alloréactives, les CPA étant définies comme les cellules responsables de la phase initiale dans la GvHD. D'autre part, l'administration de ces cellules NK alloréactives provoquaient la destruction des cellules leucémiques chez des souris atteintes de LAM, exerçant donc un effet GvL bénéfique. Cette étude présentait donc un effet thérapeutique potentiel très intéressant. L'administration de cellules NK alloréactives en greffes de CSH, HLA incompatible, a été réalisée chez des patients atteints de LAM. Cependant, ces clones NK alloréactifs d'origine du donneur n'ont pas été retrouvés dans le sang du patient au-delà de 4 mois post-greffe ne permettant ni d'effet GvL ni de surveillance immunitaire durables (Ruggeri et al. 1999). Par ailleurs, ces résultats ont été observés uniquement dans le cadre de LAM. La susceptibilité à la lyse NK des cellules leucémiques de LAM dans l'alloréactivité NK pourrait s'expliquer par

la présence de l'expression de la molécule d'adhésion LFA-1 (CD11-a), absente sur les cellules de LAL, et nécessaire à la lyse « médiée » par les cellules NK.

Comme l'ont mis en évidence quelques études récentes (Dolstra 2001; Halary 1997), l'effet GvL a également été attribué aux lymphocytes T $\gamma\delta$ du donneur qui expriment les récepteurs KIR à leur surface. Cependant, comme pour les cellules NK, leur rôle dans l'induction de GvL après greffes HLA identiques non déplétées en cellules T reste à définir.

Cette étude a ensuite été suivie de nombreuses études réunies dans une revue récente (Bignon 2005), qui présentaient des résultats similaires ou contradictoires selon les conditions de greffe testées (greffes apparentées/non-apparentées, HLA identiques ou non, avec conditionnement myéloablatif ou non, avec ou sans prophylaxie anti-GvH sous ATG, avec déplétion en cellules T du greffon ou non).

En contradiction avec l'étude italienne, Bishara et al ont montré dans une étude similaire, une prévalence augmentée de GvHD dans le groupe de patients caractérisé par un potentiel d'alloréactivité NK dans le sens GvH. Néanmoins, les génotypes KIR déterminés chez le donneur et le receveur ont permis d'établir une corrélation entre le nombre de gènes KIR activateurs (supérieur à 4) chez le donneur et l'incidence augmentée de réactions de GvHD (Bishara 2004).

De même, Davies et al (Davies 2002) ont travaillé sur des greffes de CSH avec donneurs non apparentés présentant au minimum une incompatibilité au niveau des ligands des récepteurs KIR et n'ont observé aucune amélioration en terme de survie ni de protection contre la GvHD ni encore d'augmentation d'effet GvL dans le groupe présentant une incompatibilité dans le sens GvH. Les résultats ont révélé une tendance (non significative) à une augmentation du risque de GvHD de grade II-IV. Cependant, ces greffes étant pour la plupart non T déplétées, contrairement aux greffes haploidentiques étudiées par Ruggeri, les

lymphocytes T étaient ainsi susceptibles de masquer la réactivité des cellules NK. De plus, elles comprenaient à la fois des patients atteints de LAM et de LMC.

Dans un contexte de greffes de CSH non apparentées chez des patients ayant reçu une prophylaxie ATG pendant le préconditionnement, aucun effet bénéfique d'incompatibilités au niveau des ligands des KIR n'a été retrouvé (Schaffer 2004).

A l'inverse, Giebel et al ont démontré une amélioration en terme de survie, une diminution de l'incidence de GvHD aigue de grade III-IV chez les patients greffés avec un donneur non-apparenté présentant une ou plusieurs incompatibilités au niveau des ligands des KIR dans le sens de la GvH. Dans cette étude, tous les patients avaient reçu de l'ATG en pré-greffe (Giebel 2003).

Dans une étude similaire, Bornhauser et al ont rapporté une augmentation du risque de rechute dans le groupe de patients traités avec de l'ATG et greffés avec une incompatibilité au niveau des ligands des KIR (Bornhauser 2004).

L'interprétation du rôle des récepteurs NK-KIR, obtenue avec ces résultats contradictoires est effectivement limitée par l'hétérogénéité des paramètres caractérisant les cohortes de patients étudiés : conditionnement, prophylaxie anti-GvH incluant l'ATG en pré-greffe, puissant dépléteur T in vivo, nombre de cellules nucléées administrées, déplétion en lymphocytes T. Tous ces paramètres influencent le pool de lymphocytes T présents chez le receveur pendant la reconstitution post-greffe qui selon son importance entre en compétition avec le pool de cellules NK, en masquant leur rôle dans les événements immunologiques post-greffe (GvH/GvL).

Avec pour objectif d'homogénéiser ces paramètres, Beelen et al (Beelen 2005) ont étudié le rôle des incompatibilités des ligands des KIR sur les événements post-greffe de CSH allogéniques sans déplétion T, dans une cohorte de patients bien définie, atteints par la même

pathologie et ayant subi le même conditionnement. Globalement cette étude ne confirmait pas l'ensemble des effets bénéfiques observés par Giebel et al (Giebel 2003). Une diminution du risque de rechute a été observée avec cependant augmentation des échecs primaires de prise de greffe.

Une seconde étape dans les études sur le rôle des récepteurs KIR en greffe de CSH a consisté à étudier non seulement la présence ou l'absence des gènes ligands HLA à la surface des cellules du receveur mais aussi la présence ou l'absence du gène KIR récepteur correspondant (en particulier des gènes KIR inhibiteurs), à la surface des cellules NK du donneur.

Hsu et al ont ainsi étudié le devenir de patients ayant reçu une greffe allogénique T déplétée HLA identique, en fonction de la présence ou l'absence des ligands des récepteurs KIR inhibiteurs présents chez le donneur. Plus de 60% de l'effectif étudié se trouvait dans le cas d'absence de ligand HLA chez le receveur correspondant au récepteur KIR inhibiteur présent chez le donneur. Un effet bénéfique sur la survie a été retrouvé chez des patients atteints de LAM ou myélodysplasie qui ne présentaient pas le ligand HLA spécifique des récepteurs KIR inhibiteurs présents chez le donneur. De plus, cet effet bénéfique était accentué lorsque 2 ligands HLA (HLA-C et HLA-B) étaient absents sur les cellules du receveur, alors que les récepteurs KIR inhibiteurs correspondants étaient présents chez le donneur (Hsu 2005).

Leung et al (Leung 2004), dans une étude de greffes de CSH pédiatriques HLA haploidentiques déplétées en lymphocytes T, a ensuite confirmé les résultats observés par Ruggeri et al (Ruggeri 2002) en démontrant néanmoins que le fait d'étudier uniquement les ligands HLA en extrapolant sur la présence ou non des récepteurs KIR chez le donneur et le receveur n'aboutissait pas au même regroupement de patients. En effet, l'absence de ligands

HLA n'implique pas systématiquement l'absence des gènes KIR correspondants, chez un même individu. De plus, l'acquisition du répertoire est indépendante du génotype HLA en ce qui concerne sa spécificité. Contrairement aux résultats publiés par Ruggeri et al, les résultats de cette étude concernaient à la fois les LAM et les LAL puisque les cellules blastiques d'enfants atteints de LAL expriment de forts taux de molécules d'adhésion telles que LFA-1, à l'inverse non exprimées chez les adultes atteints de LAL. Les auteurs ont approfondi l'analyse en démontrant un effet GvL augmenté lorsque le nombre d'incompatibilités ligand-récepteur était augmenté. De plus, l'activation des cellules NK préalablement avec de l'IL12 et de l'IL18 semblait accroître le potentiel cytotoxique de ces cellules, indépendamment de l'influence des récepteurs KIR.

Enfin, au vu des résultats publiés concernant les récepteurs KIR activateurs et leur rôle en l'absence du ligand du récepteur KIR inhibiteur correspondant, dans les maladies autoimmunes telles que l'arthrite du psoriasis (Gomez-Lozano et al. 2002), Cook et al (Cook 2004) se sont intéressés aux récepteurs KIR activateurs et ont montré une diminution de la survie chez des patients atteints de LAM homozygotes, C2/C2, greffé avec un donneur KIR2DS2+ par rapport à un receveur C1/C1 ou C1/C2. Ainsi, l'absence du ligand HLA de la forme inhibitrice du récepteur KIR2DS2 conduisait à une augmentation des rejets et des infections, sans effet sur les effets GvH et GvL.

LES OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

L'implication des cellules Natural Killer en greffes allogéniques de CSH, démontrée dans les années 90, a entraîné un fort engouement des équipes de recherche à étudier ces cellules et plus particulièrement les récepteurs inhibiteurs et activateurs qu'elles expriment. Parmi ces récepteurs, les récepteurs KIR ont suscité un vif intérêt du fait de leur diversité structurale et fonctionnelle et de leur interaction avec le système d'histocompatibilité HLA, responsable par son polymorphisme des réactions immunologiques (rejet, GvH, GvL) en greffes allogéniques de CSH. La présence de clones NK alloréactifs a ainsi été démontrée en période post-greffe allogénique de CSH, responsables des réactions immunologiques précoces.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à cette alloréactivité des cellules NK « médiée » par les récepteurs KIR exprimés à leur surface et liée aux interactions de ces récepteurs avec les molécules ligands HLA. Ces études ont été principalement réalisées lors des événements précoces post-greffes allogéniques de CSH considérant notamment les réactions de GvH aiguë. Nos études ont prolongé le travail initial sur le rôle d'incompatibilités des gènes KIR activateurs et inhibiteurs entre donneur et receveur, dans le devenir des greffes allogéniques de CSH. Les résultats ont montré l'implication d'incompatibilités au niveau des gènes KIR entre le receveur et le donneur sur l'incidence de la GvHD aiguë en greffes de CSH non apparentées. Etant donné l'importance de la diversité génotypique KIR en greffe de CSH suggéré par ce travail, nous avons réalisé une étude de la diversité des gènes KIR dans des populations de différentes origines : Françaises Métropolitaine, Guadeloupéenne et Réunionnaise, Finlandaise et Sénégalaise. Les marqueurs KIR polymorphes se sont révélés être de bons marqueurs génétiques de population, à l'image de leurs ligands, les molécules HLA. Les données sur la distribution du polymorphisme KIR entre les différentes populations, couplées aux données concernant ces récepteurs en greffe de CSH, pourraient permettre de mieux appréhender les règles immunogénétiques NK en intégrant le double polymorphisme

KIR-HLA, et à terme de sélectionner un donneur idéal répondant à des critères de génotype KIR particulier dans le but d'une greffe à incompatibilité(s) KIR-HLA précise(s).

L'expression des gènes KIR est cependant très fortement régulée au niveau transcriptionnel, impliquant une forte variabilité inter-individuelle et inter-clonale chez un même individu. Ainsi, dans un second temps, nous nous sommes intéressés au répertoire de transcrits des récepteurs KIR des cellules NK pendant la reconstitution post-greffe de CSH. Une corrélation a ainsi été établie entre un pic de transcrits KIR précoce et l'absence de réaction GvH aigue.

Ces études réalisées au niveau du répertoire génétique et transcriptionnel KIR nécessitaient donc une confirmation au niveau phénotypique de la présence du récepteur KIR à la surface des cellules NK avec l'évaluation du taux d'expression des différents récepteurs, afin d'appréhender leur réelle implication dans les événements post-greffe de CSH. Malgré le faible nombre d'anticorps monoclonaux actuellement disponibles, et leur manque de spécificité, nous avons étudié le rôle fonctionnel des clones NK alloréactifs à travers l'expression des récepteurs KIR à leur surface. Pour cela, nous avons déterminé un modèle in vitro d'alloréactivité NK dans lequel les cellules NK de génotype KIR donné sont confrontées aux cellules cibles exprimant ou non les molécules ligands HLA correspondantes. Ce modèle aura pour objectif d'analyser l'alloréactivité de clones NK de donneurs vis-à-vis de cellules leucémiques de receveurs atteints de LAM, au cours de la reconstitution précoce post-greffe, période pendant laquelle ont lieu les événements de GvH aigues et GvL.

RESULTATS

1 PUBLICATION N°1 : INCOMPATIBILITES DES GÈNES KIR
EN GREFFE DE CSH

**Impact du polymorphisme des gènes KIR dans le devenir des greffes de
cellules souches hématopoïétiques**

« Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome »

Katia Gagne, Laure Denis, Brigitte Gueglio, Noel Milpied, Patricia Herry, Françoise Bonneville, MaryLuce Chesneau, Nicolas Schleinitz, Anne Cesbron, Gilles Folléa, Jean-Luc Harousseau and Jean-Denis Bignon.

HLA 2002 – Immunology of the Human MHC vol 1 – IHWG Press (XIII Workshop HLA Seattle). In press. 2005.

1.1. Introduction

L'implication des cellules NK dans la greffe de CSH a tout d'abord été démontrée chez la souris dans les années 90 (Bennett 1987 ; Zeis 1994). Ces résultats ont ensuite été confirmés chez l'homme avec la démonstration de la présence de clones alloréactifs d'origine du donneur chez le receveur après une greffe allogénique de CSH (Ruggeri et al. 1999). Les récepteurs KIR inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK ont plus particulièrement été étudiés du fait de leurs interactions connues avec les molécules HLA de classe I ligands, molécules d'histocompatibilité, impliquées dans les réactions immunologiques en greffe allogénique de CSH. Ces interactions récepteur KIR-ligand HLA sont en effet à l'origine de l'alloréactivité NK. L'absence au niveau d'une cellule cible du ligand HLA correspondant au récepteur KIR exprimé à la surface des cellules NK, induit la lyse de la cellule par absence d'inhibition du signal. Ainsi, en situation allogénique, des clones NK alloréactifs originaires du donneur ont été retrouvés chez le receveur, dans des greffes de CSH haploidentiques, incompatibles au niveau des ligands HLA-Cw du groupe 1 ou 2 des récepteurs KIR. Ces clones étaient responsables de l'effet GvL post-greffe de CSH (Ruggeri 2002), rôle habituellement attribué aux lymphocytes T. Ces clones étaient fonctionnellement impliqués dans l'absence de GvHD.

Dans ce contexte, au laboratoire, Gagne et al se sont intéressés aux gènes KIR activateurs et inhibiteurs et à l'importance des incompatibilités présentes au niveau des génotypes KIR du receveur et du donneur en greffe allogénique de CSH (Gagne 2002). Les résultats ont permis d'établir une corrélation entre l'incidence de GvHD aigue et la combinaison « présence de gènes KIR chez le donneur, non retrouvés chez le receveur ». Ces incompatibilités donneur/receveur dans le sens GvH portaient plus spécifiquement sur les gènes KIR activateurs et en particulier le gène KIR2DS3. Ainsi, dans cette étude, nous nous

sommes particulièrement intéressés au gène activateur KIR2DS3 et à son expression au niveau transcriptionnel, en élargissant la cohorte de patients incluse dans la première étude.

1.2. Résultats

Cette étude du polymorphisme des gènes KIR chez des couples donneur/receveur de CSH a révélé que les 5 gènes KIR inhibiteurs KIR2DL1, -2DL4, -3DL1, -3DL2 et -3DL3 étaient systématiquement présents chez le receveur et le donneur. Une grande variabilité dans le nombre et la nature des gènes KIR, en particulier pour les gènes KIR activateurs a été observée avec l'obtention de 91 génotypes différents à partir des 214 échantillons. Ces génotypes ont été retrouvés à des fréquences variant de 1 à 7%, constitués par un nombre de gènes présents variant de 6 à 15.

En fonction du génotype KIR du donneur et du receveur pour chaque couple étudié, 4 combinaisons différentes ont été définies :

- 1) le génotype KIR du donneur est inclus dans celui du receveur (le receveur possède des gènes KIR en plus, absents chez le donneur correspondant)
- 2) le génotype KIR du receveur est inclus dans celui du donneur (le donneur a des gènes KIR en plus par rapport au receveur)
- 3) les génotypes KIR du receveur et du donneur sont différents (des gènes KIR ne sont présents que chez le receveur ou que chez le donneur)
- 4) les génotypes KIR du receveur et du donneur sont identiques

Une corrélation significative ($p < 0.05$) entre le second groupe « génotype KIR du receveur inclus dans celui du donneur » et la survenue d'une GvHD aiguë de grade II à IV a été démontrée dans les greffes de CSH non-apparentées avec 88% de GvHD (14/16 couples) comparé à 57% dans l'ensemble des 3 autres combinaisons génotypiques. A l'inverse, aucune

GvHDa n'a été observée chez les couples apparentés HLA identiques présentant cette même combinaison à risque.

Dans les greffes de CSH non-apparentées qui ont développées une GvHD et où le génotype KIR du receveur est inclus dans celui du donneur, un nombre d'incompatibilités KIR beaucoup plus important a été retrouvé au niveau des gènes activateurs par rapport aux gènes KIR inhibiteurs, en particulier pour le gène KIR2DS3 (74% des paires non-apparentées).

Ainsi, l'analyse qualitative des transcrits des gènes KIR2DS3 a été effectuée sur 23 couples non-apparentés et 18 couples apparentés par RT-PCR. Cette étude a permis de montrer que l'expression du gène KIR2DS3 était faiblement régulée au niveau transcriptionnel puisque le transcrit correspondant au gène KIR2DS3 était systématiquement retrouvé.

1.3. Conclusion - Discussion

Dans l'étude sur l'alloréactivité des cellules NK en greffe allogénique de CSH, ce travail s'est plus particulièrement focalisé sur les gènes des récepteurs KIR et leur identité chez les couples donneur/receveur apparentés ou non apparentés en greffe de CSH. Dans les greffes non apparentées, la combinaison « génotype KIR du receveur inclus dans celui du donneur » a été trouvée à risque en terme de GvH aigue comparée aux 3 autres combinaisons décrites. De nombreux paramètres doivent être pris en compte dans l'interprétation de ces résultats.

Premièrement, une étude a montré l'implication d'une incompatibilité au niveau du locus HLA-DP entre donneur et receveur identiques au niveau des loci HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, sur le risque de réactions alloimmunes, avec une augmentation significative du risque de GvHD, comparé aux greffes HLA-DP identiques. Le risque était augmenté lorsque

l'incompatibilité portait sur les deux allèles HLA-DP (Petersdorf 2001). L'inclusion du locus HLA-DP dans notre analyse de résultats n'a pas montré de corrélation significative avec la GvHDa.

Deuxièmement, l'association d'incompatibilités au niveau des loci HLA-DR/DQ avec des incompatibilités au niveau du locus HLA-Cw induit une forte réactivité T cytotoxique (van der Meer et al. 2001). De plus, des incompatibilités au niveau des loci HLA-Cw impliquant les épitopes KIR sont susceptibles d'induire une alloréactivité NK. Aucun des couples appartenant au groupe à risque ne possédait de telles incompatibilités. D'autre part, seuls les gènes des récepteurs KIR ont été pris en compte dans cette étude, alors que l'alloréactivité des cellules NK nécessite l'analyse à la fois des récepteurs KIR et des ligands HLA et de leurs interactions.

Enfin, les incompatibilités au niveau des antigènes mineurs en particulier HA-1, sont également impliquées dans l'incidence de GvH aigue par cytotoxicité des lymphocytes T (Gallardo 2001).

De plus, les récepteurs KIR sont caractérisés par une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle qui ne permet pas de savoir si un gène présent au niveau génomique est exprimé à la surface de la cellule et si la fonctionnalité des cellules NK en cause peut lui être attribuée. C'est pourquoi une analyse qualitative du récepteur KIR2DS3 au niveau transcriptionnel a été réalisée puisque le gène activateur KIR2DS3 a été retrouvé plus fréquemment présent chez le donneur et absent chez le receveur dans ce groupe à risque. L'analyse qualitative par RT-PCR a révélé une très faible régulation transcriptionnelle au niveau de ce gène KIR2DS3 puisque le gène présent était systématiquement transcrit. L'étude d'une cohorte plus importante de greffes de CSH n'a pas permis de confirmer le rôle potentiel

de ce gène KIR activateur, puisqu'aucune association significative avec le risque de GvHDa n'a été retrouvée.

Cette étude suggère néanmoins une importance considérable des gènes KIR activateurs en greffe de CSH, plus souvent retrouvés discordants entre le donneur et le receveur que les gènes KIR inhibiteurs. Traditionnellement, les récepteurs KIR activateurs ont plus souvent été impliqués dans un rôle de défense active de l'hôte contre les organismes infectieux (Andre et al. 1999 ; Gomez-Lozano et al. 2002), à la différence des récepteurs inhibiteurs plus souvent impliqués dans la régulation immunitaire. Cependant, récemment, Cook et al (Cook 2004) ont montré l'implication du gène KIR2DS2 activateur présent chez le donneur alors que le ligand correspondant à son homologue inhibiteur KIR2DL2 était absent chez le receveur, sur la survie de patients atteints de LMC et ayant reçus une greffe allogénique de CSH HLA-identique.

Les ligands des récepteurs KIR activateurs ne sont cependant actuellement pas connus. De plus, il existe très peu d'anticorps reconnaissant spécifiquement les récepteurs activateurs. Ainsi, l'étude des récepteurs KIR activateurs reste encore actuellement difficile.

L'analyse de cette étude sur les gènes KIR et les incompatibilités entre les génotypes KIR du donneur et du receveur en greffe de CSH nécessite d'être complétée d'une part par l'analyse des ligands HLA correspondants présents chez le donneur et le receveur et d'autre part par l'analyse de l'expression de ces gènes KIR à la surface des cellules, après régulation transcriptionnelle et traductionnelle. De plus, la diversité de ces gènes KIR devrait être évaluée, au niveau allélique, compte tenu du polymorphisme décrit à ce jour et dont l'étendue reste encore à préciser.

A la suite de ces résultats, cette analyse a récemment été élargie à une cohorte de greffes plus importante, réalisée dans le cadre d'une collaboration nationale (étude FRM), dont les résultats en cours d'étude, confirment l'implication des gènes KIR dans la prise de

greffe et la GvHD et en particulier le rôle de certaines incompatibilités au niveau des gènes KIR activateurs.

2 PUBLICATION N°2 : DIVERSITÉ ÉTHNIQUE DES GÈNES KIR

La diversité des gènes KIR, marqueurs des cellules Natural Killer, dans les populations Françaises Métropolitaine et Guadeloupéenne, Finlandaise, Senegalaise et Réunionaise.

“Genetic diversity of KIR Natural Killer cell markers in populations from France, Guadeloupe, Finland, Senegal and Reunion.”

Laure Denis, Jyrki Sivula, Pierre-Antoine Gourraud, Nolwenn Kerdudou, Roger Chout, Corinne Ricard, Jean-Paul Moisan, Katia Gagne, Jukka Partanen and Jean-Denis Bignon.

Tissue Antigens, 2005 oct; 66 (4):267-76

2.1. Introduction

Les études sur les récepteurs KIR, marqueurs des cellules NK et/ou de leurs ligands dans les greffes de CSH se multiplient actuellement dans le but de découvrir un « modèle parfait » d'incompatibilité HLA pouvant créer une alloréactivité NK par le biais des récepteurs KIR, entre le donneur apparenté ou non-apparenté et le receveur (Gagne 2002 ; Ruggeri 2002). En parallèle, les récentes analyses de polymorphisme génétique des récepteurs KIR dans les différentes populations doivent être étendues dans le but d'approfondir les connaissances actuelles concernant ces marqueurs génétiques récemment découverts, en terme de fréquences de gènes, génotypes, haplotypes et d'éventuels déséquilibres de liaison existants. Conjuguées, ces différentes études devraient permettre à terme une meilleure sélection génétique (HLA + KIR) des donneurs fichiers, à un niveau international et ainsi une amélioration du taux de survie des receveurs greffés.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail ont consisté à étudier les récepteurs KIR dans 5 populations géographiquement différentes, sélectionnées en fonction des disparités génétiques attendues : la population Sénégalaise représentant une population d'Afrique de l'Ouest, les populations Caucasoïdes Française et Finlandaise, la population Guadeloupéenne constituée de populations mixtes des Caraïbes et enfin la population mixte Réunionnaise originaire de l'Océan Indien, représentant à ce titre des populations reflétant des courants migratoires complexes et différents. Ce travail s'est donc attaché à déterminer les fréquences des gènes, génotypes et haplotypes KIR pour chaque population, les comparer entre elles et avec les données de la littérature. L'analyse des distances génétiques a permis, à partir de lois statistiques validées antérieurement sur le modèle HLA, de vérifier nos résultats, en considérant l'histoire du peuplement de ces régions.

2.2. Résultats

Les fréquences des gènes KIR ont été analysées et ont permis de confirmer les données de la littérature sur la présence ubiquitaire des gènes inhibiteurs KIR2DL4, KIR3DL2 et KIR3DL3 dans les 5 populations ainsi que sur les fréquences plus élevées et plus homogènes des gènes KIR inhibiteurs par rapport aux gènes KIR activateurs. Cependant, les fréquences variaient en fonction de la population testée et en particulier pour la population Sénégalaise révélant une forte diversité.

Au total, 57 profils de génotype différents ont été identifiés dans l'ensemble des 5 populations. Les pourcentages de génotypes différents étaient supérieurs dans les populations Guadeloupéenne et Réunionnaises ainsi caractérisées par une forte diversité. La population Sénégalaise était quant à elle définie par une forte spécificité génotypique puisque 17% des Sénégalais possédait un génotype non retrouvé dans les quatre autres populations (comparé à 11%, 7%, 5% et 3% dans les populations Guadeloupéenne, Réunionnaises, Finlandaise et Française respectivement).

L'analyse des haplotypes a montré de fortes fréquences du génotype AA et en particulier dans la population Sénégalaise dans laquelle le génotype BB était absent. Ainsi, l'haplotype A, caractérisé par la présence du seul gène KIR2DS4 (ou 1D) comme gène activateur est très fortement représenté dans la population Sénégalaise (72%). D'autre part, les fréquences des allèles KIR2DS4 exprimés et KIR2DS4*003 (KIR1D) non exprimé ont été déterminées, et ont mis en évidence une inversion du ratio KIR1D/KIR2DS4, retrouvé inférieur à 1 dans la population Africaine par rapport aux populations Caucasoïdes.

La population Sénégalaise est donc caractérisée par une faible représentation de gènes KIR activateurs. Cependant, le gène KIR2DS4, seul gène activateur présent sur l'haplotype A, est très majoritairement représenté sous sa forme exprimée à la surface des cellules.

La faible représentation des gènes KIR activateurs a également été confirmée par l'étude du nombre moyen de gènes KIR activateurs, sur un maximum de 6, par génotype, retrouvé significativement inférieur dans la population Sénégalaise (2,16) par rapport aux autres populations (2,84 à 3,07).

Enfin, les distances génétiques ont été estimées à partir des fréquences génotypiques et à l'aide du logiciel Phylip, définissant plusieurs groupes distincts. Schématiquement, les populations Caucasoïdes représentaient un premier groupe, le Sénégal un second et enfin la Réunion et la Guadeloupe un troisième groupe situé à mi chemin des deux premiers.

L'analyse du dendrogramme a permis de caractériser la population Sénégalaise la plus éloignée des 4 autres et au contraire les populations Française métropolitaine et Finlandaise les plus proches génétiquement.

2.3. Discussion – Conclusion

Cette étude a permis de révéler l'existence d'une grande diversité inter-ethnique au niveau des fréquences des gènes, génotypes et haplotypes KIR. Les 5 populations testées étaient d'origine géographique très variée, provenant d'Afrique (Senegal), des Caraïbes (Guadeloupe), de l'Océan Indien (Réunion) ou d'Europe (France et Finlande). Les gènes KIR activateurs apparaissent comme les marqueurs d'hétérogénéité les plus intéressants. En effet, dans notre analyse, ils sont très peu représentés dans la population Africaine (Sénégalaise) par rapport aux populations Caucasoïdes. Ces gènes KIR activateurs pourraient être considérés comme des marqueurs d'une pression de sélection naturelle. Notre intérêt s'est tout particulièrement porté sur le gène KIR2DS4 qui possède des formes alléliques exprimées KIR2DS4 (KIR2DS4*001,*002, *004) et une forme allélique non exprimée KIR1D (KIR2DS4*003) et dont la présence en tant que seul représentant des gènes KIR activateurs

est caractéristique de l'haplotype A. Dans la population Caucasoïde, la forme KIR1D est majoritairement représentée. A l'inverse, la forme exprimée KIR2DS4 est majoritaire dans la population Sénégalaise, en accord avec une étude publiée concernant une population africaine de Trinidad (Norman 2002). Les fréquences de ces deux formes dans les populations Guadeloupéenne et Réunionnaise sont identiques, suggérant une mixité génétique entre les populations Caucasoïdes et les populations Africaines. Ces résultats ont également été observés dans les populations Japonaise et Coréenne dans lesquelles l'haplotype A était largement prédominant et caractérisé par la forme exprimée du gène KIR2DS4 en tant qu'unique gène KIR activateur (Whang 2005; Yawata et al. 2002).

Ces résultats évoquent l'hypothèse d'une sélection privilégiée de la forme KIR2DS4 exprimée, dans le but de compenser une forte fréquence de l'haplotype A et donc du seul gène KIR2DS4 activateur, excepté le gène KIR2DL4 caractérisé par une fonction et une structure à la fois activatrice et inhibitrice. Ces données renforcent le rôle des cellules NK dans l'immunité innée. L'analyse des génotypes KIR a permis d'estimer les distances génétiques entre les 5 populations étudiées et de définir 3 groupes : la France et la Finlande d'une part, la Réunion et la Guadeloupe d'autre part et enfin le Sénégal. Ainsi, le Sénégal était le plus éloigné des autres pays, alors que La Réunion et la Guadeloupe étaient relativement proches de la France, situés entre la France et le Sénégal. Ces résultats sont ainsi en concordance avec la situation géographique des différents pays étudiés et avec les différents courants migratoires qui ont eu lieu au cours de l'histoire de ces peuples.

Cette étude, combinée avec les données récemment publiées dans la littérature scientifique (Canavez 2001 ; Jiang et al. 2005 ; Niokou 2003 ; Norman 2002 ; Norman 2001 ; Rajalingam 2002 ; Whang 2005; Yawata et al. 2002), permet de caractériser les gènes KIR comme de bons marqueurs génétiques de population, à l'image de leurs ligands spécifiques, les molécules HLA. Cependant, ces études ne font pas état d'un polymorphisme étudié au

niveau allélique. Les premiers résultats sommaires laissent présager un fort polymorphisme allélique des gènes KIR, s'ajoutant à une diversité dans la distribution des gènes KIR au niveau haplotypique. Il est ainsi illusoire de sélectionner des couples donneur / receveur HLA et KIR identiques. A l'inverse, la recherche d'une alloréactivité bénéfique devra prendre en compte la diversité des gènes KIR au niveau allélique dans un environnement HLA identique ou non.

**3 PUBLICATION N°3 : RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE
DES GÈNES KIR EN GREFFE DE CELLULES SOUCHES
HÉMATOPOIÉTIQUES**

**Cinétiques des transcrits des gènes KIR corrèlent avec l'incidence de la
GvHD aigue post-greffe de cellules souches hématopoïétiques.**

**“NK-KIR transcript kinetics correlate with acute Graft-versus-Host-Disease occurrence
following Allogeneic Bone Marrow Transplantation”**

Laure Denis, Katia Gagne, Brigitte Gueglio, Nolwenn Kerdudou, Noel Milpied, Philippe
Simon, Gilles Follea, Marc Bonneville, Jean-Luc Harousseau and Jean-Denis Bignon.

Human Immunology 66, 447-459 (2005).

3.1. Introduction

L'expression des gènes KIR au niveau des cellules NK apparaît pendant le développement des cellules NK, mais le mécanisme exact qui contrôle sa diversification n'est actuellement pas connue (Shilling 2003). Les profils d'expression des gènes KIR sur les cellules NK sont déterminés à un niveau transcriptionnel, avec la contribution d'éléments régulateurs du promoteur s'associant à différents facteurs de transcription et différents degrés de déméthylation du promoteur (Chan et al. 2003; Chan HW 2003 ; Santourlidis 2002). En effet, la méthylation cytosinique de dinucléotides CpG représente une modification épigénétique fréquente associée dans la plupart des cas à une répression de la transcription comme l'a démontré Santourlidis et al. au niveau de la région de transcription de gènes KIR par les cellules NK. D'autre part, les récepteurs KIR sont également exprimés par un faible pool de lymphocytes T incluant les T $\gamma\delta$, les T CD4+ et T CD8+ possédant un phénotype mémoire (Gumperz 1995 ; Mingari 1995). L'expression au niveau des lymphocytes T semble avoir lieu à un stade de développement beaucoup plus tardif par rapport aux cellules NK.

Les répertoires KIR, très similaires au niveau des lymphocytes T et NK chez un même individu confirment l'hypothèse d'une détermination du répertoire d'expression KIR ne faisant que très peu intervenir l'environnement (en particulier le contexte HLA) dans lequel se développent les cellules NK. Néanmoins ces données restent à confirmer dans des modèles in vitro mieux définis quant à la nature et à la spécificité des récepteurs et de leurs ligands.

Ainsi, afin de poursuivre l'étude fonctionnelle des gènes KIR et de leur polymorphisme en greffe de CSH, réalisée précédemment, nous nous sommes intéressés à leurs transcription et à leur expression lors de la reconstitution hématopoiétique post-greffe de CSH.

3.2. Résultats

1- La cinétique de reconstitution hématopoïétique post-greffe allogénique de CSH :

Comme décrit dans la littérature, la population de cellules NK prédominait lors de la phase précoce de reconstitution hématopoïétique post-greffes allogéniques de CSH chez ces 29 receveurs, jusqu'à représenter 43% des cellules à J28 alors que la population de cellules T CD8⁺ représentait 32%. La reconstitution cellulaire était plus rapide chez les patients ayant reçu un conditionnement non myéloablatif par rapport aux patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif, et supérieure, avec une différence d'environ 10% durant toute la période étudiée. D'autre part, le ratio CD4/CD8 normalement supérieur à 1 était inversé en reconstitution hématopoïétique post-greffe de CSH, avec une reconstitution en lymphocytes T CD4⁺ plus tardive.

2- Analyse quantitative des transcrits :

Les taux de transcrits KIR (r1) ont montré une variation importante d'un individu à l'autre et en fonction du récepteur KIR considéré. Trois groupes de patients ont pu être définis en fonction du profil de transcription pendant la reconstitution du répertoire KIR en post-greffe. Les groupes I (n=9) et III (n=10) étaient caractérisés par l'absence ou l'apparition tardive de pic de transcrits KIR et corrélaient avec un risque élevé de GvHDa. A l'inverse, chez les patients du groupe II (n=10), la présence d'un pic élevé et précoce de transcrits KIR corrélait avec l'absence de GvHDa (p=0,025). De plus, les quantités de transcrits KIR (r1), rapportées au nombre de cellules NK (r2) étaient supérieures pour les patients du groupe II tout au long de la reconstitution et particulièrement au moment du pic de transcrits. Au total,

la cinétique de transcription KIR corrélait étroitement avec le risque de survenue de GvHD aiguë.

3.3. Conclusion – Discussion

L'analyse quantitative des transcrits KIR a montré, contrairement à une récente étude publiée en 2005 (Leung 2005) que chaque gène testé, présent au niveau génomique, est transcrit, en quantité plus ou moins importante. Le répertoire de transcrits KIR observé chez le receveur correspond au génotype du donneur et confirme ainsi une précédente étude réalisée sur une période de 1 an post-greffe au niveau phénotypique (Shilling 2003).

L'hétérogénéité des taux de transcrits observés en fonction de l'individu et du gène KIR considéré peut s'expliquer par des facteurs génétiques tels que le génotype KIR avec les différentes formes alléliques représentées pour chaque locus KIR et le nombre de copies du gène (hétérozygotie ou homozygotie), la structure du promoteur et des facteurs épigénétiques tels que le phénomène de méthylation des îlots CpG, responsable d'une répression de la transcription. Dans cette étude, aucune corrélation n'a été établie entre la spécificité de gènes KIR considérés, activateurs ou inhibiteurs, et le taux de transcrits.

Le groupe II de patients dont le profil de transcription était caractérisé par un pic précoce de transcrits protecteur d'une réaction de GvHDa, n'était pas associé significativement à l'âge, la pathologie, le typage HLA par rapport aux groupes I + III. Sur les 5 patients ayant reçu un traitement myéloablatif dans le groupe II, seul un a développé une GvHDa. Ainsi, la protection contre la GvHD observée dans ce groupe II n'était pas associée au conditionnement reçu (myéloablatif ou non).

Ainsi, la cinétique de transcription des gènes KIR représente un facteur à prendre en compte pour le risque de GvHDa pendant le premier mois de la reconstitution

hématopoïétique post-greffe de CSH. Cependant, comme nous l'avons évoqué précédemment, la présence des transcrits n'induit pas systématiquement celle du récepteur à la surface des cellules et ne permet pas d'envisager le taux d'expression du récepteur, ce taux d'expression à la surface des cellules pouvant avoir une influence plus ou moins importante sur l'implication du récepteur dans les événements post-greffe de CSH. De plus, l'étude des transcrits par technique RT-PCR reste de réalisation délicate du fait de la nécessité d'obtention de molécules ARN de faible stabilité. L'étude des récepteurs KIR au niveau protéique paraît ainsi indispensable pour compléter et confirmer les résultats de cette étude.

D'autre part, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au récepteur KIR2DL4 pour les trois raisons suivantes :

Premièrement, le récepteur KIR2DL4 est un récepteur KIR particulier puisqu'il est défini par des structures et des fonctions à la fois activatrices et inhibitrices. Deuxièmement, contrairement à la majorité des autres récepteurs exprimés de façon clonale à la surface des cellules NK, le récepteur KIR2DL4 serait exprimé sur toutes les cellules NK. Il est de fait toujours noté au niveau transcriptionnel (Goodridge 2003; Rajagopalan 1999), comme le confirme également notre étude. Enfin, le ligand spécifique du récepteur KIR2DL4 est représenté par la molécule HLA-G de classe I non classique (Rajagopalan 1999), molécule d'immunotolérance impliquée dans la tolérance des greffes de cœur (Lila 2000) et fortement exprimée lors de la grossesse au niveau des trophoblastes fœtaux (Rajagopalan 1999).

Ainsi, nous avons réalisé une étude collaborative avec le CEA St-Louis afin de quantifier les transcrits HLA-G par RT-PCR quantitative (technologie Taqman) chez ces mêmes couples D/R pour lesquels les quantités de transcrits KIR2DL4 étaient disponibles. Les résultats n'ont pas permis d'établir une corrélation entre les quantités de transcrits HLA-G, KIR2DL4 et les événements de GvHDa post-greffes allogéniques de CSH. Nous avons donc poursuivi l'analyse en collaboration avec le service d'hématologie du CHU de Rennes qui a effectué le

dosage sérique de la protéine soluble HLA-G par technique ELISA. Les résultats ont montré que les quantités de protéines solubles HLA-G sériques étaient supérieures chez les patients n'ayant pas développé de GvHDa, comparé aux patients ayant développé une GvHDa, suggérant un effet de tolérance de la molécule HLA-G. Ces résultats préliminaires nécessitent cependant d'être confirmés par une étude prospective sur une période post-greffe de CSH définie (étude en cours).

4 ETUDE 4 : EXPRESSION DES GÈNES KIR

Régulation du répertoire phénotypique au cours du temps.

Application dans un modèle d'alloréactivité NK in vitro.

4.1. Introduction

Les récepteurs KIR sont impliqués dans le devenir de la greffe de CSH. Nous avons montré dans la première partie de ce travail que des incompatibilités au niveau des gènes KIR entre le donneur et le receveur, corrélaient avec la survenue de GvHDa en post-greffe de CSH non apparentées. Cependant, les gènes KIR régulés au niveau transcriptionnel pendant la reconstitution post-greffe, s'expriment avec une cinétique variable et de fortes variations en fonction du receveur et du récepteur KIR considéré. La cinétique de transcription caractérisée par un pic de transcrits observé précocément en reconstitution post-greffe de CSH semble corréler étroitement avec un effet protecteur contre la GvHDa (Publication 3).

D'autre part, une étude récente a permis de montrer l'existence, pendant les 4 premiers mois après la greffe, de clones NK alloréactifs provenant du donneur, capables de lyser les cellules leucémiques (effet GvL) chez le receveur atteint de LAM, sans destruction des tissus sains (pas d'effet GvH) chez ce même receveur (Ruggeri 2002; Ruggeri et al. 1999). Cette alloréactivité « médiée » par les cellules NK vis à vis des cellules leucémiques du receveur est actuellement étudiée par de nombreuses équipes. La présence de tels clones NK a également été retrouvée chez des individus sains (Grau et al. 2004). Les auteurs ont ainsi mis en lumière la complexité des mécanismes de régulation existants et dépendants des très divers récepteurs exprimés à la surface des cellules NK avec notamment le récepteur inhibiteur CD94 :NKG2A, capable de réprimer des clones potentiellement autoréactifs.

De plus, les récepteurs KIR sont caractérisés non seulement par une régulation transcriptionnelle mais également post-transcriptionnelle (Dolstra 2001). Ainsi, l'expression d'un gène KIR est variable voire inexistante d'un individu à l'autre et d'un clone cellulaire à l'autre chez un même individu. Elle dépend également de la forme allélique considérée.

Dans ce contexte, les objectifs de cette quatrième partie dans l'étude des récepteurs KIR en greffe de CSH ont été de développer un modèle d'alloréactivité NK in vitro, mimant le modèle in vivo de greffe de CSH, en s'intéressant plus particulièrement et dans un premier temps aux récepteurs KIR exprimés et à leurs ligands, les molécules HLA. Nous nous sommes intéressés plus précisément aux récepteurs KIR2DL1/2DS1 dont les ligands connus sont représentés par les molécules HLA du groupe C2, aux récepteurs KIR2DL2/2DL3/2DS2 dont les ligands connus sont les molécules HLA du groupe C1 et enfin au récepteur KIR3DL1 dont les ligands connus sont représentés par les molécules HLA-Bw4. Le protocole a consisté dans un premier temps à obtenir une amplification limitée aux seules cellules NK, dans un contexte « génotype KIR du donneur et génotype HLA cible » déterminé, en limitant l'influence des facteurs extérieurs susceptibles d'interférer sur l'expression des récepteurs KIR. Ce modèle d'amplification confrontait les lymphocytes totaux du sang périphérique (PBMC) d'un donneur sain de génotypes HLA et KIR connus avec une lignée de cellules lymphoblastiques B (B-LCL) allogénique de génotype HLA déterminé. A partir de ce modèle, nous avons étudié l'influence du milieu de culture et de la lignée B sélectionnée, sur l'amplification des cellules NK d'une part et sur la sélection du répertoire en récepteurs KIR à la surface des cellules NK d'autre part. Nous avons ensuite étudié ces cellules NK amplifiées d'un point de vue fonctionnel, en évaluant leur cytotoxicité naturelle.

4.2. Matériels et methodes

4.2.1. Matériels

Au total, les PBMC provenant de 21 donneurs sains de CSH ont été analysés (Tableau 3):

- 5 donneurs ont permis la comparaison de deux milieux de culture Cellgro (Cellgenix, Montpellier) et HP01 (Macopharma, Tourcoing) sur l'amplification spécifique des cellules NK
- 10 donneurs ont permis de valider le protocole d'amplification NK à partir d'une première lignée B allogénique : la BLCL-1.
5 donneurs parmi les 10 précédents, ont permis la comparaison entre les BLCL 1 et 2 de génotypes HLA différents.
- 5 donneurs supplémentaires ont permis la comparaison des BLCL 1 et 3.

Donneur	B-LCL			Etude
	1	2	3	
D1, D2, D3, D4, D5	x			Comparaison milieux Cellgro et HP01.
D6, D7, D8, D9, D10, D11, D12, D13, D14, D15	x			Etude de la prolifération NK et du répertoire KIR phénotypique. Test cytotoxicité.
D12, D13, D14, D15, D16	x	x		Prolifération NK et répertoire KIR : comparaison B-LCL. Test cytotoxicité.
D17, D18, D19, D20, D21	x		x	Prolifération NK et répertoire KIR : comparaison B-LCL. Test cytotoxicité.

Tableau 3 Effectif étudié (D1 à D21)

4.2.2. Méthodes

4.2.2.1. Obtention des lignées lymphoblastiques B-LCL

Des cellules de lymphoblastes en culture avec du sérum de veau fœtal ont été incubées en présence du surnageant de culture d'une lignée de singe Marmoset, la lignée B95-8, infectée par l'EBV. L'addition de cyclosporine A (1 µg/ ml) permettait d'éliminer les lymphocytes T.

Trois BLCL allogéniques ont été utilisées, sélectionnées en fonction de leur génotype HLA en terme de ligands des récepteurs KIR : HLA-C1, HLA-C2 et HLA-Bw4. (Tableau 4).

BLCL	Ligands HLA	
	HLA-Cw	HLA-B
1	C1 + C2 -	Bw4 - Bw6 +
2	C1 + C2 -	Bw4 + Bw6 +
3	C1 - C2 +	Bw4 + Bw6 -

Tableau 4 Ligands HLA des récepteurs KIR2DL1, -2DL2/2DL3 et -3DL1 exprimés à la surface des 3 lignées B-LCL utilisées.

4.2.2.2. *Protocole de prolifération des cellules CD3⁻CD56⁺*

Les lymphocytes du sang périphérique (PBL) ont été récupérés à partir de prélèvements de sang périphérique (PBMC) à l'aide d'un protocole standard par gradient de densité sur milieu de séparation des lymphocytes (MSL, Eurobio, Les Ulis, France). Dix millions des lymphocytes isolés étaient ensuite mis en culture en présence de 1 million de B-LCL irradiées à 35 gray, dans un milieu de culture (Cellgro ou HP01) comprenant 8% de sérum humain et 150 UI/ml d'IL2 recombinante (Chiron), puis répartis en 5 puits de 2 ml sur une plaque de 24 puits.

Après 6 jours, le surnageant était retiré de chaque puits et les cellules étaient récupérées en flasque puis entretenues régulièrement tous les 2 ou 3 jours avec le milieu complet précédemment décrit.

4.2.2.3. *Marquage phénotypique en cytométrie en flux*

Le marquage phénotypique a été réalisé par cytométrie de flux (Facsalibur, Becton Dickinson) à J0, J6 puis régulièrement tout au long de la culture. Le marquage des différentes populations cellulaires en culture comprenait le triple marquage direct ou indirect CD3PerCP/CD56PE/CD16FITC (Becton Dickinson), le double marquage CD45PerCP/CD14PE ainsi que les marquages tritest suivants : CD3FITC/CD45PerCP/CD4PE, CD3FITC/CD45PerCP/CD8PE, CD3FITC/CD45PerCP/CD19PE (Trucount).

Le marquage des récepteurs CD158a (KIR2DL1 et -KIR2DS1), CD158b (KIR2DL2, KIR2DL3 et KIR2DS2) et p70 (KIR3DL1) exprimés à la surface des cellules CD3⁻CD56⁺ a été effectué par technique indirecte : CD3PerCP/CD56PE/CD158aFITC (Becton Coulter),

CD3PerCP/CD56PE/CD158bFITC, CD3PerCP/CD56PE/p70FITC puis directe :
CD3PerCP/CD56FITC/CD158aPE, CD3PerCP/CD56FITC/CD158bPE,
CD3PerCP/CD56FITC/p70PE, ainsi que les contrôles à l'aide des anticorps isotypiques
correspondants IgG1-PE (BC), IgG1-PerCP (BD), IgG1-FITC (BD).

4.2.2.4. *Génotypages KIR et HLA*

Les techniques de génotypage KIR et HLA sont décrites dans la première partie des résultats (publication 1).

Les résultats des génotypages KIR étudiés et leurs ligands HLA correspondants sont indiqués dans le tableau ci-dessous (Tableau 5) :

Donneurs	Génotypes HLA (Ligands)		Génotype KIR (Récepteurs)					
	Bw	Cw	2DL1	2DS1	2DL2	2DS2	2DL3	3DL1
D6	Bw4+Bw6+	C1+C2+	+	-	+	+	+	+
D7	Bw4+Bw6+	C1+C1+	+	-	+	+	+	+
D8	Bw6+Bw6+	C1+C2+	-	+	+	+	-	+
D9	Bw4+Bw6+	C1+C1+	+	-	+	+	+	+
D10	Bw4+Bw6+	C1+C1+	+	-	-	-	+	+
D11	Bw4+Bw6+	C1+C1+	+	-	+	+	+	+
D12	Bw4+Bw4+	C1+C2+	+	-	-	-	+	+
D13	Bw4+Bw6+	C1+C1+	+	+	+	+	-	-
D14		C1+C2+	+	+	-	-	+	+
D15	Bw6+Bw6+	C1+C2+	+	-	-	-	+	+
D16	Bw4+Bw6+	C1+C2+	+	+	-	-	+	+
D17	Bw4+Bw6+	C2+C2+	+	+	+	+	-	+
D18	Bw4+Bw4+	C1+C1+	+	+	+	+	-	+
D19	Bw4+Bw4+	C1+C1+	+	-	-	-	+	+
D20	Bw4+Bw6+	C2+C2+	+	-	+	+	+	+
D21	Bw6+Bw6+	C1+C1+	+	-	-	-	+	+

Tableau 5 Génotypes HLA et KIR des donneurs D6 à D20, en terme de récepteurs KIR et groupes ligands HLA.

— KIR2DL1/2DS1 – Ligand HLA-C2 — KIR2DL2/2DL3/2DS2 – Ligand HLA-C1
— KIR3DL1 – Ligand HLA-Bw4

4.2.2.5. Test de cytotoxicité au chrome

Le principe du test de cytotoxicité au chrome utilisé est basé sur le relargage d'un composé radioactif (chrome 51) par des cellules cibles lésées après incubation de ces cellules cibles avec les cellules effectrices (NK) dans des rapports définis. Les cellules cibles sont

marquées au chrome 51 ($\text{Cr}_{51}\text{Na}_2\text{CrO}_4$) qui est perméable aux membranes cellulaires et se lie aux protéines cytoplasmiques sans relargage spontané important. Si les cellules cibles sont détruites par les cellules effectrices, le chrome est massivement libéré dans le milieu environnant dont la quantité est proportionnelle au nombre de cellules tuées. Ce test ne permet cependant pas de distinguer la lyse cellulaire par apoptose qui utilise la voie de Fas-FasLigand. Les cellules cibles utilisées dans notre étude appartiennent à deux lignées différentes déficientes en molécules HLA de classe I représentant pour cela de bonnes cibles pour la cytotoxicité spontanée « médiée » par les cellules NK : la lignée K562 est une lignée cellulaire de leucémie myéloïde chronique humaine et la lignée 721.221 est une lignée humaine de cellules lymphoblastiques B transformées par l'EBV.

Le protocole utilisé a été le suivant :

Dans une première étape, le marquage au chrome d'1 million de cellules cibles K562 ou 221 721 est réalisé avec 15 microlitres de ^{51}Cr à 5mci/ml. Après une heure d'incubation à 37°C, 4 lavages dans le milieu de culture sont effectués puis les cellules marquées sont comptées. Une solution à 0,06 millions de cellules par ml est alors réalisée afin de distribuer 3000 cellules cibles par puits dans 50 microlitres.

Dans une seconde étape, les solutions de cellules effectrices (NK) en culture sont réalisées à différentes concentrations déterminées en fonction des ratios (cellules NK : cellules cibles) utilisés : 30 :1, 10 :1, 3 :1 et 1 :1, afin de déposer 50 microlitres par puits.

Le volume final par puits est donc de 100 microlitres.

Les témoins négatifs (cellules cibles et milieu de culture) et positifs (cellule cibles et triton 10X) sont effectués pour chaque donneur lors de chaque manipulation.

Après une incubation de 4 heures à 37°C, 25 microlitres de surnageant sont récupérés dans une plaque de lecture. Après addition de 100 microlitres de réactif scintillant dans

chaque puits, la lecture est réalisée à l'aide d'un compteur de scintillation (MICROBETA JET 1450, Perkin Elmer). Le pourcentage de lyse est alors déterminé par la formule suivante :

$$\% \text{ lyse} = (x - m)/(M - m)$$

avec x = moyenne des valeurs en triplicat (cpm coups par minute)

m = moyenne des 6 valeurs minimales (témoin négatif) (cpm)

M = moyenne des 6 valeurs maximales (témoin positif) (cpm)

4.3. Résultats

4.3.1. Influence du milieu de culture sur l'amplification des cellules CD3⁻CD56⁺

Les PBMC provenant de 5 donneurs de moelle sains ont permis de comparer l'efficacité de 2 milieux de culture différents (Cellgro et HP01) sur la prolifération cellulaire et la prolifération de cellules CD3⁻CD56⁺ en présence de la BLCL-1, sur une période de 20 ou 21 jours.

Les résultats ont montré que la prolifération des cellules mononucléées totales en culture était régulière et le plus souvent supérieure, en présence du milieu Cellgro. Elle semble atteindre un plateau précocément (J15) chez 3 donneurs en présence du milieu HP01, comme le montre l'exemple du donneur D1 (Figure 13a).

La prolifération des cellules NK définie par le phénotype CD3⁻CD56⁺ était plus importante avec le milieu Cellgro avec plus de 50% de cellules NK à J15 comparé à 20% avec le milieu HP01 pour ce même donneur D1 (Figure 13b). Les résultats étaient similaires chez les trois premiers donneurs D1, D2 et D3. Pour les deux autres (D4 et D5), les cultures ont été

arrêtées prématurément du fait de contamination, mais présentaient ce même profil, les 10 premiers jours de culture.

Ainsi, nous avons sélectionné le milieu Cellgro pour la suite de l'étude, considérant son efficacité supérieure sur l'amplification des cellules NK.

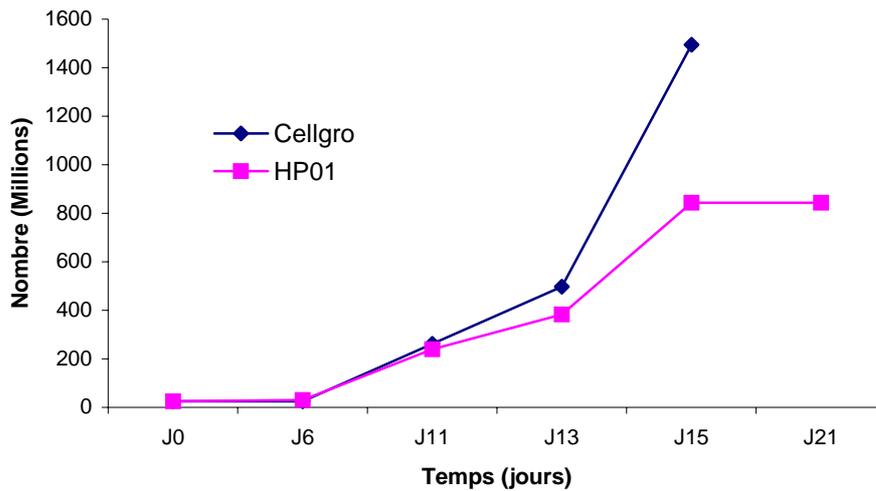


Figure 13a Evolution du nombre de cellules mononucléées pendant 21 jours de culture en milieux Cellgro et HP01 : exemple du donneur D1

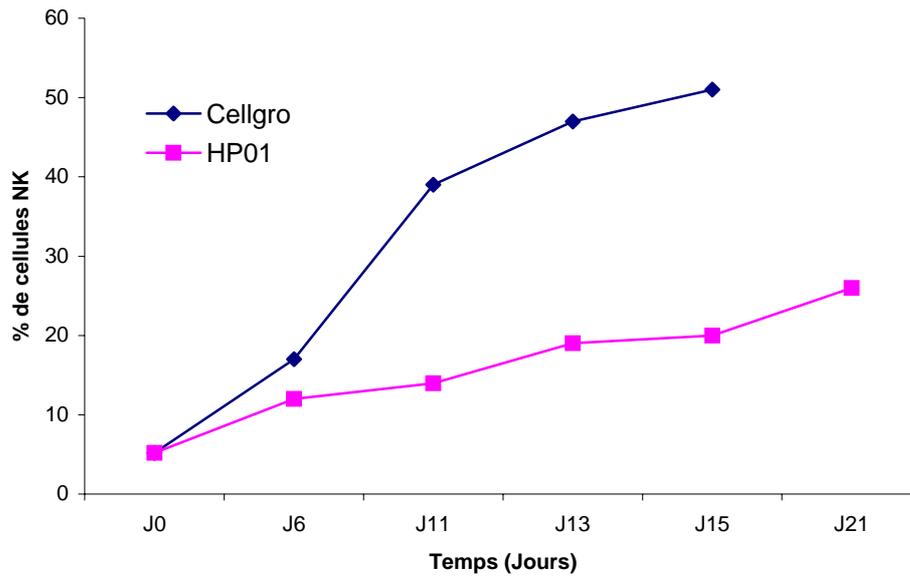


Figure 13b Evolution du pourcentage de cellules CD3⁺CD56⁺ (NK) pendant 21 jours de culture en milieux Cellgro et HP01 : exemple du donneur D1.

4.3.2. Amplification des cellules CD3⁺CD56⁺ et analyse phénotypique du répertoire KIR de ces cellules en milieu de culture Cellgro et en présence de la lignée BLCL-1.

Les PBMC provenant de 10 donneurs (D6 à D15) de CSH sains ont permis d'étudier la prolifération cellulaire en présence d'une première lignée B allogénique (BLCL-1) de génotype HLA sélectionné en terme de ligands des récepteurs KIR (C1+ C2- Bw4- et Bw6+).

4.3.2.1. Prolifération des différentes populations cellulaires

Globalement, les résultats ont montré une augmentation régulière du nombre de cellules mononucléées totales en culture, passant de 10 millions de cellules à J0 à plus de 1

milliard de cellules à J25. A partir de J25, les cellules cessaient de se multiplier, puis décroissaient jusqu'à J30 (Figure 14).

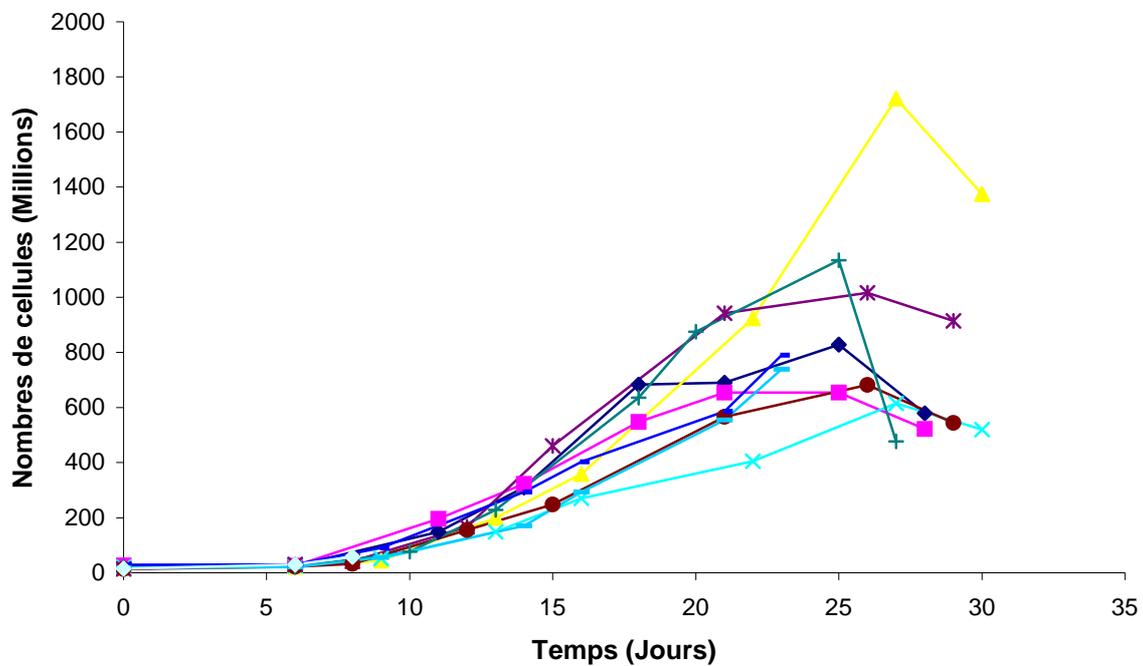


Figure 14 Evolution du nombre de cellules mononucléées pendant 30 jours de culture en milieu Cellgro et pour les 10 donneurs D6 à D15.

Parmi ces cellules mononucléées, la population de cellules NK $CD3^+CD56^+$ était spécifiquement amplifiée, représentant de 5 à 20% des PBMC à J0 puis 70% des cellules en moyenne à J15. A partir du pic de cellules NK à J15, la population diminuait ensuite progressivement jusqu'à 50% en moyenne à J30 (Figure 15).

Parmi la population $CD3^+CD56^+$, la population $CD16^+$ représentait environ 84% à J0 et 97% au pic, correspondant à un état d'activation important. Pour la suite des analyses, nous considérerons uniquement la population NK définie par le phénotype $CD3^+CD56^+$,

presqu'exclusivement caractérisée par la présence du marqueur CD16 dans notre protocole d'activation.

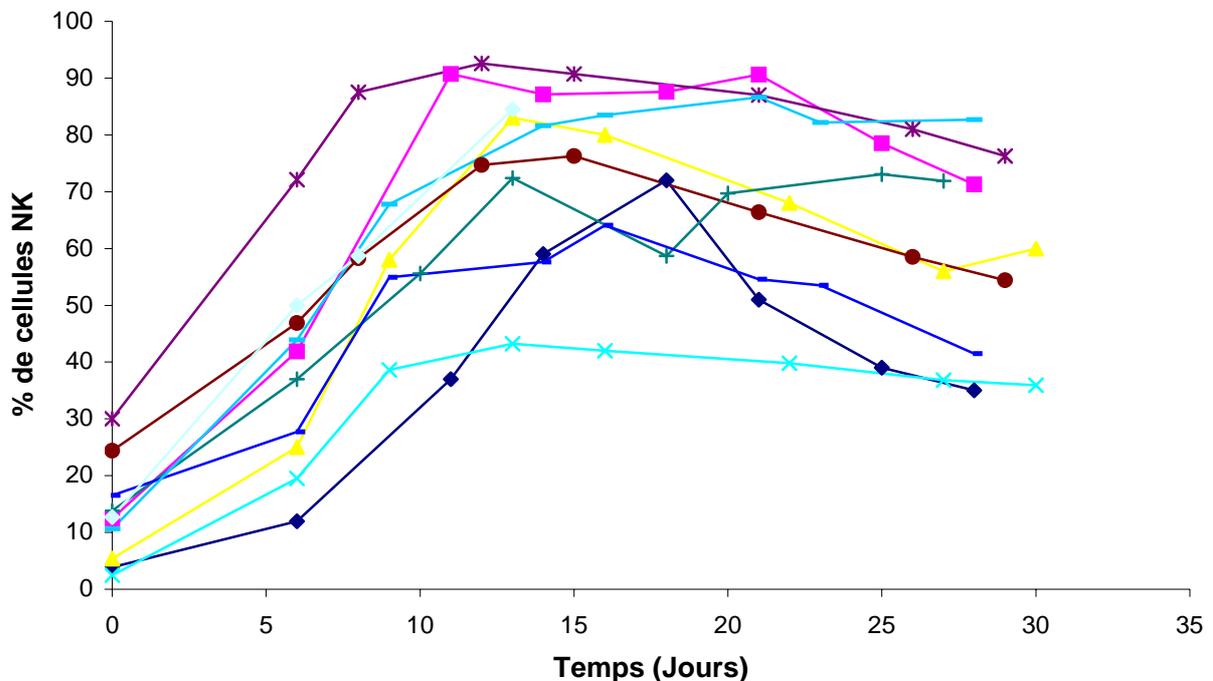


Figure 15 Evolution du pourcentage de cellules NK CD3⁺CD56⁺ pendant 30 jours de culture en milieu Cellgro, pour les 10 donneurs D6 à D15.

A l'inverse, nous avons observé une forte diminution des populations de lymphocytes T de J0 à environ J25 correspondant à la fin du plateau de cellules NK, suivie d'une légère augmentation alors que les cellules NK commençaient à diminuer. Plus précisément, la population de lymphocytes T CD4⁺, la plus représentée à J0 (presque 40% en moyenne) représentait 2% des cellules à J20 avant de réaugmenter très légèrement ensuite et atteindre 5% à J30 (Figure 16a). La population de lymphocytes T CD8⁺ représentait environ 20% des

cellules en culture à J0, diminuait à 12% en moyenne à J15 puis réaugmentait beaucoup plus fortement pour atteindre 35-40% à J30 (Figure 16b).

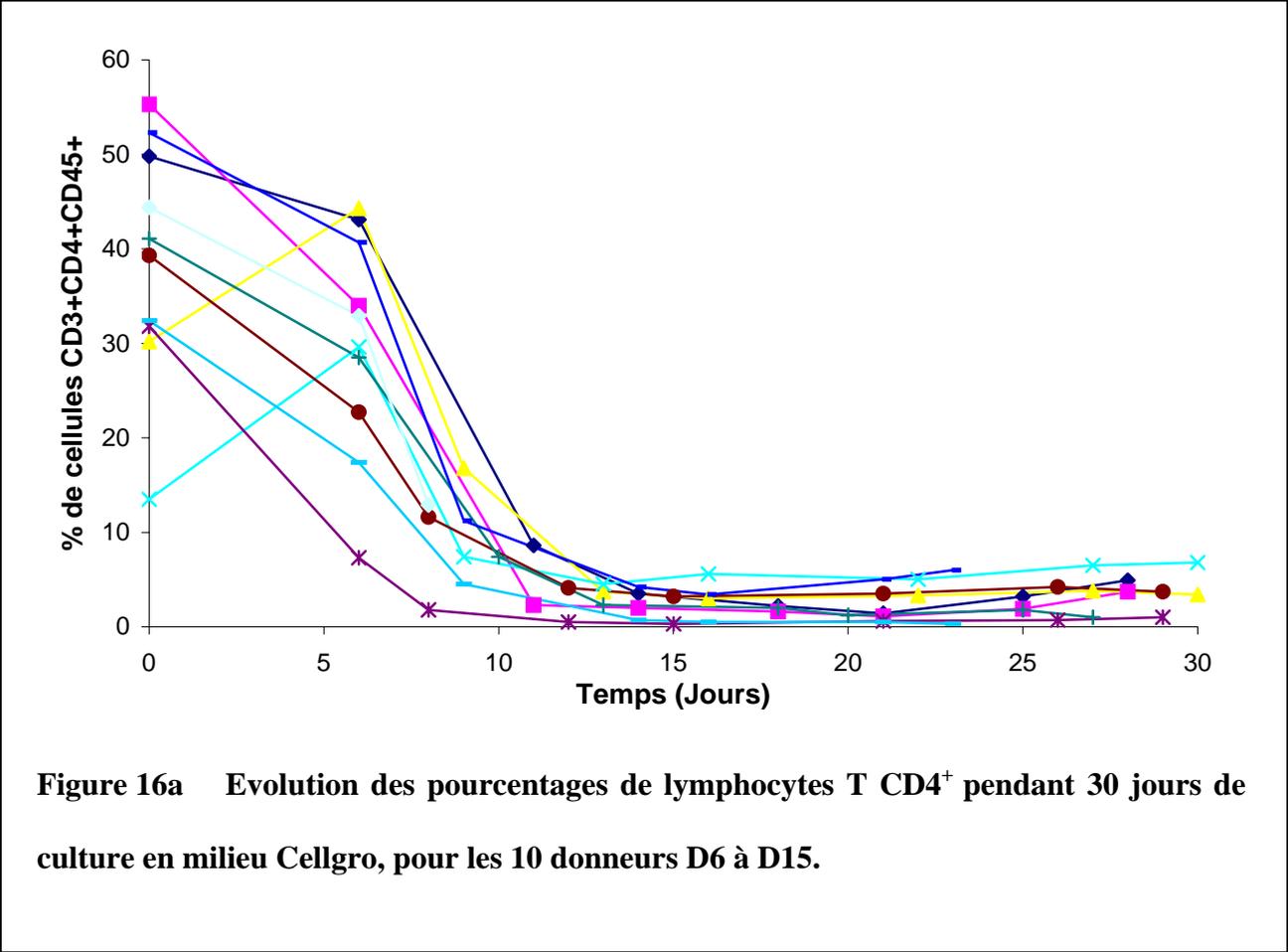


Figure 16a Evolution des pourcentages de lymphocytes T CD4⁺ pendant 30 jours de culture en milieu Cellgro, pour les 10 donneurs D6 à D15.

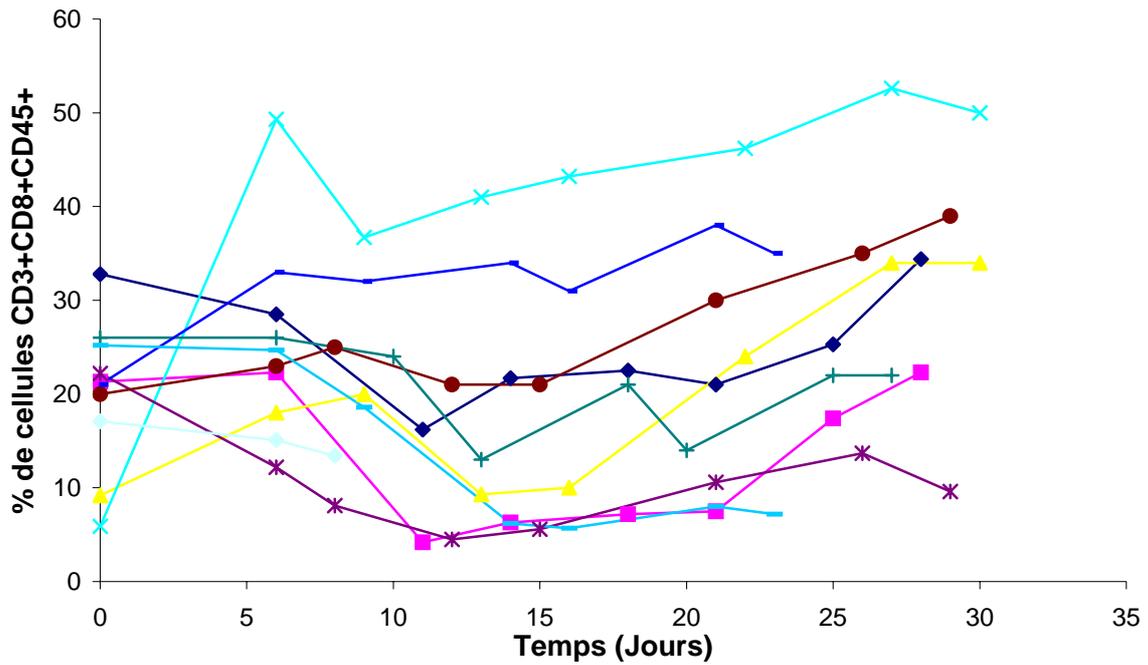
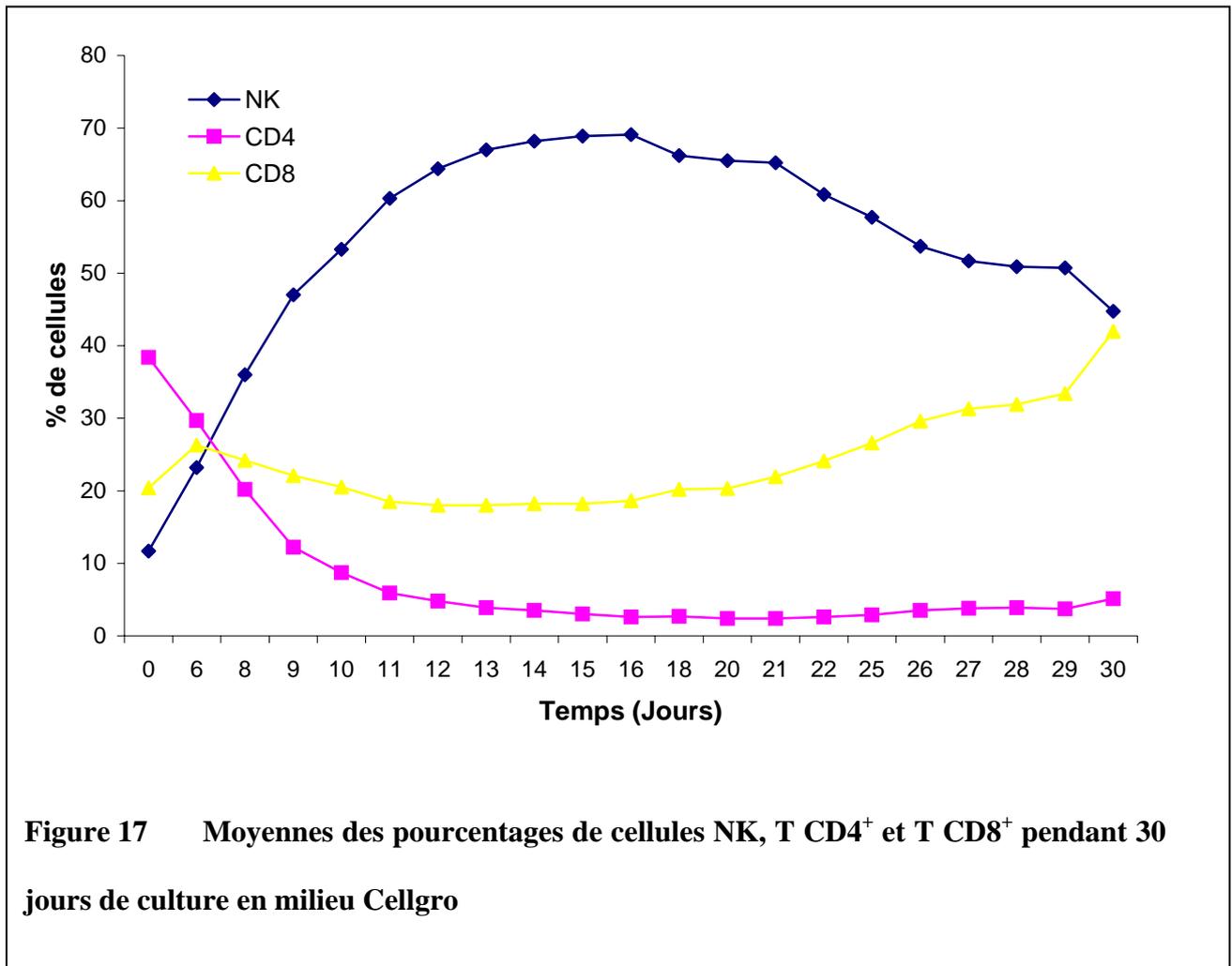


Figure 16b Evolution des pourcentages de lymphocytes T CD8⁺ pendant 30 jours de culture en milieu Cellgro, pour les 10 donneurs D6 à D15.

Les populations de lymphocytes B et de monocytes étaient très faiblement représentées jusqu'à J6 (<1%), avant de disparaître totalement.

Au final, ce protocole d'amplification permettait une expansion massive et spécifique de la population de cellules NK, atteignant des valeurs maximales vers J15, avant de cesser de proliférer à J25, pour diminuer et laisser la place aux lymphocytes T, majoritairement CD8⁺ (Figure 17).



4.3.2.2. Etude du répertoire phénotypique KIR des cellules CD3⁻CD56⁺

Le répertoire en récepteurs KIR exprimés à la surface des cellules NK CD3⁻CD56⁺ amplifiées a été étudié à l'aide des anticorps disponibles. Les résultats présentés dans les tableaux 6, 7 et 8 concernent les pourcentages de cellules CD3⁻CD56⁺ exprimant les récepteurs CD158a (KIR-2DL1), CD158b (KIR-2DL2, -2DL3) et p70 (KIR-3DL1) respectivement. Les pourcentages de lymphocytes totaux en culture exprimant chacun de ces récepteurs ont également été calculés et révélèrent des profils d'évolution similaires. Ainsi, dans le but de simplifier la présentation des résultats, nous ne tiendrons compte pour la suite

de l'analyse que des pourcentages d'expression des marqueurs KIR à la surface des cellules NK.

L'étude du phénotypage des cellules $CD3^+CD56^+$ a révélé un profil d'évolution similaire pour les marqueurs CD158a et CD158b caractérisé par une nette diminution du pourcentage d'expression à J6 par rapport à J0, suivie d'une réaugmentation progressive vers les valeurs initialement observées à J0, sans toutefois les atteindre dans la plupart des cas.

Donneur			BLCL 1					
	Ligands HLA		C2 -					
			J0	J6	J8-11	J14-16	J18-21	J28-30
D6	C1/C2	Bw4/Bw6	27	12	19	19	20	22,9
D7	C1/C1	Bw4/Bw6	13,9	8,9	12,4	14,9	18	18,7
D8	C1/C2	Bw6/Bw6	13	4	6	6	7	7
D9	C1/C1	Bw4/Bw6	24	5	5	4	4	3
D10	C1/C1	Bw4/Bw6	25,2	14,8	14,5	26	24	23
D11	C1/C1	Bw4/Bw6	25,3	8	9	13	14	12
D12	C1/C2	Bw4/Bw4						
D13	C1/C1	Bw4/Bw6						
D14	C1/C2							
D15	C1/C2	Bw6/Bw6						

Tableau 6 Expression du marqueur CD158a (récepteur du groupe ligand HLA C2), à la surface des cellules NK CD3⁻CD56⁺ amplifiées à partir de la BLCL 1.

Donneur			BLCL 1					
	Ligands HLA		C1 +					
			J0	J6	J8-11	J14-16	J18-21	J28-30
D6	C1/C2	Bw4/Bw6	39	2	33	23	23	21
D7	C1/C1	Bw4/Bw6	24	18	26	38	37	37
D8	C1/C2	Bw6/Bw6	35	12	16	20	23	26
D9	C1/C1	Bw4/Bw6	31	18	19	18	17	18
D10	C1/C1	Bw4/Bw6	27	14	11	19	20	18
D11	C1/C1	Bw4/Bw6	20	23	25	21	30	39
D12	C1/C2	Bw4/Bw4	26	26	24	13	14	22
D13	C1/C1	Bw4/Bw6	38	22	29	34	33	31
D14	C1/C2		34	5	6	7	5	5
D15	C1/C2	Bw6/Bw6	45	30	28	25		

Tableau 7 Expression du marqueur CD158b (récepteur du groupe ligand HLA C1), à la surface des cellules NK CD3⁻CD56⁺ amplifiées à partir de la BLCL 1.

En ce qui concerne le marqueur p70, le profil d'évolution était moins bien défini. Les donneurs D8, D9, D14 et D15 présentaient le profil d'évolution décrit précédemment, caractérisé par une diminution d'expression du marqueur à J6 par rapport à la valeur initiale à J0, puis une augmentation vers les valeurs initiales. Les donneurs D6, D7, D10, D11 et D12 présentaient un profil d'évolution très différent caractérisé par une augmentation du pourcentage d'expression du marqueur p70 dès J6 et ce jusqu'à J30 (moins marqué pour le donneur D6). Pour ces 5 derniers donneurs, les cellules présentaient un génotype caractérisé par la présence du ligand Bw4⁺ spécifique du marqueur p70 et étaient placés dans un environnement différent avec la lignée B-LCL 1 Bw4 négative. A l'inverse, les cellules NK des 4 donneurs pour lesquels a été observée une diminution de l'expression du marqueur p70 à J6 puis une faible réaugmentation, ne possédaient pas le ligand Bw4 au niveau de leur génotype HLA (excepté D9). Il n'y avait donc pas de changement d'environnement « ligand » lors de leur confrontation avec la lignée B-LCL 1.

Donneur			BLCL 1					
	Ligands HLA		Bw4 -					
			J0	J6	J8-11	J14-16	J18-21	J28-30
D6	C1/C2	Bw4/Bw6	35	32	42	37	35	32
D7	C1/C1	Bw4/Bw6	27	25	35	43	46	51
D8	C1/C2	Bw6/Bw6	25	11	16	20	19	18
D9	C1/C1	Bw4/Bw6	17	11	14	12	13	13
D10	C1/C1	Bw4/Bw6	13	17	17	27	23	23
D11	C1/C1	Bw4/Bw6	4	26	23	20	24	28
D12	C1/C2	Bw4/Bw4	12	12	18	27	29	28
D13	C1/C1	Bw4/Bw6						
D14	C1/C2		32	0	2	3	3	3
D15	C1/C2	Bw6/Bw6	11	8	6	4		

Tableau 8 Expression du marqueur p70 (récepteur du groupe ligand HLA Bw4), à la surface des cellules NK CD3⁻CD56⁺ amplifiées à partir de la BLCL-1.

Il semblerait que l'expression des marqueurs KIR soit modulée au cours du temps d'amplification et qu'elle soit déterminée par le génotype HLA de la lignée B-LCL apportée. Le changement d'environnement HLA en terme de ligand du marqueur KIR étudié, apporté lors de la confrontation des cellules NK du donneur de génotype HLA donné, pourrait être la cause de cette modulation.

Ainsi, une forte augmentation de l'expression du marqueur p70 a été observée de J0 à J30 lorsque le donneur positif pour le ligand HLA de p70 a été placé face à une BLCL ne possédant pas ce ligand et inversement une forte diminution à J6 suivie d'une faible réaugmentation ont été observées lorsqu'aucun changement n'était opéré au niveau du contexte HLA ligand du marqueur entre les environnements naturels puis imposés par la BLCL. Nous n'avons pas pu vérifier cette hypothèse avec les deux autres marqueurs CD158a et CD158b puisqu'aucun donneur ne répondait au critère « présence du ligand HLA-C homozygote chez le donneur – absence du ligand dans l'environnement BLCL ».

A la suite de ces résultats, nous avons comparé l'évolution du répertoire KIR des cellules NK en culture, en présence de BLCL différentes sélectionnées en fonction de leur génotype HLA (ligands des récepteurs KIR).

4.3.3. Influence du génotype HLA de la lignée B-LCL utilisée, sur l'amplification des cellules NK en culture en milieu Cellgro et sur leur répertoire KIR exprimé

Afin d'étudier l'influence de la BLCL utilisée et plus précisément celle de son génotype HLA sur l'amplification NK de donneurs de génotypes KIR et HLA connus et sur la sélection d'un répertoire KIR à leur surface, nous avons sélectionné 2 lignées B-LCL supplémentaires, l'une de génotype HLA identique à la première BLCL-1 au niveau des

ligands C1 et C2 et différente au niveau du ligand Bw4 (BLCL-2 : C1+C2-Bw4+Bw6+) et l'autre de génotype HLA totalement différent (BLCL-3 : C1-C2+Bw4+Bw6-). Ainsi, les BLCL-1 et -2 diffèrent uniquement au niveau du locus Bw4 (ligands du KIR3DL1), présent sur la BLCL-2 et absent sur la BLCL-1, alors que les BLCL-1 et -3 diffèrent au niveau des 3 loci C1, C2, Bw4. Les BLCL-2 et -3 possèdent toutes deux le ligand Bw4 du KIR3DL1. Les BLCL ont été comparées 2 à 2 pour chacun des donneurs avec un total de 5 donneurs pour chaque comparaison : BLCL 1/2 et BLCL 1/3.

4.3.3.1. Comparaison des lignées BLCL allogéniques 1 et 2

Sur les 5 donneurs testés, 3 présentaient des profils d'amplification de cellules NK similaires quelque soit la BLCL utilisée 1 ou 2 (D14, D15, D16) (Figures 18a), avec une prolifération maximale vers J15 caractérisée par 80% de cellules NK parmi la population de cellules mononucléées totale. Pour les 2 autres donneurs (D12 et D13), une nette supériorité du pourcentage de cellules CD3⁻CD56⁺ amplifiées avec la BLCL-1 a été observée, par rapport à celui obtenu avec la BLCL-2 (Figure 18b).

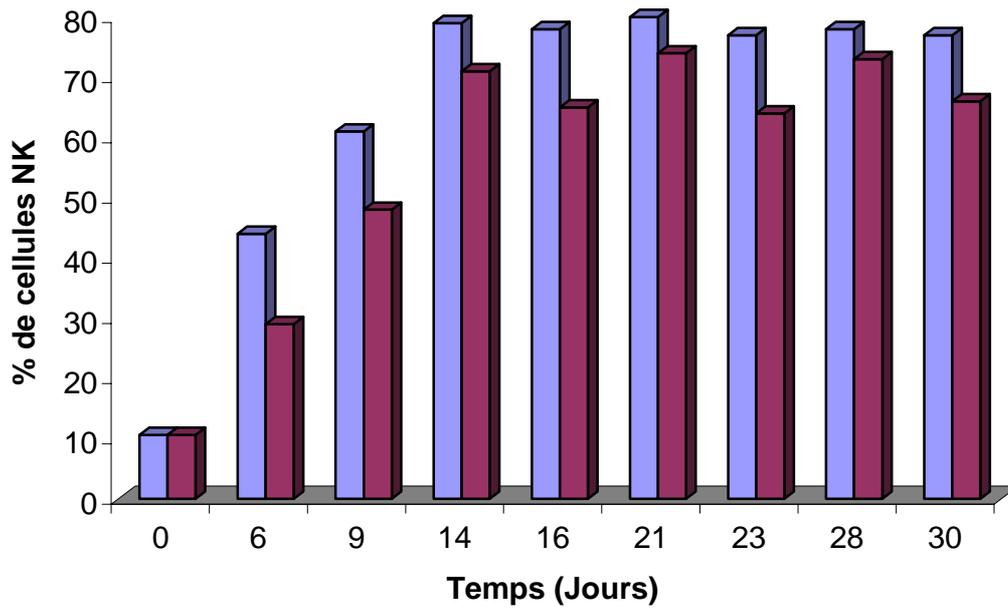


Figure 18a Pourcentages de cellules NK CD3⁺CD56⁺ obtenues en culture après amplification à partir des lignées B-LCL 1 et 2 : exemple du donneur D14

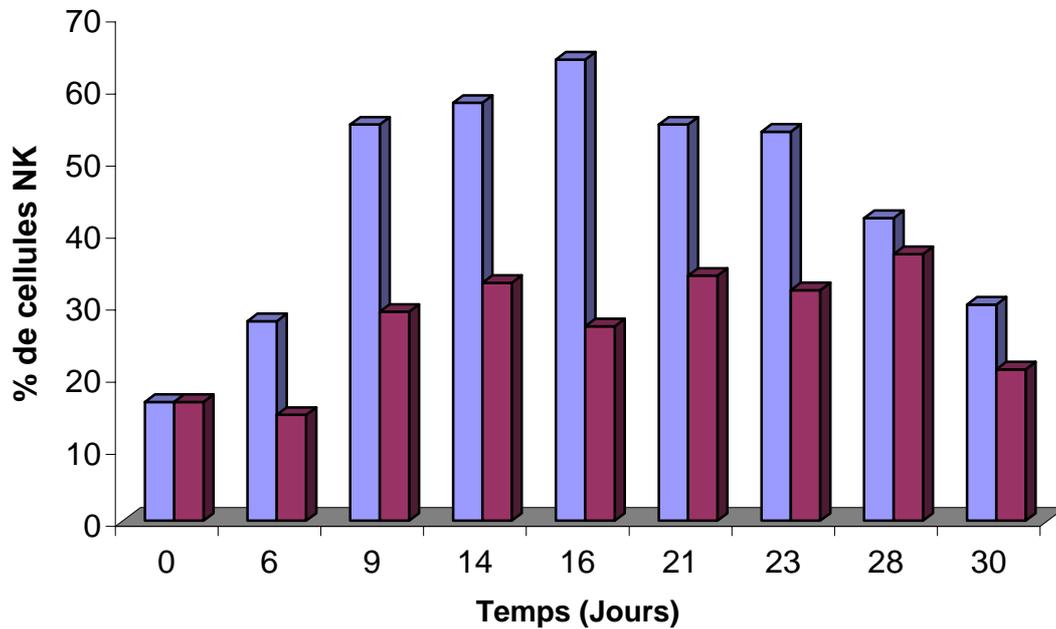


Figure 18b Pourcentages de cellules NK CD3⁺CD56⁺ obtenues en culture après amplification à partir des lignées B-LCL 1 et 2 : exemple du donneur D13

■ BLCL 1 ■ BLCL 2

L'expression des marqueurs CD158b et p70 à la surface des cellules NK a ensuite été étudiée pour chaque donneur et en utilisant les 2 BLCL.

Les profils d'expression phénotypique du marqueur CD158b obtenues étaient proches avec les 2 BLCL, avec des pourcentages d'expression toutefois légèrement supérieurs avec la BLCL-2 (Figure 19a). Comme décrit précédemment, une nette diminution de ce pourcentage a été observée à J6 par rapport à J0, suivie d'une réaugmentation ne permettant toutefois pas d'atteindre les valeurs observées initialement.

En ce qui concerne le marqueur p70, les profils d'expression obtenues étaient identiques avec les 2 BLCL chez les donneurs D14 et D15 (Figure 19b), avec des valeurs restant faibles pendant toute la période de culture sans atteindre les valeurs observées initialement. Il s'agissait des mêmes donneurs pour lesquels les amplifications NK étaient proches. A l'inverse, l'expression était nettement supérieure avec la BLCL-1 pendant toute la durée de la culture, pour les deux autres donneurs D12 et D16 (Figure 19a). L'absence d'expression chez le troisième donneur (D13) confirmait l'absence du gène KIR3DL1 au niveau génomique.

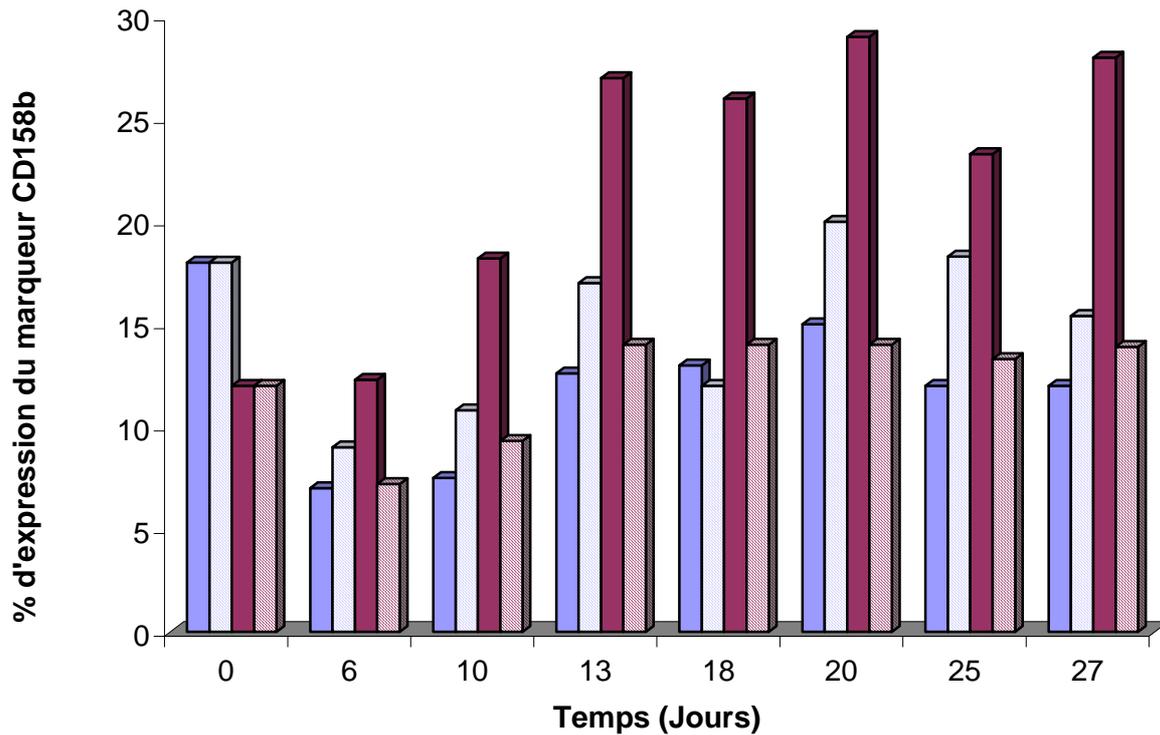


Figure 19a Expression des marqueurs CD158b et p70 à la surface des cellules NK, amplifiées à partir des BLCL-1 et -2 : exemple du donneur D12

marqueur p70 : ■ BLCL-1 ▨ BLCL-2

marqueur CD158b : ■ BLCL-1 ▨ BLCL-2

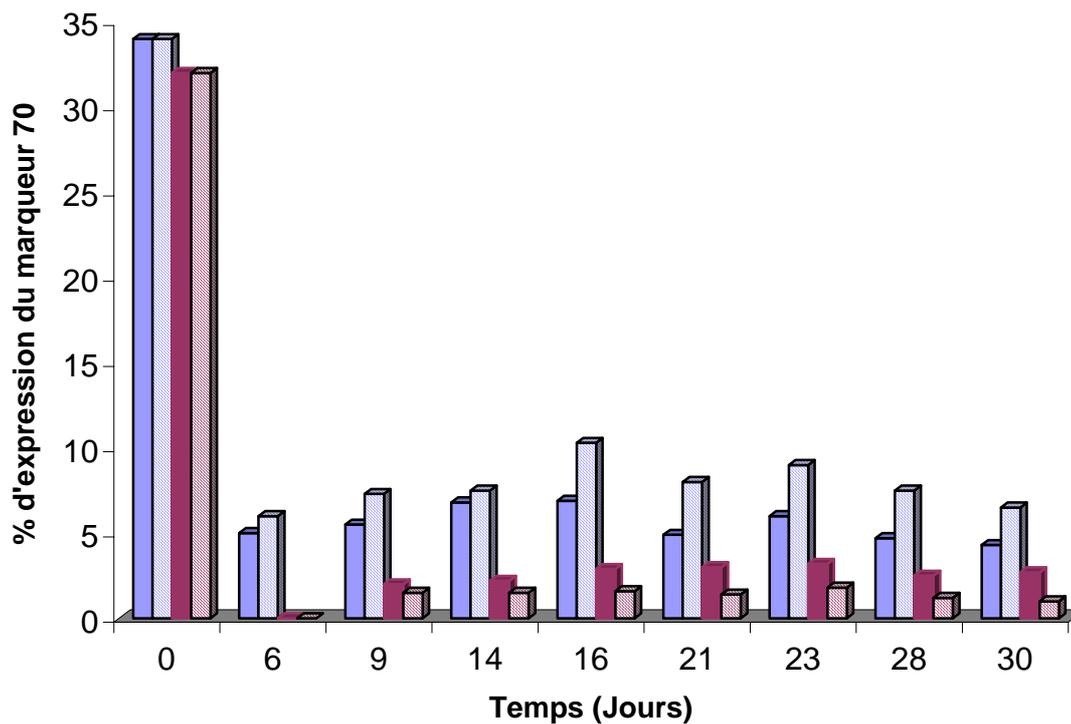


Figure 19b Expression des marqueurs CD158b et p70 à la surface des cellules NK, amplifiées à partir des BLCL-1 et -2 : exemple du donneur D14

marqueur p70 : ■ BLCL-1 ▨ BLCL-2
 marqueur CD158b : ■ BLCL-1 ▨ BLCL-2

Afin d'expliquer ces résultats, nous nous sommes intéressés au génotype HLA des donneurs 12 et 16 pour lesquels l'expression du marqueur p70 était supérieure avec la BLCL-1. Les génotypes de ces deux donneurs étaient HLA-Bw4+ alors que la BLCL-1 était de génotype HLA-Bw4-. Ainsi, le changement d'environnement HLA en présence de la BLCL-1 pourrait expliquer une activation de l'expression du marqueur KIR3DL1, récepteur du ligand Bw4, non retrouvé avec la BLCL-2 Bw4+.

A l'inverse, les faibles valeurs observées du marqueur p70 exprimé à la surface des cellules NK chez les donneurs 14 et 15, en présence des 2 BLCL, pourraient provenir d'une absence d'activation, les cellules NK des donneurs et l'environnement BLCL-1 et -2 étant définis par le même génotype HLA Bw6+ qui ne correspond pas au ligand spécifique du marqueur p70.

4.3.3.2. *Comparaison des lignées BLCL allogéniques 1 et 3*

Les PBMC provenant de 5 donneurs (D17 à D21) ont ensuite été cultivés pendant 16 jours en suivant le protocole précédemment décrit, à partir de 2 BLCL (1 et 3) de génotype HLA totalement différent. En parallèle, les cellules ont été amplifiées en absence de BLCL, avec stimulation non spécifique à la PHA, dans des conditions de culture identiques à celles utilisées pour les 2 BLCL (milieu Cellgro, IL-2r et sérum humain).

Les proliférations des cellules $CD3^+CD56^+$ étaient très différentes d'un donneur à l'autre, atteignant des pourcentages de cellules en culture de 32% à 90% à J16. Cependant, ces amplifications étaient comparables avec les 2 BLCL, pour les 5 donneurs (Figure 20).

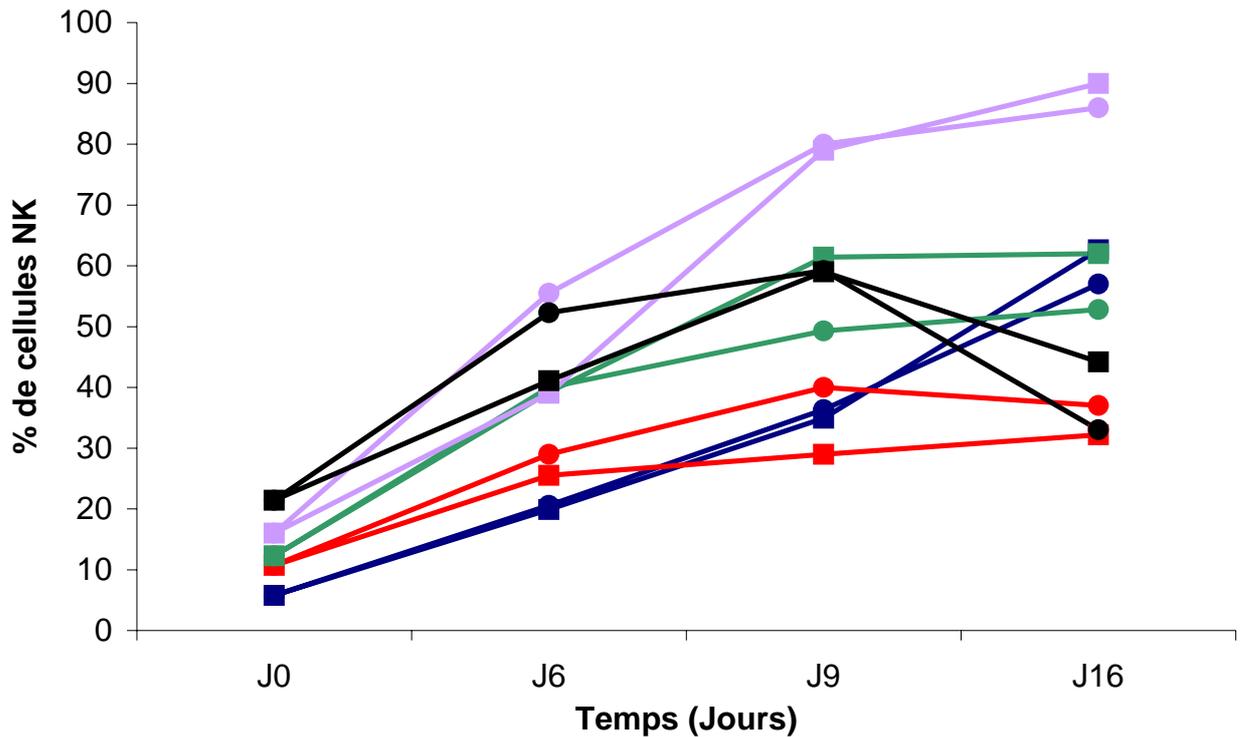


Figure 20 Evolution du pourcentage de cellules NK $CD3^-CD56^+$ au cours de la culture à partir de la BLCL 1 (■) et 2 (●) pour chacun des donneurs (— — — — —).

A l'inverse, le protocole réalisé à partir de PHA a montré une amplification de l'ensemble des populations cellulaires présentes (T et NK), et plus spécifiquement de la population T $CD8^+$, provoquant ainsi une diminution de la proportion des cellules NK en culture.

Dans un second temps, l'analyse du répertoire des marqueurs $CD158a$, $CD158b$ et $p70$ a été effectuée afin d'étudier l'influence du génotype HLA de la BLCL utilisée, sur la sélection d'un répertoire KIR particulier des cellules NK amplifiées de génotypes KIR et HLA donnés. Les résultats ont clairement mis en évidence les deux types de profils

d'expression précédemment décrits. Le profil 1 était caractérisé par une forte diminution du taux d'expression des marqueurs à la surface des cellules NK à J6 puis une augmentation vers des valeurs proches des valeurs initiales observées à J0 et le profil 2 présentait une forte augmentation des taux d'expression en continu de J0 à J16 (Tableau 9).

PROFIL 1	<p style="text-align: center;"> J0 ↓ J6 ↗ J16 </p>
PROFIL 2	<p style="text-align: center;"> J0 ↗ J6 ↗ J16 </p>

Tableau 9 Profils d'expression des marqueurs CD158a, CD158b et p70 exprimés à la surface des cellules NK des donneurs testés.

L'hypothèse évoquée devant ces 2 types de profils caractérisés était le changement de conditions environnementales provoqué par la présence d'une BLCL allogénique instaurant une situation d'alloréactivité NK. En effet, l'amplification d'un marqueur donné était différente selon le contexte HLA ligand (groupe C1, C2 ou Bw4) apporté par la BLCL utilisée, par rapport au contexte HLA ligand initial, propre au donneur.

Dans cette partie, deux donneurs étaient de génotype C2 homozygote et 3 donneurs étaient de génotype C1 homozygote.

Les trois donneurs C1/C1 (D18, D19 et D21) présentaient un profil 2 au niveau du taux d'expression du marqueur CD158b (récepteur du groupe C1), avec la BLCL-3 caractérisée

par l'absence du ligand C1. A l'inverse, avec la BLCL-1 (C1⁺), les taux d'expression présentaient un profil 1. Les deux donneurs D17 et D20 de phénotype C2/C2 (absence du ligand du marqueur CD158b) présentaient des profils d'expression relativement similaires avec les deux BLCL, caractéristiques du profil 1 (Tableau 10).

Donneur		Lignée BLCL									
	Ligands HLA	1					3				
		C1 +					C1 -				
		J0	J6	J9	J16	Profil	J0	J6	J9	J16	Profil
D17	C2/C2 Bw4/Bw6	21,2	11,4	15,2	24,8	1	21,2	14,7	16,1	23,3	1
D18	C1/C1 Bw4/Bw4	25,5	15,2	17,8	24,8	1	25,5	27,3	39,2	45,4	2
D19	C1/C1 Bw4/Bw4	21,1	18,8	23,2	29,4	1	21,1	31,9	50,6	49,1	2
D20	C2/C2 Bw4/Bw6	37,5	29	31,9	36,8	1	37,5	32,5	38,4	43,4	1
D21	C1/C1 Bw6/Bw6	26,3	14,7	18	19,5	1	26,3	24,7	32,2	32,6	2

Tableau 10 Fréquence des cellules NK CD3⁻CD56⁺CD158b⁺ en fonction des conditions allogéniques de stimulation (contexte HLA).

L'hypothèse a ensuite été vérifiée avec l'analyse du marqueur CD158a, récepteur du groupe ligand HLA-C2 (Tableau 11).

Pour les donneurs C2/C2, les profils d'expression du marqueur CD158a correspondaient au profil 2 en présence de la BLCL-1 C2 - alors qu'ils correspondaient au profil 1 avec la BLCL-3 C2⁺ (excepté pour le donneur D19). Les profils d'expression pour les donneurs C1/C1 étaient similaires pour les deux BLCL, caractéristiques du profil 1, excepté 2 donneurs pour lesquels l'expression correspondait au profil 2.

Donneur			Lignée BLCL									
	Ligands HLA		1					3				
			C2 -					C2 +				
			J0	J6	J9	J16	Profil	J0	J6	J9	J16	Profil
D17	C2/C2	Bw4/Bw6	10,6		7,5	19,6	2?	10,6	4,2	5,8	9,2	1
D18	C1/C1	Bw4/Bw4	25,7	12,7	13,9	23,7	1	25,7	23,1	30,1	33,3	2?
D19	C1/C1	Bw4/Bw4	23,8	23,9	34,2	34,5	2?	23,8	6,9	6,6	7,1	1
D20	C2/C2	Bw4/Bw6	11	20	25,8	26,3	2	11	7,2	8	10,4	1
D21	C1/C1	Bw6/Bw6	38,4	21,6	25,1	25,9	1	38,4	18,3	21,3	21,1	1

Tableau 11 Fréquence des cellules NK CD3⁻CD56⁺CD158a⁺ en fonction des conditions allogéniques de stimulation (contexte HLA).

Enfin, notre hypothèse a été appuyée par l'analyse du marqueur p70, dont le ligand est représenté par le groupe HLA-Bw4 (Tableau 12).

Quatre donneurs sur cinq étaient de génotype HLA-Bw4⁺, homozygotes ou hétérozygotes et tous étaient de génotype KIR3DL1⁺ (p70). Cependant, les donneurs D17 et D18 n'exprimaient pas le marqueur p70. Les 2 donneurs D19 et D20 ont révélé des taux d'expression correspondant au profil 2 en présence de la BLCL-1 Bw4⁻, et au profil 1 en présence de la BLCL-3 Bw4⁺. Le donneur D21 caractérisé par l'absence du ligand Bw4 sur son génotype présentait le profil 1 quelque soit la BLCL-1 ou -2 utilisée.

Donneur			Lignée BLCL									
	Ligands HLA		1					3				
			Bw4 -					Bw4 +				
			J0	J6	J9	J16	Profil	J0	J6	J9	J16	Profil
D17	C2/C2	Bw4/Bw6	0	0	0	0		0	0	0	0	
D18	C1/C1	Bw4/Bw4	0	0	0	0		0	0	0	0	
D19	C1/C1	Bw4/Bw4	24,4	35,4	58,9	56,7	2	24,4	8,9	6,3	7,1	1
D20	C2/C2	Bw4/Bw6	29,5	38	50,3	56,5	2	29,5	11	13,5	19,3	1
D21	C1/C1	Bw6/Bw6	46	35,4	39,2	36,7	1	46	13,3	8,2	10	1

Tableau 12 Fréquence des cellules NK CD3⁻CD56⁺p70⁺ en fonction des conditions allogéniques de stimulation (contexte HLA).

Les taux d'expression des différents marqueurs n'évoluent pas de la même façon chez un même donneur, mais semblent être influencés par la présence du ligand correspondant et plus précisément par le changement des conditions HLA instaurées dans son environnement. En effet, la mise en place de conditions d'alloréactivité avec absence de ligand HLA, initialement présentes dans l'environnement naturel, semble provoquer l'augmentation du taux d'expression du marqueur KIR correspondant. Les cellules NK seraient ainsi activées par la levée d'inhibition de la lyse due à l'absence d'interaction entre le récepteur inhibiteur et son ligand HLA correspondant. Cette activation pourrait entraîner une augmentation de la fréquence des cellules NK exprimant des récepteurs KIR spécifiques des ligands absents dans le nouvel environnement.

Le répertoire KIR des cellules NK amplifiées dans les mêmes conditions en substituant la BLCL par la PHA semble être régulé aléatoirement dans de moindres proportions.

4.3.4. Fonctionnalité des cellules CD3⁻CD56⁺ amplifiées en milieu Cellgro à partir des 3 BLCL testées : test de cytotoxicité au chrome 51

Les tests de cytotoxicité avec relargage de Chrome 51 ont été effectués pour les cultures cellulaires de chacun des donneurs afin d'évaluer la fonctionnalité des cellules NK en culture, en fonction du temps et de leur représentation. Les cellules mononucléées en culture ont été mises en présence de cellules K562 ou 721 221 cibles marquées au chrome. Ces cellules cibles n'exprimant pas de molécules HLA à leur surface, ce test permettait de visualiser la cytotoxicité attribuée aux seules cellules NK présentes et plus particulièrement aux récepteurs KIR exprimés à leur surface, dont le ligand HLA correspondant est absent. Le modèle utilisé ne permettant pas la mise en place du mécanisme d'ADCC, la cytotoxicité étudiée correspondait ainsi à la cytotoxicité dite naturelle des cellules NK.

Dans notre étude, le test a été réalisé à des périodes différentes de culture en fonction des donneurs (J8, J15, J20, J30), en utilisant des ratios cellules effectrices/cellules cibles différents (30 :1, 10 :1, 3 :1, 1 :1).

Globalement, les cellules NK amplifiées dans notre modèle étaient fonctionnelles, capables de lyse naturelle puisque les pourcentages de lyse variaient de 40 à 60% à J15. Une diminution de la lyse était observée lorsque le ratio cellules effectrices/cellules cibles diminuait.

L'utilisation de lymphocytes T comme uniques cellules effectrices face aux cellules cibles n'objectivaient aucune trace de lyse, permettant ainsi de confirmer la seule implication des cellules NK dans cette toxicité cellulaire.

Au ratio 10 :1 le plus informatif, les résultats à J15 (Figure 21a) puis J20 à 30 (Figure 21b) ont démontré l'existence d'une corrélation entre le pourcentage de cellules NK en

culture et le pourcentage de lyse des cellules cibles, avec des coefficients de corrélation supérieurs à 0.6.

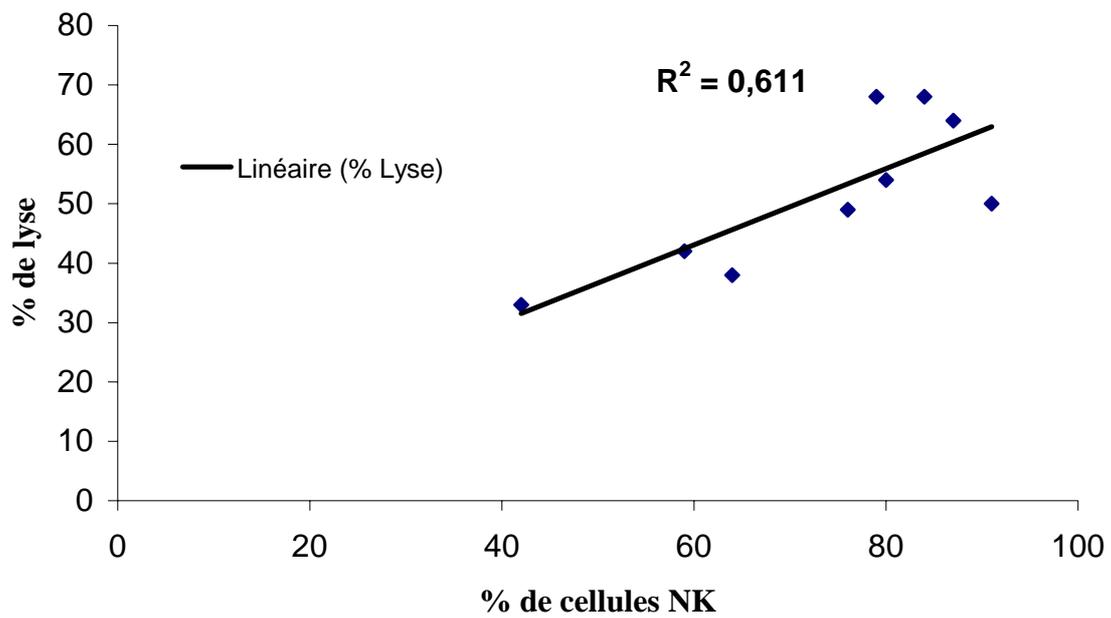


Figure 21a Droite de régression entre le pourcentage de lyse NK et le pourcentage de cellules NK à J15

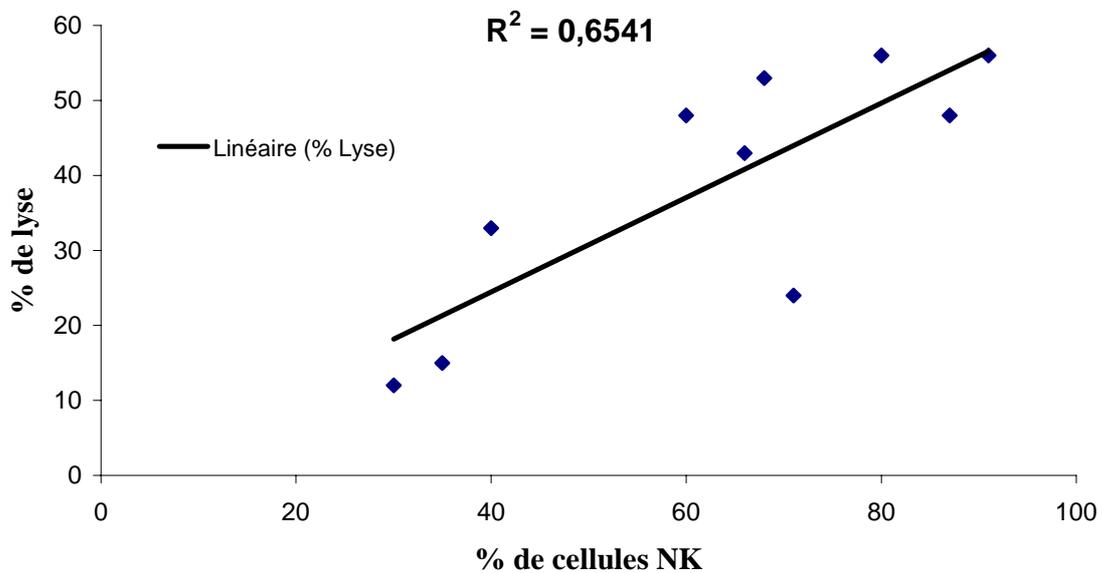


Figure 21b Droite de régression entre les pourcentages de lyse NK et cellules NK à J25

Nous avons ensuite utilisé des lignées 721 221 transfectées en molécules HLA-Cw3 correspondant au groupe de ligands HLA-C1 des récepteurs KIR 2DL2/L3/S2.

Le % de lyse était alors diminué par rapport à celui obtenu avec la lignée 721 221. L'utilisation d'un anticorps anti-KIR correspondant au récepteur KIR de ligand HLA-C1 permettait de restaurer le phénomène de lyse initiale.

Ces résultats confirmaient ainsi la responsabilité des interactions récepteurs KIR et ligands HLA dans ces phénomènes de lyse.

4.4. Conclusion – Discussion

Le modèle in vitro présenté met en présence les cellules NK d'un donneur de génotypes KIR et HLA donnés, avec successivement des lignées de lymphocytes B-LCL allogéniques de génotype HLA sélectionné. En fonction des génotypes du donneur et de la lignée B-LCL, cette situation provoque ou non un phénomène d'alloréactivité des cellules NK vis-à-vis des cellules B-LCL. Il permet ainsi de préciser les degrés d'implication des cellules NK dans la lyse de cellules allogéniques en fonction de leurs génotypes KIR et HLA. Ce modèle reproduit ainsi les phénomènes cellulaires mis en jeu lors de reconstitution post-greffe durant laquelle les cellules NK apportées par le greffon sont confrontées aux cellules hématopoïétiques du receveur de génotype HLA identique ou différent. Dans le contexte HLA identique, des incompatibilités peuvent être observées au niveau des récepteurs KIR entre le donneur et la lignée B-LCL ou au niveau des récepteurs KIR face à leur ligand correspondant. Cet environnement cellulaire simplifié permet d'étudier le seul effet des cellules NK et de leurs récepteurs de manière spécifique. En effet, lors de la reconstitution post-greffe de CSH, l'effet des cellules NK peut être masqué par celui des lymphocytes T résiduels du greffon et par l'impact plus ou moins T-dépléteur du conditionnement.

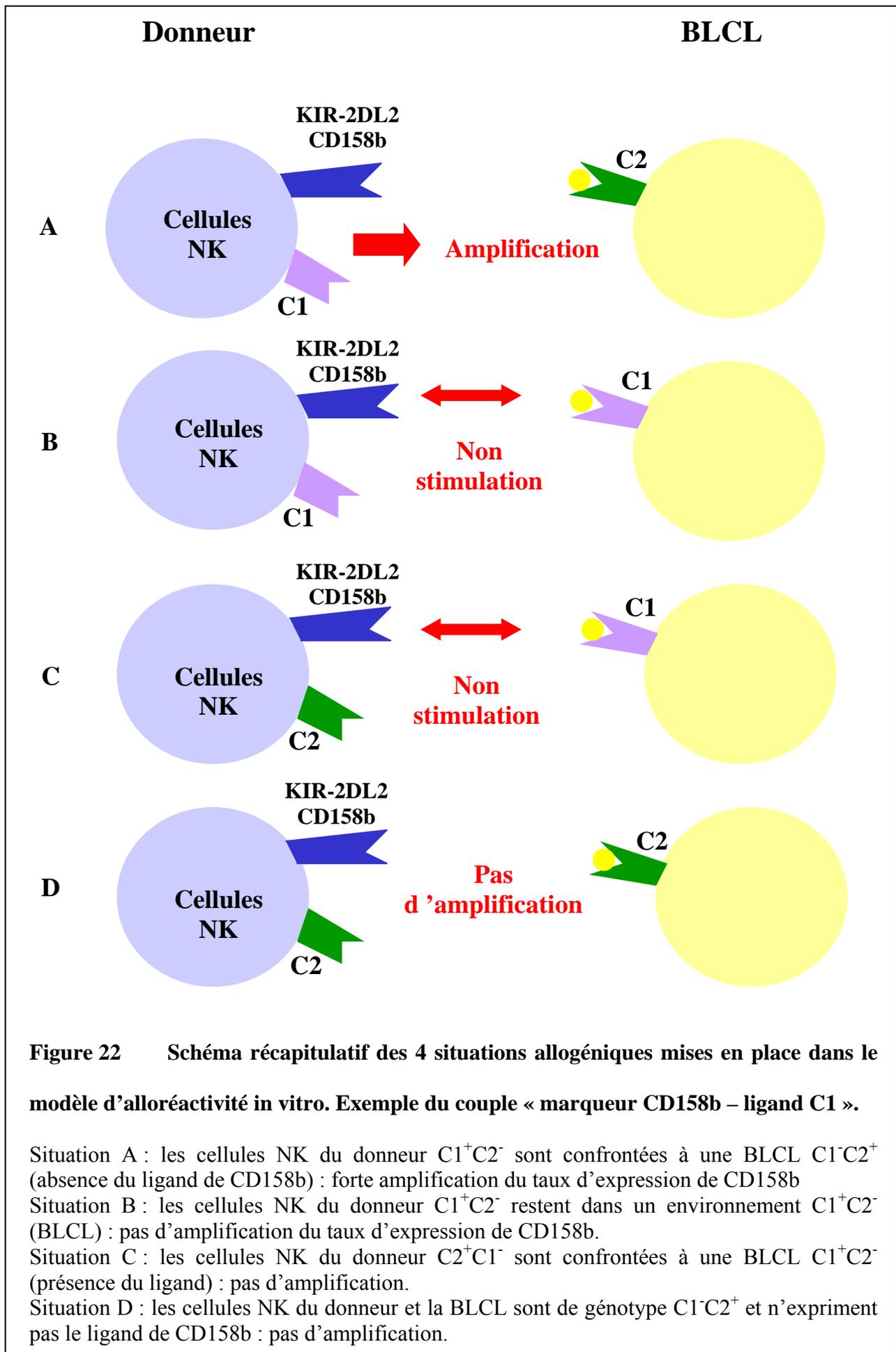
A partir de ce protocole, les cellules NK ($CD3^-CD56^+$) prolifèrent massivement et spécifiquement par rapport aux populations de lymphocytes T $CD8^+$ et $CD4^+$. Le milieu Cellgro utilisé est un milieu de culture spécifique des cellules souches. L'IL-2 et le sérum humain constituent les conditions standards permettant la multiplication des populations cellulaires en culture. Cependant, les raisons de la multiplication spécifique de la population NK sont actuellement mal définies. L'alloréactivité provoquée par la lignée B-LCL allogénique pourrait être responsable de cette amplification spécifique NK. A l'inverse, l'utilisation de PHA dans le protocole d'amplification, en substitution de la lignée B, induit une prolifération non spécifique de l'ensemble des populations cellulaires, notamment la population de lymphocytes T $CD8^+$. Ainsi, le pourcentage de cellules NK parmi l'ensemble des populations diminue au fur et à mesure de la culture. Cependant, l'utilisation d'une lignée B-LCL autologue permet également d'amplifier les cellules NK spécifiquement, sans induire d'alloréactivité. Les signaux d'activation sont donc certainement provoqués par les molécules ou l'absence de molécules à la surface de la lignée B-LCL.

Les protocoles d'amplification NK couramment utilisés consistent à utiliser des milieux de culture standards, en présence de sérum humain, d'IL-2 et de PHA en réalisant des déplétions en lymphocytes T des populations obtenues. D'autres protocoles utilisent des lignées cellulaires défectueuses en molécules HLA de classe I (K562, 721 221...) permettant la stimulation plus spécifique des cellules $CD3^-CD56^+$ (Harada 2002; Robertson 1996-97). Cette activation est probablement due à l'absence d'interaction des récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK avec leurs ligands HLA de classe I. De plus, la transduction des gènes de l'IL-15 (cytokine impliquée dans le développement et la survie des cellules NK) et du ligand de la molécule 4-1BBL (activateur au niveau des cellules leucémiques humaines K562) a montré une forte augmentation de la stimulation NK (Imai 2005).

Au final, les facteurs susceptibles d'induire la multiplication des cellules NK en culture selon notre protocole, sont la composition du milieu utilisé, spécifique de la culture des CSH, et la nature de la lignée et plus particulièrement ses marqueurs (HLA notamment) et les signaux qu'ils induisent en interaction avec les récepteurs NK.

Le phénotype des cellules NK amplifiées a été étudié avec le panel d'anticorps disponibles anti-CD158a, anti-CD158b et anti-p70 reconnaissant respectivement les récepteurs KIR2DL1/KIR2DS1, KIR2DL2/KIR2DL3/KIR2DS2 et KIR3DL1 exprimés à la surface des cellules NK et minoritairement à la surface des cellules TCD8+ mémoires. Les résultats ont montré une hétérogénéité dans les taux cellulaires d'expression des marqueurs KIR, en fonction du donneur, en fonction du marqueur KIR avec chez un même individu, des différences au cours de la culture.

Néanmoins, deux profils de variation d'expression très différents ont pu être déterminés : le premier profil présente une forte diminution des marqueurs KIR à J6 puis une réaugmentation progressive sans jamais dépasser les valeurs initiales observées à J0. Le second profil présente une forte augmentation du pourcentage d'expression dès J1, atteignant des valeurs en fin de culture très supérieures à celles observées à J0. Cette augmentation du taux cellulaire d'expression du marqueur provient soit d'une augmentation d'expression du marqueur à la surface de clones NK spécifiques, soit d'une augmentation de la population clonale NK exprimant ce marqueur. Il semblerait que le second profil soit observé lorsque les cellules NK du donneur sont placées dans un contexte cellulaire (BLCL) dans lequel le ligand HLA du marqueur KIR considéré est absent alors qu'il était présent dans l'environnement initial du donneur (Figure 22A).



A l'inverse, le premier profil est retrouvé lorsque les cellules du donneur sont placées dans le même environnement HLA (Figure 22B) ou lorsque l'environnement HLA initial du donneur ne correspond pas au ligand du récepteur KIR considéré (Figures 22 C et D). Ainsi, le phénomène d'alloréactivité instauré par la présence de cellules B n'exprimant pas le ligand HLA du récepteur KIR considéré, pourrait induire la prolifération de clones exprimant ce récepteur KIR parmi la population NK. Le mécanisme de prolifération de clones exprimant le marqueur KIR considéré pourrait ainsi être l'absence d'interaction entre le marqueur KIR et son ligand HLA, non réprimé par les autres récepteurs inhibiteurs présents à la surface des cellules NK.

Plusieurs études ont montré un phénomène de diminution du taux d'expression des récepteurs KIR, en reconstitution post-greffe précoce, retrouvant des valeurs initiales plus tardivement. Cependant, à l'inverse, l'expression du récepteur CD94 :NKG2A était augmentée (Marsh 2003 ; Nguyen et al. 2005). Ainsi, il serait intéressant de compléter cette étude par une analyse de la régulation du marqueur CD94 :NKG2A par rapport à celle des récepteurs KIR.

L'analyse de l'expression des récepteurs KIR activateurs et des NKR devrait permettre une meilleure compréhension et interprétation des mécanismes de régulation des cellules NK par l'ensemble des récepteurs qu'elles expriment. Ce modèle in vitro pourra ainsi par la suite impliquer l'alloréactivité des cellules NK vis-à-vis de cellules leucémiques de LAM afin de compléter les études réalisées au niveau des gènes KIR et HLA en greffe de CSH.

CONCLUSION – DISCUSSION

Les implications des cellules NK dans l'immunité innée

Les cellules NK sont impliquées dans le système immunitaire inné, à côté des granulocytes, monocytes, macrophages et mastocytes. Ces cellules reconnaissent des structures moléculaires non modifiées, sans nécessité de réarrangement des gènes des récepteurs impliqués. A l'inverse, les cellules B et T impliquées dans la réponse immunitaire adaptative agissent par le biais de récepteurs caractérisés par une grande capacité de variabilité par réarrangement génique et capables de reconnaître spécifiquement un nombre illimité de pathogènes. Cette dernière réponse fournit également une mémoire immunologique très utilisée dans la vaccination. Ainsi, le système immunitaire permet la reconnaissance du non soi primitivement dans une première phase puis spécifiquement dans une seconde phase par interaction des récepteurs T avec les molécules HLA chargées en peptides. Cependant, des mécanismes d'échappement à la surveillance immunitaire se sont développés, non seulement avec les tumeurs où l'on observe une diminution d'expression des molécules HLA, mais également dans les infections. On observe ainsi l'intervention du système immunitaire inné et en particulier les cellules NK. Il est actuellement acquis que les cellules NK jouent un rôle important à la fois dans l'immunité innée, mais également comme régulateurs de la réponse adaptative par l'intermédiaire d'interactions cellulaires et de signaux cytokiniques (Lafarge 2005). Ces caractéristiques rendent ces molécules intéressantes d'un point de vue clinique dans différentes pathologies, et également en tant qu'outils thérapeutiques.

Plusieurs études génétiques des infections virales ont permis de révéler une influence des interactions des gènes KIR et HLA sur le devenir de ces pathologies (Rajagopalan 2005). Martin et al ont montré que l'association du gène KIR3DS1 et des allèles HLA-Bw4 était bénéfique chez des patients HIV+ (Gomez-Lozano et al. 2002).

La combinaison du gène KIR2DL3 et de son ligand correspondant HLA-C1 a été retrouvée protectrice de l'infection chronique au virus de l'hépatite C (Khakoo 2004). L'hypothèse d'une diminution du signal inhibiteur KIR2DL3-ligand C1, facilitée par une faible affinité récepteur/ligand (Winter 1998) et laissant place à un signal activateur provoquant la lyse de la cellule infectée, a été suggérée par les auteurs afin d'expliquer les résultats obtenus.

Certaines combinaisons génotypiques KIR et HLA ont également été associées à une susceptibilité accrue aux maladies autoimmunes (Rajagopalan 2005). Ainsi, le rôle des récepteurs activateurs KIR2DS1 et/ou KIR2DS2 a été montré dans la susceptibilité à développer une arthrite psoriatique (Gomez-Lozano et al. 2002), en absence du ligand HLA spécifique correspondant au récepteur inhibiteur homologue. De même, la présence du gène KIR2DS2 combinée avec celle du ligand HLA-C1 et en absence des ligands HLA-C2 et HLA-Bw4 a été associée à une susceptibilité augmentée au diabète de type I (van der Slik et al. 2003).

Ainsi, la combinaison des récepteurs KIR activateurs avec les ligands HLA correspondants chez un même individu prédispose à certaines maladies notamment autoimmunes et infectieuses (HIV).

Il semblerait cependant que les gènes KIR activateurs ne soient pas indispensables puisqu'il n'est pas rare de retrouver des haplotypes caractérisés par l'absence de gène KIR activateur fonctionnel (en excluant le KIR2DL4 inhibiteur et activateur) (Hsu 2002). De plus, tous les individus possèdent des clones NK qui n'expriment pas de récepteurs KIR activateurs. Les ligands des KIR activateurs restent actuellement mal définis. Les récepteurs KIR2DS1 et KIR2DS2 pourraient se lier aux molécules HLA-C avec une plus faible affinité que leur homologues inhibiteurs (Vales-Gomez 2001). Il est probable que d'autres ligands existent, distincts des molécules HLA, comme le montrent l'étude de Katz et al (Katz et al. 2004) décrivant des ligands du KIR2DS4 au niveau des cellules de mélanome. Chez la souris,

les récepteurs Ly49, fonctionnellement équivalents à la famille des récepteurs KIR chez l'homme, possèdent comme ligand la protéine m157 du MCMV, suggérant ainsi que les KIR pourraient avoir des protéines virales comme ligands (Arase 2002 ; Smith 2002).

D'autre part, les cellules NK interagissent fonctionnellement avec les cellules dendritiques, influençant l'induction et la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative (Ferlazzo 2004; Zitvogel 2002). En effet, l'activation des cellules NK par le biais de leurs récepteurs exprimés à leur surface peut induire la réponse des cellules T par activation des cellules dendritiques. Réciproquement, les cellules dendritiques sont capables d'activer les cellules NK dans les réponses antivirales par activation des cellules T (CD4+) sécrétrices d'IL2 (van den Broeke 2003). L'interaction NK/DC semble régulée par le ratio existant entre ces deux populations cellulaires : à un faible ratio NK/DC, la maturation des cellules dendritiques par les cellules NK est prédominante alors qu'à un ratio NK/DC élevé, la lyse des cellules dendritiques par les cellules NK est privilégiée (Piccioli 2002).

Ainsi, les cellules NK représentent des régulateurs importants de la réponse immunitaire innée et adaptative, notamment dans les infections et les tumeurs. Leurs interactions avec les cellules dendritiques, les macrophages et les trophoblastes foetaux peuvent moduler l'activité des cellules NK par la production de cytokines et l'induction de cytotoxicité. L'ensemble des ligands des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK nécessitent cependant d'être identifiés afin de mieux comprendre la contribution des interactions récepteurs/ligands dans les applications cliniques.

Sur le modèle des associations « molécules HLA – pathologies », de nouvelles bases moléculaires sont actuellement en phase de découverte qui impliqueront les associations de pathologies avec les combinaisons des gènes KIR et HLA.

D'autre part, les cellules NK ont récemment démontré leur implication capitale en greffe allogénique de CSH, dans l'alloréactivité cellulaire provoquée par la confrontation des cellules du receveur et du donneur de génotypes KIR et/ou HLA différents. De plus, les cellules NK réapparaissent très précocément en reconstitution post-greffe de CSH, majoritairement représentées pendant les premiers mois au cours desquels ont lieu les réactions immunologiques déterminantes en greffe de CSH (GvHD et GvL). C'est pourquoi de nombreuses équipes s'intéressent actuellement au rôle des cellules NK et de leurs récepteurs activateurs et inhibiteurs dans les réactions délétères de GvHD et bénéfique de GvL post-greffe allogénique de CSH.

L'alloréactivité des cellules NK en greffe de CSH

Les connaissances acquises ces dix dernières années sur les récepteurs des cellules NK et plus particulièrement en ce qui nous concerne sur les récepteurs KIR, ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du rôle des cellules NK comme effecteurs potentiels du contrôle de la réponse immune en greffe de cellules souches hématopoïétiques ainsi qu'en immunothérapie adoptive. La réponse NK semble résulter de signaux compétitifs dépendant des interactions entre les molécules HLA de classe I classiques et les récepteurs inhibiteurs et des interactions entre les molécules HLA de classe I classiques ou non et les récepteurs activateurs. Le signal inhibiteur est prédominant par rapport au signal activateur au niveau des cellules saines. Vis-à-vis des cellules pathologiques, le signal activateur deviendrait prédominant. Les mécanismes conduisant à ce signal activateur sont mal connus mais pourraient provenir d'une « up-regulation » des récepteurs activateurs à la surface des cellules NK et/ou de leurs ligands à la surface des cellules cibles, ou encore d'une « down regulation » des récepteurs inhibiteurs et/ou de leurs ligands (Bauer 1999; Cantoni 1999).

Cependant, de nombreux aspects sur la biologie des cellules NK et les mécanismes de régulation conduisant à la susceptibilité ou la résistance NK dans le contexte de l'allogreffe restent à élucider.

D'autre part, la population NK est caractérisée par une clonalité variable et plus ou moins spécifique d'un environnement à l'autre, qui doit être prise en compte dans la compréhension de ces mécanismes.

Une étude récente a montré la présence de clones alloréactifs chez des receveurs atteints de LAM ayant reçu une greffe de CSH haplo-identique. Ces clones, d'origine du donneur, étaient impliqués dans la réaction de GvL post-greffe mais n'induisaient pas d'effet GvHD. L'hypothèse évoquée afin d'expliquer ces résultats était la destruction des cellules présentatrices de l'antigène, habituellement impliquées dans l'effet GvHD. Cet effet était observé uniquement vis-à-vis de cellules leucémiques de LAM, soulevant l'hypothèse du rôle de la molécule d'adhésion LFA-1 dans la lyse cellulaire NK, molécule non exprimée au niveau des cellules leucémiques de LAL. Une étude plus récente a démontré la présence d'une alloréactivité NK chez des enfants atteints de LAL (Leung 2004), confirmant cette hypothèse, les cellules de LAL pédiatriques exprimant la molécule d'adhésion, contrairement aux cellules de LAL adultes.

Koh et al ont également démontré que le blocage des récepteurs inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK augmentait l'effet antileucémique chez des souris syngéniques, sans induire d'autoréactivité vis-à-vis des cellules hématopoïétiques (Koh 2001; Koh 2002), confirmant l'implication de l'alloréactivité NK dans l'effet antileucémique.

Suite à ces résultats, de nombreuses études ont été menées sur l'implication d'incompatibilités au niveau des ligands HLA des récepteurs KIR en greffe de CSH.

Notre étude sur l'implication du polymorphisme des gènes KIR en greffe de CSH s'est focalisée à l'inverse sur les gènes KIR en greffe de CSH HLA identiques et l'influence des

incompatibilités entre les génotypes KIR du donneur et du receveur sur les événements post-greffe de CSH. Cependant, ces études focalisées sur les récepteurs KIR ou sur leurs ligands HLA ne permettent pas d'envisager les potentielles interactions effectives entre les récepteurs KIR et leurs ligands HLA. De plus, malgré les fréquences élevées qui caractérisent les récepteurs KIR inhibiteurs, il est impossible de prévoir le génotype KIR du donneur ou du receveur en fonction du génotype HLA, les gènes KIR et HLA ségrégeant sur 2 chromosomes indépendamment (19 et 6 respectivement).

Actuellement, les études tendent à analyser à la fois les gènes KIR et HLA chez le donneur et le receveur et permettent ainsi d'analyser leurs interactions spécifiques afin d'établir les incompatibilités impliquées dans les réactions GvH et GvL (Hsu 2005). L'ensemble de ces études n'a cependant pas permis de définir de consensus sur le rôle des incompatibilités au niveau des interactions récepteur KIR – ligand HLA, chez le receveur, en greffe allogénique de CSH. La raison principale de la disparité des résultats obtenus, parfois contradictoires, est la multitude de paramètres qui interviennent en greffe de CSH, tels que le conditionnement, la dose de cellules souches injectées, le type de greffe déplétée ou non en cellules T, les traitements post-greffe (immunosuppression). De même, le risque de GvHD très exploré actuellement par les équipes de recherche en même temps que son équivalent bénéfique représenté par la réaction de GvL, dépend de nombreux facteurs tels que le nombre de lymphocytes T présents dans le greffon, la disparité génétique entre le donneur et le receveur, le degré de réactivité immunologique propre à chaque patient, la toxicité du conditionnement, les infections virales. Ainsi, l'alloréactivité NK est très probablement variable d'un couple donneur/receveur à l'autre, pour un même nombre de lymphocytes T injectés.

Le rôle des cellules NK dans l'immunologie de la greffe est d'autant plus difficile à appréhender que les récepteurs exprimés à leur surface et qui permettent leur régulation, sont eux-mêmes régulés à un niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel, sous la dépendance de facteurs génétiques (promoteur) et épigénétiques (méthylation des îlots CpG) (Santourlidis 2002; Trompeter et al. 2005). Ainsi, l'étude des récepteurs KIR au niveau génomique ne permet pas de prévoir l'expression transcriptionnelle et protéique de ces récepteurs ni d'appréhender leur niveau d'expression et par conséquent leur implication fonctionnelle.

Dans ce contexte, au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux transcrits des gènes KIR et à leur régulation au cours de la reconstitution post-greffe de CSH. Les gènes KIR étaient transcrits dans tous les cas mais dans des quantités très différentes. Cette hétérogénéité des taux de transcription était observée non seulement entre les donneurs, mais également entre les différentes spécificités de récepteurs KIR testés et aux différentes périodes de la reconstitution post-greffe de CSH. Les résultats ont montré une corrélation entre un taux de transcription élevé pendant la période précoce de la reconstitution (J14), et l'absence de GvHD aigue. Chez des individus sains, Leung et al (Leung 2005) se sont également récemment intéressés aux gènes KIR impliqués en greffe de CSH et à leur expression au niveau transcriptionnel et protéique. Les résultats ont montré de fortes discordances entre le génotype et les phénotypes transcriptionnel et protéique correspondants, confortant nos résultats dans l'analyse de la transcription des gènes KIR.

Très peu d'études à l'heure actuelle se sont attachées à analyser in vivo le répertoire des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK en reconstitution post-greffe de CSH. Parmi les récepteurs exprimés à leur surface, les récepteurs KIR ont suscité le plus vif intérêt en greffe de CSH du fait de leur important polymorphisme, à l'image de celui des molécules HLA avec lesquelles ils interagissent. La fonctionnalité des cellules NK est cependant définie

par l'ensemble des récepteurs et plus spécifiquement par les récepteurs inhibiteurs. En particulier, l'implication du récepteur inhibiteur CD94 :NKG2A a récemment été démontrée dans l'autorégulation et la répression de clones NK autoréactifs chez un individu sain (Grau et al. 2004). L'expression de la molécule ligand HLA-E du récepteur CD94 :NKG2A étant ubiquitaire, aucun clone alloréactif n'est observé parmi la population NK qui exprime le récepteur inhibiteur.

Plusieurs équipes ont montré que le répertoire des cellules NK en reconstitution hématopoïétique précoce post-greffe de CSH était immature, caractérisé majoritairement par un phénotype CD3⁻CD56⁺ peu cytotoxique, une faible proportion de clones exprimant les récepteurs KIR, une faible expression du récepteur activateur NKp30 et au contraire une forte expression du récepteur inhibiteur CD94 :NKG2A (Marsh 2003 ; Nguyen et al. 2005 ; Vitale 2000). De même, en 2005, Vitale et al (Vitale 2005) ont montré qu'au moment de la prise de greffe (J20 post-greffe), la plupart des patients présentait des cellules NK circulantes immatures caractérisées par une faible expression des NCR et par de faibles niveaux d'activité cytotoxique. La maturation des cellules NK semble apparaître à des stades plus tardifs après la greffe.

Les raisons de cette immaturité des cellules NK restent à définir, probablement favorisée par un conditionnement intensif par irradiation et chimiothérapie, destructeur d'un milieu favorable à la maturation et par la présence éventuelle de cellules T matures dans le greffon pouvant affecter le développement des cellules NK.

D'autre part, les récepteurs KIR, majoritairement exprimés à la surface des cellules NK, sont également exprimés au niveau de sous-populations de lymphocytes T-CD8 mémoires (Arlettaz et al. 2004), T $\gamma\delta$, T CD4 (van Bergen et al. 2004), et au niveau de la population NKT. Ces clones cellulaires T possèdent un répertoire en récepteurs KIR et CD94/NKG2A distinct de celui des cellules NK dont l'expression pourrait être déterminée

suite aux réarrangements du TCR (Uhrberg et al. 2001). Ainsi le rôle des cellules T exprimant des récepteurs KIR et qui réapparaissent plus tardivement que les cellules NK dans la reconstitution post-greffe après un conditionnement myéloablatif mais qui dans le cas d'un conditionnement non myéloablatif restent présentes chez le receveur et chez le donneur sont présentes dans les greffons non T déplétés, doit être pris en compte. En 2001, alors que le rôle des cellules NK dans le rejet aigu des CSH observé dans le modèle de résistance hybride a été confirmé, les cellules NKT n'y ont cependant révélé qu'un rôle mineur (Suzue 2001).

En résumé, chaque méthode de détermination du répertoire KIR : génotypage, RT-PCR avec l'analyse des ARNm ou cytométrie en flux, a ses avantages et ses inconvénients. Le génotypage est stable et sûr mais ne permet pas de prédire l'expression des gènes présents. La RT-PCR implique l'utilisation d'ARN messagers, moins stables mais plus facilement contaminés que l'ADN. Enfin, les anticorps nécessaires pour l'analyse en cytométrie de flux ne sont actuellement pas disponibles pour toutes les spécificités KIR d'intérêt avec l'existence de réactivité croisée entre récepteurs KIR inhibiteurs et activateurs.

A l'aide des anticorps disponibles, nous nous sommes attachés à étudier le répertoire KIR des cellules NK de donneurs, dans un modèle d'alloréactivité in vitro. Pour cela, nous avons utilisé un protocole d'amplification NK dans lequel les cellules des donneurs sont confrontées à plusieurs lignées B (BLCL) exprimant des molécules HLA différentes en terme de ligands des récepteurs KIR. Il semblerait qu'en fonction du génotype HLA de la lignée B utilisée et des génotypes HLA et KIR du donneur, on observe une modulation du répertoire KIR plus ou moins importante et spécifique. Ces résultats doivent être confirmés sur une série plus importante de donneurs et regroupant l'ensemble des combinaisons HLA et KIR possibles entre le donneur et la BLCL. Ils permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation des récepteurs KIR à la surface des cellules NK, en fonction de l'environnement

KIR et HLA auquel ils sont confrontés. Il est également communément admis que le phénotype KIR est déterminé principalement par le génotype KIR qualitativement mais que la proportion de cellules exprimant ce répertoire est influencée par le génotype HLA. De plus, ce modèle simplifié permettra d'approfondir les connaissances sur l'alloréactivité NK en reconstitution post-greffe de CSH au cours de laquelle les cellules majoritairement représentées immédiatement après la greffe sont les cellules NK du donneur, alors confrontées aux cellules résiduelles du receveur. Pour la suite de notre protocole *in vitro*, ces cellules NK amplifiées et purifiées pourront être utilisées dans l'étude de l'alloréactivité des cellules NK régulées par les récepteurs qu'elles expriment, vis-à-vis de cellules leucémiques de patients atteints de LAM dans un contexte d'incompatibilité donneur/receveur KIR et HLA particulier.

En plus de représenter un outil de travail dans l'étude de la régulation des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK, ce protocole d'étude *in vitro* est intéressant pour l'obtention d'une forte et spécifique amplification de cellules NK, avec potentiellement une application thérapeutique (choix du donneur et/ou thérapie cellulaire NK).

Il existe actuellement de nombreux protocoles différents d'expansion de cellules NK. Un protocole non spécifique consiste à amplifier l'ensemble des populations cellulaires à l'aide de phytohématagglutinine, d'IL2, de sérum humain, accompagnés de plusieurs déplétions en cellules T réalisées tout au long de la culture. D'autres protocoles consistent à utiliser des lignées nourricières. La lignée cellulaire K562 qui n'exprime pas de molécules HLA de classe I entraîne une forte stimulation et l'expansion de cellules NK à partir de PBMC et dans un milieu de culture contenant de l'IL2. Cette expansion semble provoquée par la stimulation des cellules NK impliquées dans la lyse des cellules cibles (Phillips 1985). Les lignées humaines de lymphoblastes transformés par le virus EBV (Perussia 1987 ; Porgador 1997), les cellules de mélanome malin humain (Warren 1991), les monocytes autologues (Miller 1992) ont également été utilisées pour l'expansion des cellules NK. Harada et al ont montré que parmi

les lignées cellulaires exprimant peu de molécules HLA de classe I à leur surface, seule la lignée HFWT permettait sélectivement l'expansion des cellules NK à partir de PBMC (Harada 2002). Cependant, l'ensemble de ces protocoles permettant l'expansion spécifique des cellules NK dans des conditions de culture très différentes n'a pas permis de définir les mécanismes précis conduisant à cette amplification au détriment des autres lignées cellulaires, mise à part la stimulation fonctionnelle, commune à l'ensemble des protocoles.

Les objectifs d'une forte expansion NK sont non seulement l'étude de la biologie des cellules NK mais également l'immunothérapie adoptive dans différentes applications.

En effet, l'injection de lymphocytes du donneur, appelé DLI (Donor Lymphocyte Infusion) peut être utilisée en cas de chimérisme partiel ou mixte post-greffe, afin d'obtenir un effet anti leucémique par les lymphocytes du donneur et ainsi consolider la greffe (Horowitz 1990). Le risque très important de cette stratégie est de développer un effet GvH. Basé sur ce même principe, le transfert adoptif de cellules NK présente un intérêt thérapeutique documenté chez la souris et chez l'homme (Whiteside 1998). Quelques équipes se sont attachées à la préparation et l'injection de lymphocytes NK de donneur, purifiées et déplétées en Ly T, dans ce même but de consolider la prise de greffe et induire un effet GvL sans effet GvH (Koehl 2004; Passweg 2004). Cependant ce traitement nécessitait l'administration conjointe d'IL2 entraînant des effets secondaires néfastes. Avec le même objectif de consolider la greffe et induire un effet GvL, Miller et al (Miller 2005) ont montré que des cellules NK de génotype HLA haploidentique étaient capables de s'amplifier *in vivo* et pouvaient avoir un rôle dans le traitement des LAM, utilisées seules ou en association avec une greffe de CSH. Cette même équipe avait montré dans une précédente étude que l'utilisation de cellules NK autologues n'induisait pas d'effet GvL après une greffe de CSH, probablement due à l'absence d'alloréactivité vis-à-vis des cellules leucémiques, justifiant l'emploi de cellules NK allogéniques par la suite.

Pour conclure, l'alloréactivité des cellules NK est impliquée dans les réactions immunologiques observées en reconstitution post-greffe allogénique de CSH, en particulier dans les greffes T-déplétées. Au sein de l'alloréactivité NK, les interactions entre les récepteurs KIR et leurs ligands HLA semblent capitales. Les combinaisons compatibles ou non entre les génotypes KIR et HLA du donneur et du receveur bénéfique ou délétère d'un point de vue immunologique post-greffe de CSH, doivent être déterminées par des études plus homogènes. Cependant, les interactions de l'ensemble des récepteurs exprimés à la surface des cellules NK et en particulier des récepteurs inhibiteurs doivent être prises en compte dans l'interprétation de la régulation fonctionnelle des cellules NK. L'absence de toxicité et l'efficacité d'une immunothérapie adoptive cellulaire NK dans le traitement des pathologies hématologiques malignes, en association ou non avec la greffe de CSH, restent à démontrer par des essais cliniques de phases II et III.

BIBLIOGRAPHIE

- Allan, D., Colonna M, Lanier LL, Churakova TD, Abrams JS, Ellis SA, McMichael AJ, Braud VM.: Tetrameric complexes of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G bind to peripheral blood myelomonocytic cells. *J Exp Med* 189: 1149-56, 1999
- Andre, P., Brunet, C., Guia, S., Gallais, H., Sampol, J., Vivier, E., and Dignat-George, F.: Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *Eur J Immunol* 29: 1076-85, 1999
- Anfossi, N., Doisne, J. M., Peyrat, M. A., Ugolini, S., Bonnaud, O., Bossy, D., Pitard, V., Merville, P., Moreau, J. F., Delfraissy, J. F., Dechanet-Merville, J., Bonneville, M., Venet, A., and Vivier, E.: Coordinated expression of Ig-like inhibitory MHC class I receptors and acquisition of cytotoxic function in human CD8+ T cells. *J Immunol* 173: 7223-9, 2004
- Arase, H., Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL.: Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 296: 1323-6, 2002
- Arlettaz, L., Degermann, S., De Rham, C., Roosnek, E., and Huard, B.: Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity. *Eur J Immunol* 34: 3413-22, 2004
- Asai, O., Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ.: Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 101: 1835-42., 1998
- Atkinson, K.: Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 5: 209-26, 1990
- Auletta, J., Lazarus HM.: Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant*. 35: 835-57, 2005
- Barao, I., Murphy WJ.: The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection. *Biol Blood Marrow Transplant*. 9: 727-41., 2003
- Barten, R., Torkar M, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ.: Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol*. 22: 52-7, 2001

- Batchelor, J., Lechler RI.: Why MHC incompatible grafts induce strong primary alloimmunity. *Transplant Proc.* 14: 535-7, 1982
- Bauer, S., Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T.: Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 285: 727-9, 1999
- Beelen, D., Ottinger HD, Ferencik S, Elmaagacli AH, Peceny R, Trenscher R, Grosse-Wilde H.: Genotypic inhibitory killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility enhances the long-term antileukemic effect of unmodified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias. *Blood.* 105: 2594-2600, 2005
- Bennett, M., Kumar V, Mikhael A, Murphy WJ, Rembecki RM, Sentman CL, David CS.: Rejection of bone marrow cells by irradiated mice: NK and T cells recognize different antigens. *Transplant Proc.* 19: 5-11, 1987
- Besostri, B., Beggiato E, Bianchi A, Mariani S, Coscia M, Peola S, Foglietta M, Boccadoro M, Pileri A, Moretta L, Massaia M.: Increased expression of non-functional killer inhibitory receptor CD94 in CD8+ cells of myeloma patients. *Br J Haematol.* 109: 46-53., 2000
- Biassoni, R., Cantoni C, Falco M, Verdiani S, Bottino C, Vitale M, Conte R, Poggi A, Moretta A, Moretta L.: The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions. *J Exp Med.* 183: 645-50, 1996
- Biassoni, R., Falco M, Cambiaggi A, Costa P, Verdiani S, Pende D, Conte R, Di Donato C, Parham P, Moretta L.: Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones. *J Exp Med.* 182: 605-9, 1995
- Biassoni, R., Pessino A, Malaspina A, Cantoni C, Bottino C, Sivori S, Moretta L, Moretta A.: Role of amino acid position 70 in the binding affinity of p50.1 and p58.1 receptors for HLA-Cw4 molecules. *Eur J Immunol.* 27: 3095-9, 1997
- Bidwell, J., Bignon JD.: DNA-RFLP methods and interpretation scheme for HLA-DR and DQ typing. *Eur J Immunogenet.* 18: 5-22, 1991
- Bignon, J., Fernandez-Vina MA: Protocols of the 12th International Histocompatibility Workshop for typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polymerase

- chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). *HLA 1996 Genetic diversity of HLA functional and medical implication 1*: 584-595, 1997
- Bignon, J., Gagne K: KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Immunol. 17*: in press, 2005
- Biron, C., Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP.: Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.*: 189-220, 1999
- Bishara, A., De Santis D, Witt CC, Brautbar C, Christiansen FT, Or R, Nagler A, Slavin S.: The beneficial role of inhibitory KIR genes of HLA class I NK epitopes in haploidentically mismatched stem cell allografts may be masked by residual donor-alloreactive T cells causing GVHD. *Tissue Antigens 63*: 204-11, 2004
- Blaise, D., Gravis G, Maraninchi D.: Long-term follow-up of T-cell depletion for bone marrow transplantation. *Lancet. 341*: 51-2, 1993
- Bornhauser, M., Schwerdtfeger R, Martin H, Frank KH, Theuser C, Ehninger G.: Role of KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation using unrelated donors. *Blood 103*: 2860-1, 2004
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D. K., Lieto, L., Maasho, K., Pena, J., Solana, R., and Coligan, J. E.: Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol 38*: 637-60, 2002
- Boyington, J., Motyka SA, Schuck P, Brooks AG, Sun PD.: Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature 405*: 537-43, 2000
- Braud, V., Allan DS, O'Callaghan CA, Soderstrom K, D'Andrea A, Ogg GS, Lazetic S, Young NT, Bell JI, Phillips JH, Lanier LL, McMichael AJ.: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature. 19*: 795-9., 1998
- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and McMichael, A. J.: HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature 391*: 795-9, 1998
- Campbell, K., Dessing M, Lopez-Botet M, Cella M, Colonna M.: Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med 184*: 93-100, 1996

- Canavez, F., Young NT, Guethlein LA, Rajalingam R, Khakoo SI, Shum BP, Parham P.: Comparison of chimpanzee and human leukocyte Ig-like receptor genes reveals framework and rapidly evolving genes. *J Immunol* 167: 5786-94, 2001
- Cantoni, C., Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, Malaspina A, Parolini S, Moretta L, Moretta A, Biassoni R.: NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med.* 189: 787-96, 1999
- Chan, H. W., Kurago, Z. B., Stewart, C. A., Wilson, M. J., Martin, M. P., Mace, B. E., Carrington, M., Trowsdale, J., and Lutz, C. T.: DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 197: 245-55, 2003
- Chan HW, K. Z., Stewart CA, Wilson MJ, Martin MP, Mace BE, Carrington M, Trowsdale J, Lutz CT.: DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med* 197: 245-55, 2003
- Chklovskaja, E., Nowbakht P, Nissen C, Gratwohl A, Bargetzi M, Wodnar-Filipowicz A.: Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood.* 103: 3860-8, 2004
- Colonna, M., Brooks EG, Falco M, Ferrara GB, Strominger JL.: Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 260: 1121-4, 1993
- Colonna, M., Samaridis J.: Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268: 405-8, 1995
- Cook, M., Milligan DW, Fegan CD, Darbyshire PJ, Mahendra P, Craddock CF, Moss PA, Briggs DC.: The impact of donor KIR and patient HLA-C genotypes on outcome following HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for myeloid leukemia. *Blood* 103: 1521-6, 2004
- Cooper, M., Fehniger TA, Caligiuri MA.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 22: 633-40., 2001
- Cosman, D., Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ.: ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity.* 14: 123-33, 2001

- Crum, K., Logue SE, Curran MD, Middleton D.: Development of a PCR-SSOP approach capable of defining the natural killer cell inhibitory receptor (KIR) gene sequence repertoires. *Tissue Antigens*. 56: 313-26., 2000
- Cudkowicz, G., Bennett M.: Peculiar immunobiology of bone marrow allografts. II. Rejection of parental grafts by resistant F 1 hybrid mice. *J Exp Med*. 134: 1513-28, 1971
- D'Andrea, A., Chang, C., Phillips, J. H., and Lanier, L. L.: Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles. *J Exp Med* 184: 789-94, 1996
- Daniels, B., Karlhofer FM, Seaman WE, Yokoyama WM.: A natural killer cell receptor specific for a major histocompatibility complex class I molecule. *J Exp Med* 180: 687-92, 1994
- Davies, S., Kollman C, Anasetti C, Antin JH, Gajewski J, Casper JT, Nademanee A, Noreen H, King R, Confer D, Kernan NA.: Engraftment and survival after unrelated-donor bone marrow transplantation: a report from the national marrow donor program. *Blood* 96: 4096-102, 2000
- Davies, S., Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR.: Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 100: 3825-7., 2002
- Delves, P., Roitt IM.: The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 343: 37-49, 2000
- Dohring, C., Scheidegger D, Samaridis J, Cella M, Colonna M.: A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol*. 156: 3098-101, 1996
- Dolstra, H., Fredrix H, van der Meer A, de Witte T, Figdor C, van de Wiel-van Kemenade E.: TCR gamma delta cytotoxic T lymphocytes expressing the killer cell-inhibitory receptor p58.2 (CD158b) selectively lyse acute myeloid leukemia cells. *Bone Marrow Transplant*. 27: 1087-93, 2001
- Durum, S., Lee CK, Geiman TM, Murphy WJ, Muegge K.: CD16 cross-linking blocks rearrangement of the TCR beta locus and development of alpha beta T cells and induces development of NK cells from thymic progenitors. *J Immunol*. 161: 3325-9, 1998
- Eyrich, M., Leiler C, Lang P, Schilbach K, Schumm M, Bader P, Greil J, Klingebiel T, Handgretinger R, Niethammer D, Schlegel PG.: A prospective comparison of immune reconstitution in pediatric recipients of positively selected CD34+ peripheral blood

- stem cells from unrelated donors vs recipients of unmanipulated bone marrow from related donors. *Bone Marrow Transplant.* 32: 379-90, 2003
- Fan, Q., Mosyak L, Winter CC, Wagtmann N, Long EO, Wiley DC.: Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 389: 96-100, 1997
- Fehniger, T., Carson WE, Mrozek E, Caligiuri MA.: Stem cell factor enhances interleukin-2-mediated expansion of murine natural killer cells in vivo. *Blood.* 90: 3647-53, 1997
- Ferlazzo, G., Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, Bougras G, Muller WA, Moretta L, Munz C.: Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 16606-11, 2004
- Flomenberg, N., Baxter-Lowe LA, Confer D, Fernandez-Vina M, Filipovich A, Horowitz M, Hurley C, Kollman C, Anasetti C, Noreen H, Begovich A, Hildebrand W, Petersdorf E, Schmeckpeper B, Setterholm M, Trachtenberg E, Williams T, Yunis E, Weisdorf D.: Impact of HLA class I and class II high-resolution matching on outcomes of unrelated donor bone marrow transplantation: HLA-C mismatching is associated with a strong adverse effect on transplantation outcome. *Blood* 104: 1923-30, 2004
- Friedman, T., Varadi G, Hopely DD, Filicko J, Wagner J, Ferber A, Martinez J, Brunner J, Grosso D, McGuire L, Korngold R, Flomenberg N.: Nonmyeloablative conditioning allows for more rapid T-cell repertoire reconstitution following allogeneic matched unrelated bone marrow transplantation compared to myeloablative approaches. *Biol Blood Marrow Transplant.* 7: 656-64, 2001
- Gagne, K., Brizard G, Gueglio B, Milpied N, Herry P, Bonneville F, Cheneau ML, Schleinitz N, Cesbron A, Folllea G, Harrousseau JL, Bignon JD.: Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol* 63: 271-80, 2002
- Gallardo, D., Arostegui JI, Balas A, Torres A, Caballero D, Carreras E, Brunet S, Jimenez A, Mataix R, Serrano D, Vallejo C, Sanz G, Solano C, Rodriguez-Luaces M, Marin J, Baro J, Sanz C, Roman J, Gonzalez M, Martorell J, Sierra J, Martin C, de la Camara R, Granena A; GvHD Subcommittee of the Grupo Espanol de Trasplante Hemapoyetico (GETH). Disparity for the minor histocompatibility antigen HA-1 is associated with an increased risk of acute graft-versus-host disease (GvHD) but it does not affect chronic GvHD incidence, disease-free survival or overall survival after

- allogeneic human leucocyte antigen-identical sibling donor transplantation. *Br J Haematol.* 114: 931-6, 2001
- Garcia, C., Robinson J, Guethlein LA, Parham P, Madrigal JA, Marsh SG.: Human KIR sequences 2003. *Immunogenetics.* Jun 28, 2003
- Gardiner, C., Guethlein LA, Shilling HG, Pando M, Carr WH, Rajalingam R, Vilches C, Parham P.: Different NK cell surface phenotypes defined by the DX9 antibody are due to KIR3DL1 gene polymorphism. *J Immunol.* 166(5): 2992-3001., 2001
- Giebel, S., Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J.: Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood.* 102: 814-9., 2003
- Goldman, J.: Peripheral blood stem cells for allografting. *Blood.* 85: 1413-5, 1995
- Gomez-Lozano, N., Gardiner, C. M., Parham, P., and Vilches, C.: Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics* 54: 314-9, 2002
- Gomez-Lozano, N., Gardiner CM, Parham P, Vilches C.: Some human KIR haplotypes contain two KIR2DL5 genes: KIR2DL5A and KIR2DL5B. *Immunogenetics.* 54: 314-9, 2002
- Goodridge, J., Witt CS, Christiansen FT, Warren HS.: KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells. *J Immunol.* 171(4): 1768-74., 2003
- Goulmy, E.: Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev.* 157: 125-40, 1997a
- Goulmy, E.: Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification. *Hum Immunol.* 54: 8-14, 1997b
- Goulmy, E., Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ.: Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 334: 281-5, 1996
- Grau, R., Lang, K. S., Wernet, D., Lang, P., Niethammer, D., Pusch, C. M., and Handgretinger, R.: Cytotoxic activity of natural killer cells lacking killer-inhibitory receptors for self-HLA class I molecules against autologous hematopoietic stem cells in healthy individuals. *Exp Mol Pathol* 76: 90-8, 2004

- Grundschober, C., Rufer N, Sanchez-Mazas A, Madrigal A, Jeannet M, Roosnek E, Tiercy JM.: Molecular characterization of HLA-C incompatibilities in HLA-ABDR-matched unrelated bone marrow donor-recipient pairs. Sequence of two new Cw alleles (Cw*02023 and Cw*0707) and recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Tissue Antigens*. 49: 612-23, 1997
- Gumperz, J., Litwin V, Phillips JH, Lanier LL, Parham P.: The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*. 181: 1133-44, 1995
- Halary, F., Peyrat MA, Champagne E, Lopez-Botet M, Moretta A, Moretta L, Vie H, Fournie JJ, Bonneville M.: Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol*. 27: 2812-21, 1997
- Handgretinger, R., Lang P, Schumm M, Pfeiffer M, Gottschling S, Demirdelen B, Bader P, Kuci S, Klingebiel T, Niethammer D.: Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann N Y Acad Sci*. 938: 340-57, 2001
- Hansasuta, P., Dong T, Thananchai H, Weekes M, Willberg C, Aldemir H, Rowland-Jones S, Braud VM.: Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur J Immunol*. 34: 1673-9, 2004
- Harada, H., Saijo K, Watanabe S, Tsuboi K, Nose T, Ishiwata I, Ohno T.: Selective expansion of human natural killer cells from peripheral blood mononuclear cells by the cell line, HFWT. *Jpn J Cancer Res*. 93: 313-9, 2002
- Harousseau, J.: Stem cell transplantation in multiple myeloma (0, 1, or 2). *Curr Opin Oncol*. 17: 93-8, 2005
- Herberman, R., Ortaldo JR.: Natural killer cells: their roles in defenses against disease. *Science*. 214: 24-30, 1981
- Hershberger, K., Shyam R, Miura A, Letvin NL.: Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys. *J Immunol*. 166: 4380-90, 2001
- Hershberger, K. L., Kurian, J., Korber, B. T., and Letvin, N. L.: Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) of the African-origin *Macaca sabinus* monkey: evidence for recombination events in the evolution of KIR. *Eur J Immunol* 35: 922-35, 2005
- Hoglund, P., Ljunggren HG, Karre K, Jay G.: Role of major histocompatibility complex class-I molecules in tumor rejection. New insights from studies with synthetic peptides and transgenic mice. *Immunol Res*. 9(4): 298-313, 1990

- Horowitz, M., Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*. 75: 555-62, 1990
- Hsu, K., Chida S, Geraghty DE, Dupont B.: The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*. 190: 40-52, 2002
- Hsu, K., Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B.: Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation for acute myelogenous leukemia (AML) predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood in press*, 2005
- Husain, Z., Alper CA, Yunis EJ, Dubey DP.: Complex expression of natural killer receptor genes in single natural killer cells. *Immunology* 106: 373-80, 2002
- Imai, C., Iwamoto S, Campana D.: Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*. 106: 376-83, 2005
- Jiang, K., Zhu, F. M., Lv, Q. F., and Yan, L. X.: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in the Chinese Han population. *Tissue Antigens* 65: 556-63, 2005
- Karlhofer, F., Ribaldo RK, Yokoyama WM.: MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358: 66-70, 1992
- Karre, K.: Immunology. A perfect mismatch. *Science* 295: 2029-31, 2002
- 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.: MHC class I-independent recognition of NK-activating receptor KIR2DS4. *J Immunol* 173: 1819-25, 2004
- Katz, G., Markel G, Mizrahi S, Arnon TI, Mandelboim O.: Recognition of HLA-Cw4 but not HLA-Cw6 by the NK cell receptor killer cell Ig-like receptor two-domain short tail number 4. *J Immunol*. 166: 7260-7, 2001
- Kennedy, M., Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, Matsuki N, Charrier K, Sedger L, Willis CR, Brasel K, Morrissey PJ, Stocking K, Schuh JC, Joyce S, Peschon JJ.: Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*. 191: 771-80, 2000
- Khakoo, S., Rajalingam R, Shum BP, Weidenbach K, Flodin L, Muir DG, Canavez F, Cooper SL, Valiante NM, Lanier LL, Parham P.: Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans. *Immunity*. 12: 687-98, 2000

- Khakoo, S., Thio CL, Martin MP, Brooks CR, Gao X, Astemborski J, Cheng J, Goedert JJ, Vlahov D, Hilgartner M, Cox S, Little AM, Alexander GJ, Cramp ME, O'Brien SJ, Rosenberg WM, Thomas DL, Carrington M.: HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science*. 305: 872-4, 2004
- Koehl, U., Sorensen J, Esser R, Zimmermann S, Gruttner HP, Tonn T, Seidl C, Seifried E, Klingebiel T, Schwabe D.: IL-2 activated NK cell immunotherapy of three children after haploidentical stem cell transplantation. *Blood Cells Mol Dis*. 33: 261-6, 2004
- Koh, C., Blazar BR, George T, Welniak LA, Capitini CM, Raziuddin A, Murphy WJ, Bennett M.: Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo. *Blood*. 97: 3132-7, 2001
- Koh, C., Raziuddin A, Welniak LA, Blazar BR, Bennett M, Murphy WJ.: NK inhibitory-receptor blockade for purging of leukemia: effects on hematopoietic reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant*. 8: 17-25, 2002
- Kundig, T., Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I.: Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*. 262: 1059-61, 1993
- Lafarge, X., Pitard V, Ravet S, Roumanes D, Halary F, Dromer C, Vivier E, Paul P, Moreau JF, Dechanet-Merville J.: Expression of MHC class I receptors confers functional intraclonal heterogeneity to a reactive expansion of gammadelta T cells. *Eur J Immunol*. 35: 1896-905, 2005
- Lanier, L.: NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 16: 359-93, 1998
- Lanier, L., Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH.: 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(12): 4480-6, 1986
- Lechler, R., Batchelor JR.: Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med*. 156: 1835-41, 1982
- Leung, W., Iyengar R, Triplett B, Turner V, Behm FG, Holladay MS, Houston J, Handgretinger R.: Comparison of killer Ig-like receptor genotyping and phenotyping for selection of allogeneic blood stem cell donors. *J Immunol*. 174: 6540-5, 2005
- Leung, W., Iyengar R, Turner V, Lang P, Bader P, Conn P, Niethammer D, Handgretinger R.: Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol*. 172: 644-50., 2004
- Lila, N., Carpentier A, Amrein C, Khalil-Daher I, Dausset J, Carosella ED.: Implication of HLA-G molecule in heart-graft acceptance. *Lancet*. 355: 2138, 2000

- Litwin, V., Gumperz J, Parham P, Phillips JH, Lanier LL.: NKB1: a natural killer cell receptor involved in the recognition of polymorphic HLA-B molecules. *J Exp Med.* 180: 537-43, 1994
- Liu, C., Perussia B, Young JD.: The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today.* 21: 113-6, 2000
- Long, E.: Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol.* 17: 875-904, 1999
- Long, E., Colonna M, Lanier LL.: Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature. *Immunol Today.* 17: 100, 1996
- Long, E. O., Barber, D. F., Burshtyn, D. N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C. C., Wagtmann, N., and Watzl, C.: Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev* 181: 223-33, 2001
- Maraninchi, D., Gluckman E, Blaise D, Guyotat D, Rio B, Pico JL, Leblond V, Michallet M, Dreyfus F, Ifrah N, et al.: Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet.* 2: 175-8, 1987
- Marmont, A., Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA, et al.: T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood.* 78: 2120-30, 1991
- Marsh, G.: Nomenclature for factors of the HLA system, update December 2004. *Int J Immunogenet.* 32: 163-4, 2005
- Marsh, S., Parham P, Dupont B, Geraghty DE, Trowsdale J, Middleton D, Vilches C, Carrington M, Witt C, Guethlein LA, Shilling H, Garcia CA, Hsu KC, Wain H.: Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol.* 64: 648-54., 2003
- Martin, A., Freitas EM, Witt CS, Christiansen FT.: The genomic organization and evolution of the natural killer immunoglobulin-like receptor (KIR) gene cluster. *Immunogenetics.* 51: 268-80., 2000
- Martin, A. M., Kulski, J. K., Gaudieri, S., Witt, C. S., Freitas, E. M., Trowsdale, J., and Christiansen, F. T.: Comparative genomic analysis, diversity and evolution of two KIR haplotypes A and B. *Gene* 335: 121-31, 2004
- Mason, L., Gosselin P, Anderson SK, Fogler WE, Ortaldo JR, McVicar DW.: Differential tyrosine phosphorylation of inhibitory versus activating Ly-49 receptor proteins and their recruitment of SHP-1 phosphatase. *J Immunol.* 159: 4187-96, 1997

- Mielcarek, M., Sandmaier BM, Maloney DG, Maris M, McSweeney PA, Woolfrey A, Chauncey T, Feinstein L, Niederwieser D, Blume KG, Forman S, Torok-Storb B, Storb R.: Nonmyeloablative hematopoietic cell transplantation: status quo and future perspectives. *J Clin Immunol.* 22: 70-4, 2002
- Miller, J., Oelkers S, Verfaillie C, McGlave P.: Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood.* 80: 2221-9, 1992
- Miller, J., Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB.: Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 105: 3051-7, 2005
- Mingari, M., Schiavetti F, Ponte M, Vitale C, Maggi E, Romagnani S, Demarest J, Pantaleo G, Fauci AS, Moretta L.: Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 12433-8, 1996
- Mingari, M., Vitale C, Cambiaggi A, Schiavetti F, Melioli G, Ferrini S, Poggi A.: Cytolytic T lymphocytes displaying natural killer (NK)-like activity: expression of NK-related functional receptors for HLA class I molecules (p58 and CD94) and inhibitory effect on the TCR-mediated target cell lysis or lymphokine production. *Int Immunol.* 7: 697-703, 1995
- Mohty, M., Gaugler B, Faucher C, Sainy D, Lafage-Pochitaloff M, Vey N, Bouabdallah R, Arnoulet C, Gastaut JA, Viret F, Wolfers J, Maraninchi D, Blaise D, Olive D.: Recovery of lymphocyte and dendritic cell subsets following reduced intensity allogeneic bone marrow transplantation. *Hematology.* 7: 157-64, 2002
- Morecki, S., Gelfand Y, Nagler A, Or R, Naparstek E, Varadi G, Engelhard D, Akerstein A, Slavin S.: Immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation in recipients conditioned by low intensity vs myeloablative regimen. *Bone Marrow Transplant.* 28: 243-9, 2001
- Moretta, A., Biassoni R, Bottino C, Pende D, Vitale M, Poggi A, Mingari MC, Moretta L.: Major histocompatibility complex class I-specific receptors on human natural killer and T lymphocytes. *Immunol Rev.* 155: 105-17, 1997
- Moretta, A., Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L.: Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 19: 197-223, 2001

- Moretta, A., Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Augugliaro R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L.: P58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J Exp Med.* 178: 597-604, 1993
- Murphy, W., Keller JR, Harrison CL, Young HA, Longo DL.: Interleukin-2-activated natural killer cells can support hematopoiesis in vitro and promote marrow engraftment in vivo. *Blood.* 80: 670-7, 1992
- Murphy, W., Longo DL.: NK Cells in the Regulation of Hematopoiesis. *Methods.* 9: 344-51, 1996
- Murphy, W., Longo DL.: The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Immunol Rev.* 157: 167-76., 1997
- Murphy, W., Reynolds CW, Tiberghien P, Longo DL.: Natural killer cells and bone marrow transplantation. *J Natl Cancer Inst.* 85: 1475-82, 1993
- Namekawa, T., Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ.: Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 165: 1138-45, 2000
- Nguyen, S., Dhedin, N., Vernant, J. P., Kuentz, M., Al Jijakli, A., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., Boudifa, A., Debre, P., and Vieillard, V.: NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 105: 4135-42, 2005
- Niokou, D., Spyropoulou-Vlachou M, Darlamitsou A, Stavropoulos-Giokas C.: Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors in the Greek population. *Hum Immunol.* 64: 1167-76, 2003
- Norman, P., Carrington CV, Byng M, Maxwell LD, Curran MD, Stephens HA, Chandanayingyong D, Verity DH, Hameed K, Ramdath DD, Vaughan RW.: Natural killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations. *Genes Immun.* 3: 86-95, 2002
- Norman, P., Stephens HA, Verity DH, Chandanayingyong D, Vaughan RW.: Distribution of natural killer cell immunoglobulin-like receptor sequences in three ethnic groups. *Immunogenetics.* 52: 195-205, 2001
- Olerup, O., Zetterquist H.: HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical

- practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*. 39: 225-35, 1992
- Ottinger, H., Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H.: Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*. 88: 2775-9, 1996
- Parrish-Novak, J., Dillon SR, Nelson A, Hammond A, Sprecher C, Gross JA, Johnston J, Madden K, Xu W, West J, Schrader S, Burkhead S, Heipel M, Brandt C, Kuijper JL, Kramer J, Conklin D, Presnell SR, Berry J, Shiota F, Bort S, Hambly K, Mudri S, Clegg C, Moore M, Grant FJ, Lofton-Day C, Gilbert T, Rayond F, Ching A, Yao L, Smith D, Webster P, Whitmore T, Maurer M, Kaushansky K, Holly RD, Foster D.: Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 408: 57-63, 2000
- Passweg, J., Tichelli A, Meyer-Monard S, Heim D, Stern M, Kuhne T, Favre G, Gratwohl A.: Purified donor NK-lymphocyte infusion to consolidate engraftment after haploidentical stem cell transplantation. *Leukemia*. 18: 1835-8, 2004
- Perreault, C., Pelletier M, Belanger R, Boileau J, Bonny Y, David M, Gyger M, Landry D, Montplaisir S.: Persistence of host Langerhans cells following allogeneic bone marrow transplantation: possible relationship with acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 60: 253-60, 1985
- Perussia, B., Ramoni C, Anegon I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G.: Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 6: 171-88, 1987
- Petersdorf, E., Anasetti C, Martin PJ, Hansen JA.: Tissue typing in support of unrelated hematopoietic cell transplantation. *Tissue Antigens*. 61: 1-11., 2003
- Petersdorf, E., Gooley T, Malkki M, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Smith A, Mickelson E, Hansen JA.: The biological significance of HLA-DP gene variation in haematopoietic cell transplantation. *Br J Haematol*. 112: 988-94., 2001
- Petersdorf, E., Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA.: Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood*. 92: 3515-20, 1998
- Petersen, S., Ryder LP, Bjork P, Madsen HO, Heilmann C, Jacobsen N, Sengelov H, Vindelov LL.: A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following

- conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant.* 32: 65-72, 2003
- Phillips, J., Lanier LL.: A model for the differentiation of human natural killer cells. Studies on the in vitro activation of Leu-11+ granular lymphocytes with a natural killer-sensitive tumor cell, K562. *J Exp Med.* 161: 1464-82, 1985
- Piccioli, D., Sbrana S, Melandri E, Valiante NM.: Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med.* 195: 335-41, 2002
- Porgador, A., Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL.: Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 13140-5, 1997
- Rajagopalan, S., Long E. O.: A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189: 1093-100, 1999
- Rajagopalan, S., Long E. O.: Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease. *J Exp Med* 201: 1025-9, 2005
- Rajalingam, R., Krausa P, Shilling HG, Stein JB, Balamurugan A, McGinnis MD, Cheng NW, Mehra NK, Parham P.: Distinctive KIR and HLA diversity in a panel of north Indian Hindus. *Immunogenetics.* 53: 1009-19, 2002
- Raulet, D., Vance RE, McMahon CW.: Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol.* 19: 291-330, 2001
- Robertson, M., Cameron C, Lazo S, Cochran KJ, Voss SD, Ritz J.: Costimulation of human natural killer cell proliferation: role of accessory cytokines and cell contact-dependent signals. *Nat Immun.* 15: 213-26, 1996-97
- Robertson, M., Ritz J.: Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 15: 2421-38, 1990
- Roux, E., Dumont-Girard F, Starobinski M, Siegrist CA, Helg C, Chapuis B, Roosnek E.: Recovery of immune reactivity after T-cell-depleted bone marrow transplantation depends on thymic activity. *Blood.* 96: 2299-303, 2000
- Rozemuller, E., Tilanus MG.: A computerized method to predict the discriminatory properties for class II sequencing based typing. *Hum Immunol.* 46: 27-34, 1996
- Ruggeri, L., Capanni M, Martelli MF, Velardi A.: Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. *Curr Opin Hematol.* 8: 355-9., 2001
- Ruggeri, L., Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A.: Effectiveness of donor natural killer

- cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295: 2097-100., 2002
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F., and Velardi, A.: Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94: 333-9, 1999
- Ryan, J., Seaman WE.: Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev*. 155: 79-89, 1997
- Saito, T., Kanda Y, Nakai K, Kim SW, Arima F, Kami M, Tanosaki R, Tobinai K, Wakasugi H, Heike Y, Mineishi S, Takaue Y.: Immune reconstitution following reduced-intensity transplantation with cladribine, busulfan, and antithymocyte globulin: serial comparison with conventional myeloablative transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 32: 601-8, 2003
- Santourlidis, S., Trompeter HI, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M.: Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol*. 169: 4253-61, 2002
- Saulquin, X., Gastinel LN, Vivier E.: Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* 197: 933-8, 2003
- Schaffer, M., Aldener-Cannava, A., Remberger, M., Ringden, O., and Olerup, O.: Roles of HLA-B, HLA-C and HLA-DPA1 incompatibilities in the outcome of unrelated stem-cell transplantation. *Tissue Antigens* 62: 243-50, 2003
- Schaffer, M., Malmberg KJ, Ringden O, Ljunggren HG, Remberger M.: Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 78: 1081-5, 2004
- Selvakumar, A., Steffens, U. and Dupont, B.: Polymorphism and domain variability of human killer cell inhibitory receptors. *Immunol Rev* 155: 183-96, 1997
- Shenoy, S., Mohanakumar T, Todd G, Westhoff W, Dunnigan K, Adkins DR, Brown RA, DiPersio JF.: Immune reconstitution following allogeneic peripheral blood stem cell transplants. *Bone Marrow Transplant*. 23: 335-46, 1999
- Shilling, H., McQueen KL, Cheng NW, Shizuru JA, Negrin RS, Parham P.: Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 101: 3730-40, 2003
- Shlomchik, W., Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG.: Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*. 285: 412-5, 1999

- Siefer, A., Longo DL, Harrison CL, Reynolds CW, Murphy WJ.: Activated natural killer cells and interleukin-2 promote granulocytic and megakaryocytic reconstitution after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *Blood*. 82: 2577-84, 1993
- Smith, H., Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH, Yokoyama WM.: Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 8826-31, 2002
- Spits, H., Lanier LL, Phillips JH.: Development of human T and natural killer cells. *Blood*. 85: 2654-70, 1995
- Steffens, U., Vyas, Y., Dupont, B., and Selvakumar, A.: Nucleotide and amino acid sequence alignment for human killer cell inhibitory receptors (KIR), 1998. *Tissue Antigens* 51: 398-413, 1998
- Steinle, A., Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T.: Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*. 53: 279-87, 2001
- Storek, J., Dawson MA, Storer B, Stevens-Ayers T, Maloney DG, Marr KA, Witherspoon RP, Bensinger W, Flowers ME, Martin P, Storb R, Appelbaum FR, Boeckh M.: Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood*. 97: 3380-9, 2001
- Sullivan, S.: Graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*: 339-62, 1994
- Suzue, K., Reinherz EL, Koyasu S.: Critical role of NK but not NKT cells in acute rejection of parental bone marrow cells in F1 hybrid mice. *Eur J Immunol*. 31: 3147-52, 2001
- Sykes, M., Szot GL, Swenson KA, Pearson DA.: Induction of high levels of allogeneic hematopoietic reconstitution and donor-specific tolerance without myelosuppressive conditioning. *Nat Med*. 7: 783-7, 1997
- Takeda, K., Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K.: Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med*. 7: 94-100, 2001
- Talmadge, J., Reed E, Ino K, Kessinger A, Kuszynski C, Heimann D, Varney M, Jackson J, Vose JM, Bierman PJ.: Rapid immunologic reconstitution following transplantation with mobilized peripheral blood stem cells as compared to bone marrow. *Bone Marrow Transplant*. 19: 161-72, 1997

- Tanaka, J., Mori A, Ohta S, Yamamoto Y, Kobayashi S, Hashino S, Kobayashi M, Asaka M, Imamura M.: Expression of HLA-C-specific natural killer cell receptors (CD158a and CD158b) on peripheral blood mononuclear cells after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 108: 778-83., 2000
- Terasaki, P., McClelland JD.: Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 204: 998-1000, 1964
- Thomas, E.: The role of bone marrow transplantation for eradication of malignant disease. *Cancer* 10: 1963-9, 1969
- Thomson, B., Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahmi Z, Smith FO.: Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood.* 96: 2703-11, 2000
- Tiercy, J., Passweg J, van Biezen A, Zander A, Kroger N, Gratwohl A, Chapuis B, Helg C, Brinch L, Cornelissen J, Oudshoorn M, Ruutu T, Volin L, Niederwieser D, Roosnek E; Chronic Leukemia Working Party of the European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT). Isolated HLA-C mismatches in unrelated donor transplantation for CML. *Bone Marrow Transplant.* 34: 249-55., 2004
- Toneva, M., Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, Vu-Trien A, Michaylova A, Naumova E, McCluskey J, Charron D.: Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue Antigens* 57: 358-62., 2001
- Torkar, M., Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ.: Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur J Immunol.* 28: 3959-67, 1998
- Trinchieri, G.: Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 47: 187-376., 1989
- Trompeter, H. I., Gomez-Lozano, N., Santourlidis, S., Eisermann, B., Wernet, P., Vilches, C., and Uhrberg, M.: Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *J Immunol* 174: 4135-43, 2005
- Trowsdale: Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity.* 15: 363-74, 2001a
- Trowsdale, J., Barten R, Haude A, Stewart CA, Beck S, Wilson MJ.: The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol Rev.* 181: 20-38, 2001b

- Uhrberg, M., Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyan D, Lanier LL, Parham P: Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 7: 753-63., 1997
- Uhrberg, M., Valiante, N. M., Young, N. T., Lanier, L. L., Phillips, J. H., and Parham, P.: The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94:NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns. *J Immunol* 166: 3923-32, 2001
- Vales-Gomez, M., Erskine RA, Deacon MP, Strominger JL, Reyburn HT.: The role of zinc in the binding of killer cell Ig-like receptors to class I MHC proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 1734-9, 2001
- Vales-Gomez, M., Reyburn HT, Erskine RA, Strominger J.: Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14326-31, 1998
- van Bergen, J., Thompson, A., van der Slik, A., Ottenhoff, T. H., Gussekloo, J., and Koning, F.: Phenotypic and functional characterization of CD4 T cells expressing killer Ig-like receptors. *J Immunol* 173: 6719-26, 2004
- van den Broeke, L., Daschbach E, Thomas EK, Andringa G, Berzofsky JA.: Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J Immunol*. 171: 5842-52, 2003
- van der Meer, A., Allebes, W. A., Paardekooper, J., Ruiter, J., and Joosten, I.: HLA-C mismatches induce strong cytotoxic T-cell reactivity in the presence of an additional DRB/DQB mismatch and affect NK cell-mediated alloreactivity. *Transplantation* 72: 923-9, 2001
- van der Slik, A. R., Koeleman, B. P., Verduijn, W., Bruining, G. J., Roep, B. O., and Giphart, M. J.: KIR in type 1 diabetes: disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA-matched control subjects. *Diabetes* 52: 2639-42, 2003
- Vilches, C., Gardiner CM, Parham P.: Gene structure and promoter variation of expressed and nonexpressed variants of the KIR2DL5 gene. *J Immunol*. 165: 6416-21, 2000a
- Vilches, C., Pando, M. J., Rajalingam, R., Gardiner, C. M., and Parham, P.: Discovery of two novel variants of KIR2DS5 reveals this gene to be a common component of human KIR 'B' haplotypes. *Tissue Antigens* 56: 453-6, 2000

- Vilches, C., Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P.: KIR2DL5, a novel killer-cell receptor with a D0-D2 configuration of Ig-like domains. *J Immunol.* 164: 5797-804, 2000b
- Vitale, C., Chiossone L, Morreale G, Lanino E, Cottalasso F, Moretti S, Dini G, Moretta L, Mingari MC.: Human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation: analysis of the surface expression and function of activating NK receptors. *Mol Immunol.* 42: 405-11., 2005
- Vitale, C., Pitto A, Benvenuto F, Ponte M, Bellomo R, Frassoni F, Mingari MC, Bacigalupo A, Moretta L.: Phenotypic and functional analysis of the HLA-class I-specific inhibitory receptors of natural killer cells isolated from peripheral blood of patients undergoing bone marrow transplantation from matched unrelated donors. *Hematol J.* 1: 136-44, 2000
- Vivier, E., Daeron M.: Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs. *Immunol Today.* 18: 286-91, 1997
- Wagner, J., Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E.: Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet.* 346: 214-9, 1995
- Warren, H., Skipsey LJ.: Loss of activation-induced CD45RO with maintenance of CD45RA expression during prolonged culture of T cells and NK cells. *Immunology.* 74: 78-85, 1991
- Welch, A., Kasahara M, Spain LM.: Identification of the mouse killer immunoglobulin-like receptor-like (Kirl) gene family mapping to chromosome X. *Immunogenetics.* 54: 782-90, 2003
- Whang, D., Park H, Yoon JA, Park MH.: Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families. *Hum Immunol.* 66: 146-54, 2005
- Whiteside, T., Vujanovic NL, Herberman RB.: Natural killer cells and tumor therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 230: 221-44, 1998
- Willcox, B., Thomas LM, Bjorkman PJ.: Crystal structure of HLA-A2 bound to LIR-1, a host and viral major histocompatibility complex receptor. *Nat Immunol.* 4: 913-9, 2003
- Williams, N., Klem J, Puzanov IJ, Sivakumar PV, Bennett M, Kumar V.: Differentiation of NK1.1+, Ly49+ NK cells from flt3+ multipotent marrow progenitor cells. *J Immunol.* 163: 2648-56, 1999

- Wilson, M., Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J.: Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25: 4778-83., 2000
- Wilson, M., Torkar M, Trowsdale J.: Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 49: 574-9, 1997
- Winter, C., Gumperz JE, Parham P, Long EO, Wagtmann N.: Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 161: 571-7, 1998
- Witt, C., Dewing C, Sayer DC, Uhrberg M, Parham P, Christiansen FT.: Population frequencies and putative haplotypes of the killer cell immunoglobulin-like receptor sequences and evidence for recombination. *Transplantation*. 68: 1784-9., 1999
- Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Guethlein, L. A., Rajalingam, R., Shilling, H. G., and Parham, P.: Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression. *Immunogenetics* 54: 543-50, 2002
- Yen, J., Moore BE, Nakajima T, Scholl D, Schaid DJ, Weyand CM, Goronzy JJ.: Major histocompatibility complex class I-recognizing receptors are disease risk genes in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 193: 1159-67, 2001
- Yokoyama, W., Daniels BF, Seaman WE, Hunziker R, Margulies DH, Smith HR.: A family of murine NK cell receptors specific for target cell MHC class I molecules. *Semin Immunol*. 7: 89-101, 1995
- Zaucha, J., Gooley T, Bensinger WI, Heimfeld S, Chauncey TR, Zaucha R, Martin PJ, Flowers ME, Storek J, Georges G, Storb R, Torok-Storb B.: CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood*. 98: 3221-7, 2001
- Zeis, M., Uharek L, Glass B, Gaska T, Gassmann W, Mueller-Ruchholtz W.: Induction of graft-versus-leukemia (GVL) activity in murine leukemia models after IL-2 pretreatment of syngeneic and allogeneic bone marrow grafts. *Bone Marrow Transplant*. 14: 711-5, 1994
- Zitvogel, L.: Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med*. 195: F9-14, 2002

RESUME

Contribution à l'étude de l'alloréactivité NK en greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) : implication des récepteurs KIR.

Mots clés : Alloréactivité , NK, KIR, greffe allogénique de CSH

La greffe allogénique de CSH représente un modèle d'alloréactivité cellulaire au cours de la reconstitution hématopoïétique. Les conséquences immunologiques induites peuvent être délétères (rejet et GvHD) ou bénéfique (GvL). Les molécules HLA impliquées dans ces réactions représentent par ailleurs les ligands spécifiques de récepteurs exprimés à la surface des cellules NK de l'immunité innée. Parmi ces récepteurs, les marqueurs KIR, très polymorphes, sont exprimés de manière clonale et contrôlent la réactivité allogénique NK.

Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'alloréactivité NK et à la contribution des interactions KIR/HLA en greffe allogénique de CSH. Les résultats ont révélé des combinaisons génotypes KIR donneur/receveur « à risques » sur la GvHD. Une régulation transcriptionnelle des gènes KIR en reconstitution post-greffe de CSH apparaît déterminante sur la réaction GvH. Enfin, les mécanismes en jeu dans l'alloréactivité NK semblent impliquer l'ensemble des récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK, dans un contexte HLA déterminé.

Contribution to the study of NK alloreactivity : KIR receptor implication in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Key words : Alloreactivity, NK, KIR, allogeneic HSCT

Allogeneic HSCT is a good way to study cellular alloreactivity during haematopoietic reconstitution. Implied immunologic consequences can be either deleterious (reject or GvHD) or beneficial (GvL). HLA molecules are involved in those reactions and moreover, represent the specific ligands of KIR receptors expressed on NK cell in the innate immune system. Among these receptors, polymorphic KIR markers are clonally distributed to control NK allogeneic reactivity.

In the laboratory, we focused on NK alloreactivity and KIR/HLA interactions in allogeneic HSCT. Results showed that some KIR genotype combinations between donor and recipient were at risk for GvH reaction. Moreover, KIR gene transcriptional regulation during post-HSCT period appeared to be relevant on GvH reaction. Last, all activating and inhibiting NK expressed receptors seemed to be involved in alloreactivity mechanisms, through a HLA-modulated repertoire.

DENIS Laure
17 rue Crébillon
44000 Nantes