

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES

ECOLE DOCTORALE N° 605, *Biologie Santé*

Discipline : *Biologie, Médecine, Santé*

Spécialité : « *Immunologie* »

Par

« **Léa DUBREUIL** »

« **Contribution des marqueurs polymorphes KIR et HLA sur le répertoire des cellules Natural Killer en greffes de cellules souches hématopoïétiques haplo-identiques** »

Thèse présentée et soutenue à « Nantes », le « 16 décembre 2021 »

Unité de recherche : Equipe 1 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), INSERM UMR1232, CNRS ERL, Laboratoire de recherche de l'EFS Centre-Pays de la Loire

## Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Julie Di Cristofaro CR, PhD, HDR, Etablissement Français du Sang, Marseille  
Dr. Jacques Zimmer DR, MD PhD, Luxembourg Institute of Health, Esch-sur-Alzette

## Composition du Jury :

Président :	Pr. Thierry Lamy de la Chapelle	PU-PH, CHU de Rennes
Examineurs :	Dr. Florent Malard	MCU-PH, PhD, MD et Hôpital Saint Antoine, Paris
Dir. de thèse :	Dr. Katia Gagne	Maitre de recherche, EFS Centre-Pays de la Loire
Co-dir. de thèse :	Dr. Christelle Retière	Directeur de recherche, EFS Centre-Pays de la Loire

# Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement ma directrice de Thèse le Docteur Katia Gagne et ma co-directrice de Thèse le Docteur Christelle Retière pour m'avoir accueillie dans leur équipe de recherche, pour leur confiance, leur soutien, leur disponibilité ainsi que pour leur aide et leurs conseils reçus depuis mon premier stage en Master 1. Je souhaite également les remercier pour la relecture de ce manuscrit et leurs précieux conseils ayant permis de m'améliorer dans la rédaction. Je suis ravie d'avoir travaillé en leur compagnie, car en plus de leur appui scientifique, elles ont toujours été présentes avec bonne humeur pour me soutenir et me conseiller au cours de ces 4 années. Je les remercie pour tous les bons moments passés en leur compagnie.

Je souhaiterais aussi remercier les techniciennes du laboratoire Gaëlle David, Nolwenn Legrand, et Catherine Willem de m'avoir accueillie chaleureusement et formée aux pratiques du laboratoire. Je les remercie également pour tous les conseils, le soutien, la bonne humeur qu'elles ont pu m'apporter ainsi que tous les bons moments passés au cours de ces 4 années.

J'adresse mes sincères remerciements :

- ✓ Au Docteur Frédéric Bigey, Directeur de l'Etablissement Français du Sang Centre-Pays de la Loire et à Monsieur Emmanuel Rivery, Directeur de l'EFS Nantes site Hôtel-Dieu, pour l'accueil au sein de l'EFS et la Région Pays de la Loire pour le co-financement de Thèse dont j'ai bénéficié pour ce travail.
- ✓ A l'ensemble des membres de mon jury de Thèse à savoir le Docteur Julie Di Cristofaro, le Docteur Jacques Zimmer, le Professeur Thierry Lamy de la Chapelle et le Professeur Florent Malard pour avoir accepté de faire partie de mon jury de Thèse.
- ✓ Aux Docteurs Nicolas Dulphy et Nicolas Degauque pour leurs échanges et conseils donnés durant mes comités de Thèse.

- ✓ Aux étudiants du laboratoire de recherche, le Docteur Dhon Roméo Makanga, le Docteur Bercein Maniangou, Francesca Da Rin de Lorenzo et Léa Lemoine pour les bons moments passés ensemble.
- ✓ Aux membres de l'équipe 1 INSERM U1232 du CRCINA et en particulier au Docteur Emmanuel Scotet, pour l'accueil au sein de l'équipe, au Docteur Agnès Quemener pour ses conseils et sa collaboration.
- ✓ Au personnel médical et paramédical du service d'Hématologie clinique du CHU de Nantes et en particulier au Professeur Patrice Chevallier et au Professeur Marie-Christine Béné, pour leur collaboration durant ce projet.
- ✓ A toute l'équipe du laboratoire HLA, du service UPR, aux services des prélèvements de l'EFS site de Nantes ainsi qu'aux équipes de prélèvement de Tours et d'Angers pour leur collaboration dans la constitution de nos cohortes.

Pour finir, j'aimerais remercier mes amis et ma famille notamment, mes parents, mes frères et surtout mes grands-parents qui m'ont toujours soutenue dans cette voie et durant mes 3 années de Thèse. Merci pour leurs encouragements et leur confiance.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBREVIATIONS .....	1
LISTE DES FIGURES.....	2
INTRODUCTION .....	3
I) Immunité innée et adaptative.....	4
1. L'immunité innée .....	4
2. L'immunité adaptative.....	6
2.1. L'immunité adaptative à médiation cellulaire .....	7
2.2. L'immunité adaptative à médiation humorale.....	8
II) Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité.....	10
1. Les gènes et molécules HLA de classe I classiques .....	13
1.1. Localisation des gènes et organisation .....	13
1.2. Polymorphisme allélique des gènes HLA de classe I.....	14
1.3. Historique des typages HLA et détermination des allèles HLA de classe I.....	16
1.4. Expression des molécules HLA de classe I classique .....	18
2. Gènes et molécules HLA de classe I non classiques et apparentés .....	22
2.1. Gène et molécules HLA-E.....	22
2.2. Gène et molécules HLA-F.....	23
2.3. Gène et molécules HLA-G .....	24
2.4. Gènes et molécules MICA, MICB .....	26
III) Les cellules Natural Killer.....	28
1. Caractéristiques générales .....	28
2. Récepteurs des cellules NK.....	29
2.1. Les récepteurs Killer cell Immunoglobulin like Receptor.....	30



2.1.1.	La génétique des récepteurs KIR .....	31
2.1.2.	Génotypes KIR.....	33
2.1.3.	Polymorphisme allélique KIR.....	36
2.1.4.	Expression des récepteurs KIR sur les cellules NK .....	39
2.1.5.	Les ligands des récepteurs KIR.....	42
2.2.	Les récepteurs leucocytaires de type immunoglobuline .....	46
2.3.	Les récepteurs CD94/NKG2.....	47
2.4.	Le récepteur NKG2D .....	47
2.5.	Les récepteurs de cytotoxicité naturelle .....	48
2.6.	Le récepteur CD16 (FcγRIIIa).....	50
2.7.	<i>Autres récepteurs NK</i> .....	51
2.7.1.	Les Toll-Like Receptors (TLR) .....	51
2.7.2.	Le récepteur 2B4.....	51
2.7.3.	Le récepteur DNAM-1 .....	52
2.7.4.	Les récepteurs de costimulation et les molécules d'adhésion .....	53
2.7.5.	Les récepteurs de cytokines .....	53
3.	Le développement des cellules NK.....	54
4.	Éducation fonctionnelle des cellules NK.....	57
IV)	Rôles des cellules NK dans l'immunité.....	62
1.	Les fonctions des cellules NK .....	62
1.1.	Prolifération des cellules NK.....	64
1.2.	Production de cytokines par les cellules NK.....	66
1.3.	Cytotoxicité des cellules NK .....	67
2.	Immunité antivirale des cellules NK .....	68
2.1.	Cytomégalovirus.....	68
2.2.	Virus de l'immunodéficience humaine.....	70

2.3.	Virus de l'hépatite C (VHC) .....	72
3.	Cellules NK et grossesse .....	74
4.	Immunité anti-tumorale .....	76
V)	Greffes de cellules souches hématopoïétiques .....	82
1.	Indications de greffes de CSH .....	83
2.	Protocole des greffes de CSH allogéniques.....	84
2.1.	Critères de sélection des donneurs de CSH .....	84
2.2.	Conditionnements pré-greffe de CSH .....	87
3.	Reconstitution cellulaire post-allogreffes de CSH .....	88
4.	Les réactions allogéniques post-greffes de CSH .....	90
5.	Complications après allogreffes de CSH.....	91
6.	Rôle des cellules NK en greffes de CSH.....	94
VI)	Immunothérapies dans le contexte des leucémies aiguës .....	99
1.	Administration de cytokines pour renforcer l'alloréactivité des cellules NK .....	99
2.	Exploitation de l'ADCC avec les anticorps monoclonaux, les BiKE et les TriKE .....	99
3.	Ciblage des points de contrôle inhibiteurs pour améliorer l'effet GvL .....	100
4.	Transfert adoptif de cellules NK alloréactives .....	102
5.	Transfusion des cellules CAR-NK .....	103
	OBJECTIFS .....	104
	RÉSULTATS .....	108
	ARTICLE N°1: Centromeric KIR AA individuals harbor NK cell features that limit myeloid leukemia relapse after haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation. ....	109
	ARTICLE N°2: The structuration of NK cell repertoire: more complexed than expected.....	133

ARTICLE N°3: Relevance of Polymorphic KIR and HLA Class I Genes in NK-Cell-Based Immunotherapies for Adult Leukemic Patients.....	185
CONCLUSION /DISCUSSION .....	213
BIBLIOGRAPHIE.....	226
ANNEXE .....	263

## LISTE DES ABBREVIATIONS

ABM	Agence de la Biomédecine	DSA	Donor Specific Antibody
Ac	Anticorps	dUCB	double-greffe de sang de cordon
AcM	Anticorps monoclonaux	DVMO	Donneurs Volontaires de Moelle Osseuse
ADCC	cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps		
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	EBMT	Société Européenne des Greffes de Moelle Osseuse
Ag	Antigènes		
ARN	Acide ribonucléique	EVT	Trophoblastes Extravilleux
ATG	anti-thymoglobuline	FLU	Fludarabine
		FNKD	NKD fonctionnel
BCR	Récepteurs des lymphocytes B (B Cell Receptor)	G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
BiKE	bispecific NK cell engager		
BU	bulsufan	GCSH	Greffe De Cellules Souches Hématopoïétiques
CAR	Récepteurs d'Antigène Chimérique	GM-CSH	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
CIBMTR	Centre de recherche international sur la greffe de moelle osseuse	GvH	Greffon contre l'hôte
CILP	Progéniteurs Lymphoïdes Innés Communs	GvHD	Maladie du greffon contre l'hôte
CLP	Progéniteurs Communs Lymphoïdes	GvL	Greffon contre la leucémie
CMV	Cytomégalovirus	GvT	Graft-versus-Tumor
CNI	Inhibiteur de la Calcineurine	HLA	Human Leukocyte Antigen
CNKD	NKD classique	IFN	Interferon
CNV	Copy Number Variation	ILCP	Précurseurs de Cellules Lymphoïdes Innées
CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes		
CSH	Cellules Souches Hématopoïétiques	ILT	Les Récepteurs Inhibiteurs de Type Immunoglobuline
CTL	Lymphocytes T Cytotoxiques		
CY	Cyclophosphamide	ITAM	Immune tyrosine-based activating motif
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern	ITIM	Immune tyrosine-based inhibitory motif
DC	Cellules Dendritiques		
DLI	Infusions de Lymphocytes de Donneurs		

ITSM	Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif	PBMC	cellules mononucléées du sang périphérique
		PCR	réactions en chaîne par polymérase
KIR	Killer cell Immunoglobulin like Receptor	PRR	Pattern Recognition Receptors
LA	leucémie aiguë	RIC	conditionnement à intensité réduite
LAL	leucémies aiguës lymphoïdes	RLR	Retinoic acide-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors
LAM	leucémies aiguës myéloïdes		
LAMP	Lysosomal-Associated Membrane Protein	RSA	Recipient Specific Antibodies
LB	Lymphocytes B	SBT	séquençage biallélique Sanger
LILR	Les récepteurs leucocytaires de type immunoglobuline	SCF	stem cell factor
		SG	survie globale
LRC	Leukocyte Receptor Complex	SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
LT	Lymphocytes T	SLAM	molécule d'activation des lymphocytes de signalisation
LTiP	progéniteurs inducteurs de tissu lymphoïde	SRC	syndrome de libération de cytokines
		SSO	oligonucléotides spécifiques de séquences
MA	myéloablatif		
MAIT	Mucosal-Associated Invariant T cells	SSP	amorces spécifiques de séquences
MO	Moelle Osseuse		
		TAP	Transporter Associated with Antigen Processing
NAHR	recombinaison homologue non allélique		
NCR	récepteurs de cytotoxicité naturelle	TBI	irradiation corporelle totale
NGS	séquençage nouvelle-génération	TCR	Récepteurs des lymphocytes T
NK	Natural Killer	Th	T helper
NKC	Natural Killer Complex	TLR	Toll-Like Receptors
NKD	déficit en cellules NK	TNF	facteurs de nécrose tumorale
NKP	précurseurs des cellules NK	TriKE	trispecific NK cell engager
NKT	Lymphocytes T Natural Killer		
NLR	Nucleotide-binding domain and Leucine-rich repeat-containing Receptors	UCB	Sang de cordon
		VHC	Virus de l'hépatite C
		VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern		

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La réponse immunitaire innée et adaptative. ....	9
Figure 2 : Gènes et molécules HLA.....	12
Figure 3 : Structure des gènes HLA de classe I classiques .....	14
Figure 4 : Expression des molécules HLA de classe I classiques.....	21
Figure 5 : Rôle des molécules HLA de classe I classiques dans l'immunité.....	27
Figure 6 : Principaux récepteurs et ligands des cellules NK.....	30
Figure 7 : Structure des récepteurs KIR.....	31
Figure 8 : Organisation des gènes KIR .....	33
Figure 9 : Haplotypes et motifs KIR .....	35
Figure 10 : Expression clonale des récepteurs KIR sur les cellules NK .....	40
Figure 11 : Expression des allotypes KIR3DL1 sur les cellules NK. ....	41
Figure 12 : Ligands des récepteurs KIR.....	45
Figure 13 : Classification de cellules Lymphoïdes Innées (ILC).....	55
Figure 14 : Développement des cellules NK.....	57
Figure 15 : Modèles d'éducation des cellules NK .....	60
Figure 16 : Activation des cellules NK dans différents contextes .....	63
Figure 17 : Les différents mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour l'immuno-évasion .....	81
Figure 18 : La sélection des donneurs de CSH .....	86
Figure 19 : Modèles d'études KIR/HLA pour la prédiction d'une alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH .....	98
Figure 20 : Ciblage des points de contrôle inhibiteurs des cellules NK.....	101
Figure 21 : Transfert adoptif de cellules NK alloréactives .....	102
Figure 22 : Impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur le répertoire et la fonction des cellules NK KIR2DL <sup>+</sup> .....	112

# **INTRODUCTION**

## **I) Immunité innée et adaptative**

L'immunologie est l'ensemble des mécanismes permettant à un organisme d'assurer son intégrité tissulaire et cellulaire en éliminant des corps étrangers et des agents infectieux auxquels il est exposé. Afin de protéger l'organisme, plusieurs acteurs de l'immunité interviennent tels que le système lymphatique, la barrière tissulaire et cellulaire. Chez l'Homme, deux systèmes collaborent, le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif (Matzinger, 2002).

### **1. L'immunité innée**

L'immunité innée (ou naturelle) est la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes. Elle comprend, la barrière tissulaire, comme la peau et les muqueuses, les protéines comme les facteurs du complément et une barrière cellulaire. La barrière cellulaire est constituée de deux grandes classes de cellules immunitaires comprenant d'une part les cellules phagocytaires comme les DC, les macrophages, les polynucléaires ou les granulocytes et d'autre part, les cellules cytotoxiques comme les cellules Natural Killer (NK), certains granulocytes, les lymphocytes NKT (lymphocytes T Natural Killer) et les lymphocytes T  $\gamma\delta$ . Le rôle de l'immunité innée est d'éliminer rapidement des agents pathogènes par l'action cytotoxique des cellules, du système du complément et par l'activation/amplification de la réaction inflammatoire. Dans le cas où son action serait insuffisante, l'immunité innée va initier une réponse immunitaire adaptative par le biais de Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA). Bien que les cellules immunitaires innées jouent un rôle important, les cellules non immunitaires telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes contribuent également à l'immunité innée en exprimant certains récepteurs permettant la présentation de l'antigène et en sécrétant des cytokines.

L'immunité innée est induite par des signaux de danger endogènes ou exogènes reconnus par des récepteurs appelés PRR (Pattern Recognition Receptors). Les PRR, codés dans la lignée germinale, sont responsables de la détection de micro-organismes exogènes ou endogènes. Ces PRR sont exprimés non seulement au niveau des cellules de l'immunité innée, mais également dans diverses cellules résidentes (Takeuchi and Akira, 2010). Ils reconnaissent les structures conservées parmi les espèces microbiennes,



appelées « motifs moléculaires associés aux agents pathogènes » (PAMP, Pathogen Associated Molecular Pattern). Les PRR sont également responsables de la reconnaissance des molécules endogènes libérées par les cellules endommagées, appelées « motifs moléculaires associés aux dommages » (DAMP, Damage Associated Molecular Pattern). De multiples PRR distincts peuvent être classés tels que les PRR sécrétés, les PRR transmembranaires et les PRR cytosoliques. Les PRR transmembranaires comprennent la famille des récepteurs Toll-like (TLR, Toll-Like Receptors) et des lectines de type C. Les PRR cytosoliques comprennent les récepteurs de type I inductibles par l'acide rétinoïque (RLR, Retinoic acide-inducible gene I (RIG-I)-Like Receptors), le domaine de liaison aux nucléotides et les récepteurs contenant des répétitions riches en leucine (NLR, Nucleotide-binding domain and Leucin-rich repeat-containing Receptors) (Iwasaki and Medzhitov, 2010). À l'exception de certains NLR, la détection des PAMP ou des DAMP par les PRR régule positivement la transcription de gènes impliqués dans les réponses inflammatoires.

L'inflammation est une réponse protectrice du système immunitaire pour assurer l'élimination des pathogènes, accompagnée d'un processus de guérison pour réparer les tissus endommagés (Medzhitov, 2008). La réponse inflammatoire est induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que des interférons (IFN) de type I, des chimiokines, des protéines antimicrobiennes ainsi que des protéines impliquées dans la modulation de la signalisation des PRR. Ces cytokines entraînent la régulation de la mort cellulaire des tissus inflammatoires, favorisent la diapédèse, recrutent les cellules de l'immunité et induisent la production de protéines de phase aiguë. Les cellules NK sont des lymphocytes cytotoxiques de l'immunité innée. Elles expriment un répertoire de récepteurs activateurs et inhibiteurs codés par la lignée germinale, permettant la reconnaissance et l'élimination des cellules infectées ou des cellules tumorales. Les cellules NK produisent également une gamme de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives (Walzer et al., 2005). La production de cytokines par les cellules NK a un impact dans la régulation du cross-talk avec les DC, les macrophages et les neutrophiles conférant aux cellules NK une fonction régulatrice de l'immunité innée et adaptative (Moretta et al., 2005). Les cellules NK exercent donc des fonctions biologiques pouvant être attribuées à l'immunité innée et adaptative (Vivier et al., 2011). De surcroît, il existe plusieurs types de lymphocytes T résidant

dans les tissus non lymphoïdes tels que les NKT, les  $LT\gamma\delta$  et les MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells) (Godfrey et al., 2015). Ces cellules sont définies comme étant des cellules T de type innées. Comme pour les cellules NK, ces cellules T sont à l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative.

## **2. L'immunité adaptative**

L'immunité adaptative est la seconde ligne de défense contre les agents infectieux. Les principaux acteurs de cette immunité sont les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT) conventionnels. Contrairement à l'immunité innée, la réponse adaptative prend plusieurs jours avant de se mettre en place, car les cellules doivent subir une expansion clonale afin de devenir compétentes. Les particularités de l'immunité adaptative sont sa forte spécificité, la reconnaissance d'un large panel d'antigènes ainsi que la mise en place d'une mémoire permettant une réactivité plus rapide lors d'une seconde infection par un même pathogène.

L'immunité adaptative est principalement médiée par les lymphocytes T  $\alpha\beta$  conventionnels et les LB. Ces lymphocytes se développent dans les organes lymphoïdes primaires à savoir le thymus pour les LT et la moelle osseuse (MO) pour les LB. Ensuite, ces lymphocytes vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate, d'où la réponse adaptative va être initiée. Cette réponse est initiée par des signaux du système immunitaire inné mis en place soit directement par les antigènes circulants, soit par les CPA des muqueuses comme les DC ou monocytes/macrophages qui ont migré dans les organes lymphoïdes secondaires (Bonilla and Oettgen, 2010). La reconnaissance des antigènes par les LT et LB se fait à travers de récepteurs d'antigènes non codés par la lignée germinale, mais générés de novo dans chaque organisme. Les récepteurs des LB (BCR) sont des immunoglobulines membranaires qui reconnaissent les antigènes circulants et activent leur différenciation en plasmocytes spécialisés. Les plasmocytes produisent des immunoglobulines solubles, appelées aussi anticorps, qui vont être spécifiques du même type d'antigènes reconnus par les BCR. Les récepteurs des LT (TCR) reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) à la surface des CPA ou des autres cellules de l'organisme infectées

par des pathogènes. Cette interaction va activer la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs et mémoires.

### **2.1. L'immunité adaptative à médiation cellulaire**

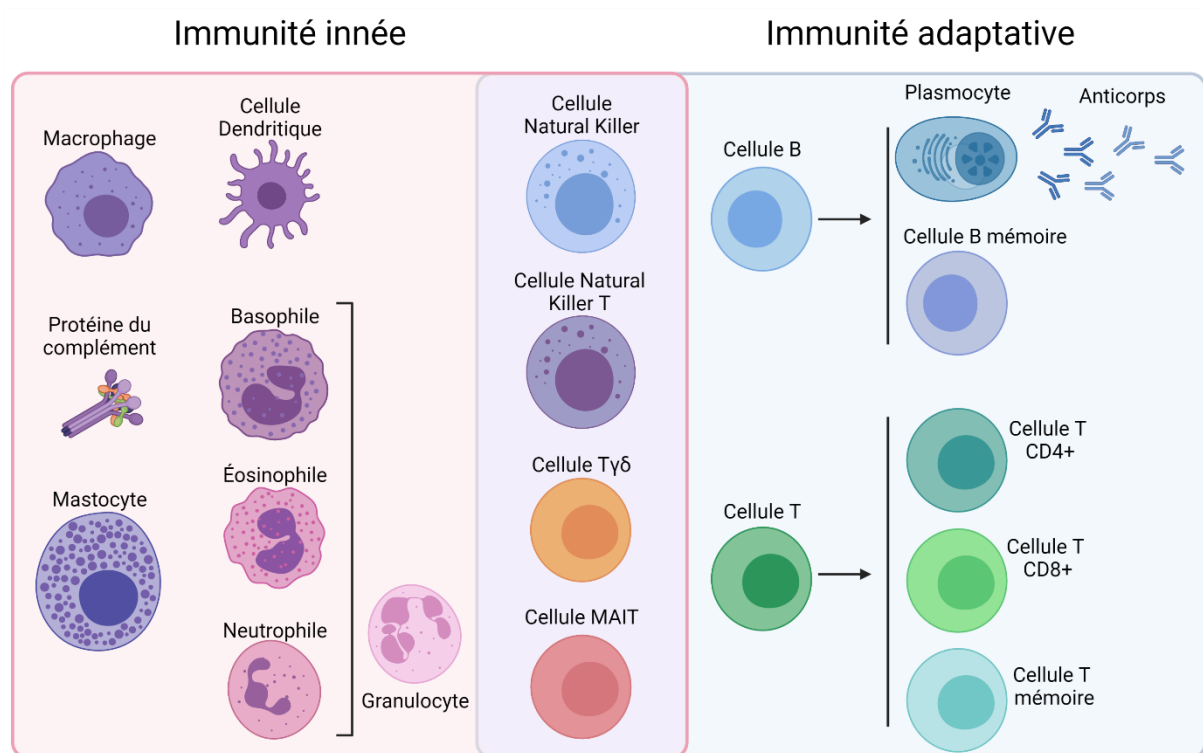
L'immunité cellulaire adaptative est régie par les LT conventionnels (lymphocytes T $\alpha\beta$ ) matures simples positifs CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. Les cellules T matures sont activées lors de l'interaction entre leur TCR et des peptides antigéniques présentés par les molécules HLA. Les Lymphocytes T CD8<sup>+</sup> interagissent avec le complexe peptide-HLA de classe I exprimé à la surface des cellules infectées. Les peptides présentés par les molécules HLA de classe I proviennent d'antigènes endogènes suite à l'infection de la cellule par des pathogènes tels que le virus. Les cellules T CD4<sup>+</sup> dans les ganglions lymphatiques, reconnaissent des peptides complexés aux molécules HLA de classe II présentes à la surface des CPA activées. Les CPA ont migré des sites cutanés et muqueux vers les ganglions lymphatiques suite à leur activation lors de la rencontre avec le pathogène sur le site infectieux. Cette migration dans les ganglions lymphatiques favorise l'interaction des DC avec les cellules T initiant ainsi la réponse adaptative.

Les LT CD8<sup>+</sup> conventionnels ou LT cytotoxiques ont pour rôle d'éliminer les cellules infectées par des agents pathogènes intracellulaires tels que les virus et les cellules transformées. La reconnaissance du complexe HLA/peptide par le TCR conduit à la formation d'une synapse immunologique qui active les LT cytotoxiques. Ces LT entraînent la mort cellulaire apoptotique de la cellule cible grâce à l'exocytose des granules contenant des granzymes/perforines, vers la synapse immunologique.

La population LT CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  est nommée également T helper (Th) par sa fonction « d'assistance ». Il en existe trois classes principales, les cellules Th1, Th2 et Th3, chacune produisant des cytokines caractéristiques. Les cellules Th1 vont activer les mononucléaires, les cellules NK et les LT cytotoxiques (CTL) entraînant une réponse à médiation cellulaire. Les cellules Th2 permettent notamment d'activer les LB en plasmocytes ou en LB mémoires, d'améliorer la production d'immunoglobulines par les plasmocytes. Enfin, les cellules Th2 et Th3 favorisent la commutation de classes des immunoglobulines.

## **2.2. L'immunité adaptative à médiation humorale**

L'immunité humorale adaptative est régie par les LB qui sécrètent des immunoglobulines. Dans la MO, les cellules B acquièrent leur spécificité antigénique au travers de plusieurs étapes de développement. À la phase immature, les LB quittent la MO pour continuer leur développement du stade naïf puis mature. La seconde phase du développement est l'activation des LB qui se produit après la rencontre avec l'antigène (Ag). Pour son activation, 3 signaux sont nécessaires. Le premier étant l'engagement du BCR avec un antigène soit sous forme soluble, soit sous forme de complexe immun libre ou soit lié à la membrane des CPA. Le second signal est la reconnaissance du TCR des exprimé à la surface des lymphocytes Th2 avec le complexe HLA classe II/peptide présent à la surface des LB. Il se compose également du signal de co-stimulation CD40/CD40L. Enfin, le troisième signal est la sécrétion de cytokines par les Th2. L'ensemble de ces trois signaux entraîne la différenciation des LB, soit en plasmocytes, soit en LB mémoires en fonction des cytokines sécrétées par les Th2.



**Figure 1 : La réponse immunitaire innée et adaptative.**

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Elle comprend des facteurs solubles, tels que les protéines du complément et une barrière cellulaire comprenant les macrophages, les mastocytes, les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les cellules dendritiques, les cellules NK. La réponse immunitaire adaptative est plus lente à se développer, mais se caractérise par une forte spécificité et la mise en place d'une réponse mémoire. Elle se compose des LT CD4+ et CD8+ ainsi que des LB produisant des anticorps. Les cellules NK, NKT, T $\gamma\delta$  et les MAIT sont des cellules cytotoxiques qui se situent à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Inspirée de (Dranoff, 2004).

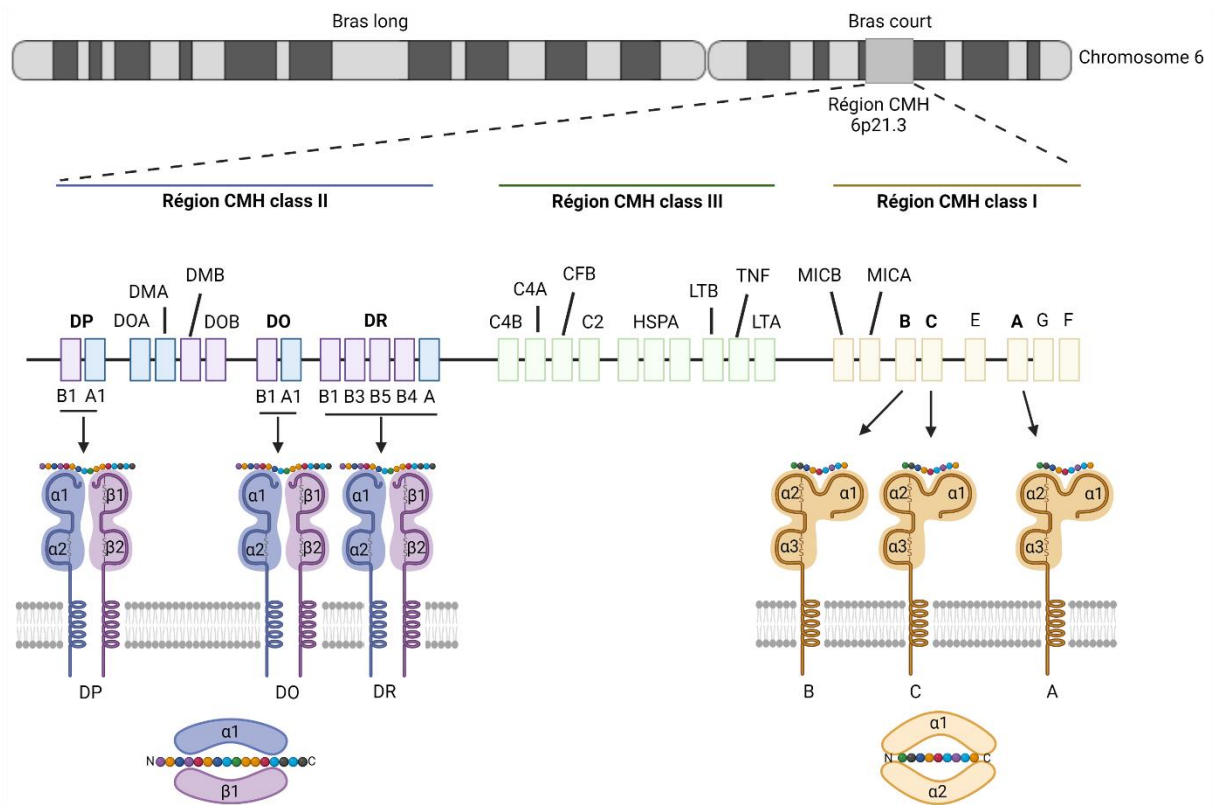
## II) Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le Complexe Majeur d'Histocompatibilité a été découvert pour la première fois en 1952 lors de l'observation d'une leucoagglutination massive des globules blancs à partir de sérum d'un sujet leucopénique. L'équipe du Pr Jean Dausset observe des anticorps (Ac) anti-globules blancs liés aux nombreuses transfusions reçues par le malade. L'équipe en déduit donc l'existence de groupes de globules blancs, tout comme il existe des groupes de globules rouges. Cependant, ces anticorps n'existent pas à l'état naturel, une immunisation par transfusion ou par grossesse est nécessaire. En 1958, Jean Dausset décrit grâce à une expérience de transfusion sanguine, le premier groupe leucocytaire, le groupe MAC (MAC sont les trois initiales du donneur du panel), appelé par la suite chez l'Homme, le système HLA.

Les gènes codants pour les molécules HLA sont situés sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3) étendu sur ~4Mb contenant plus de 200 gènes, dont une majorité possède des fonctions liées à l'immunité. Les gènes HLA sont étroitement liés et sont transmis en bloc à partir des haplotypes parentaux d'après la loi mendélienne. Le système HLA est divisé en trois régions, la première région HLA de classe I est composée de trois gènes HLA de classe I dits classiques hautement polymorphes HLA-A, -B et -C, des gènes HLA de classe I dits non classiques avec un polymorphisme plus limité comprenant les gènes HLA-E, -F, -G, et enfin les gènes HLA classe I apparentés dits MICA, MICB. La seconde région est la région HLA de classe II composée de gènes HLA de classe II dits classiques dont les gènes HLA-DRB1, -DQB1 et -DPB1 et des gènes HLA de classe II non classiques, dont HLA-DO et -DM. Située entre les régions HLA de classe I et II, la région HLA de classe III contient des gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse immune, comme les composants du complément (C2, C4, facteur B) ou encore des facteurs de nécrose tumorale (TNF) (**Figure 2**).

Les molécules HLA de classe I classiques sont constituées d'une chaîne lourde  $\alpha$  polymorphe composée de 3 domaines extracellulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ) et de la  $\beta_2$ -microglobuline ( $\beta_2m$ ) extracellulaire liée de manière non covalente. Une poche est formée par les deux domaines de l'hélice  $\alpha$  ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ ) constituant le site de liaison pour l'antigène peptidique. Le sillon de liaison peptidique HLA de classe I peut accueillir un peptide de 8 à 10 acides aminés. Ces molécules sont exprimées à l'état basal dans

presque toutes les cellules nucléées et vont permettre d'initier la réponse immunitaire adaptative en présentant un peptide au TCR et activer les LT naïfs en LT CD8+ matures. Les molécules HLA de classe II se composent des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune composées de 2 domaines extracellulaires ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ou  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ). Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment le sillon de liaison à l'antigène peptidique. Les deux extrémités du sillon des molécules HLA de classe II sont plus ouvertes permettant d'accueillir des peptides plus longs allant de 12 acides aminés ou plus. Les molécules HLA de classe II ne sont pas exprimées constitutivement comme les molécules HLA de classe I, mais leur expression est inductible au niveau des CPA. Elles sont exprimées à la surface des LB et des CPA. Les molécules HLA de classe II classiques ont pour fonction principale d'activer les LT CD4+ et les LB (**Figure 2**).



**Figure 2 : Gènes et molécules HLA**

Le complexe HLA est situé sur le bras court du chromosome 6 humain. La région HLA de classe I comprend les gènes HLA classiques (HLA-A, -B, -C) et non classiques (HLA-E, -F, -G) ainsi que les gènes MIC-A et MIC-B. Les molécules HLA de classe I classiques sont constituées d'une chaîne lourde  $\alpha$  composée de 3 domaines extracellulaires ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$ ). Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment le sillon de liaison à l'antigène peptidique (8 à 10 acides aminés ou plus). La région HLA de classe II comprend les gènes HLA classiques (HLA-DPB1, -DQB1, -DRB1) et non classiques (HLA-DO, -DM). Les molécules HLA de classe II classiques se composent des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , chacune composée de 2 domaines extracellulaires ( $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ou  $\beta 1$  et  $\beta 2$ ). Les domaines  $\alpha 1$  et  $\beta 1$  forment le sillon de liaison à l'antigène peptidique (12 acides aminés ou plus). La région HLA de classe III comprend les gènes codant des protéines du complément (C2, C4), des protéines de choc thermique (HSP70) et les TNF. Inspirée de (Navarrete, 2000).

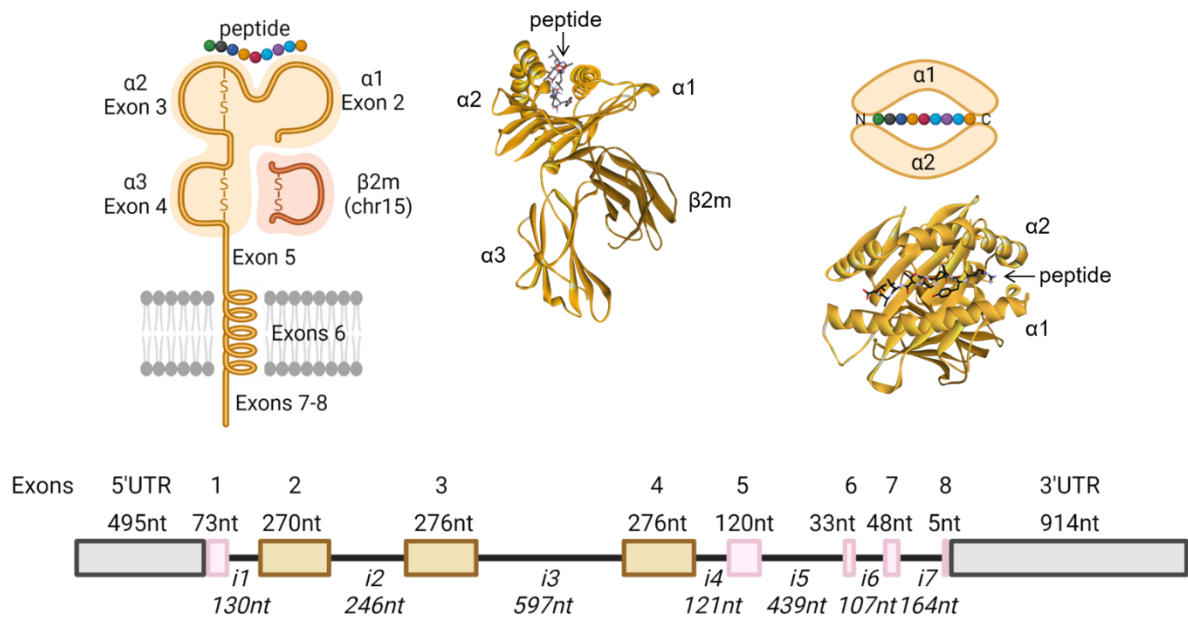
Dans ce chapitre, nous allons détailler les différents gènes et molécules HLA de classe I. Plus particulièrement, nous allons détailler le rôle de ces molécules dans l'immunité innée et adaptative ainsi que leur rôle en greffes de CSH. Nous décrirons également le polymorphisme allélique des gènes HLA ainsi que leur impact sur l'expression des molécules HLA de classe I correspondantes.



## 1. Les gènes et molécules HLA de classe I classiques

### 1.1. Localisation des gènes et organisation

Les gènes HLA de classe I codent pour une chaîne lourde  $\alpha$  liée à la  $\beta_2m$  de manière non covalente. Les gènes HLA de classe I classiques (HLA classe Ia) et non classiques (HLA classe Ib) sont situés sur le bras court du chromosome 6 (6p21.3). La longueur des gènes HLA de classe I est proche de 3kb, les gènes sont composés de 8 exons correspondant à des domaines différents de la molécule. La longueur des exons varie entre 5nt pour l'exon 8 à 276nt pour les exons 3 et 4. L'exon 1 code pour le peptide signal, les exons 2 et 3 codent respectivement pour les domaines  $\alpha_1$  et  $\alpha_2$  de la chaîne  $\alpha$ . Les deux domaines de l'hélice  $\alpha$  forment une poche peptidique la liaison pour l'antigène. La majorité du polymorphisme se situe sur les exons 2 et 3 dues à l'interaction directe entre les deux domaines  $\alpha$  et le peptide. L'exon 4 code pour le domaine  $\alpha_3$  de la chaîne  $\alpha$  reliée à la région transmembranaire codée par l'exon 5 et à la région intracytoplasmique codée par les exons 7 et 8. Chaque exon est séparé par de courtes parties introniques allant de 107nt (intron 6) à 439nt (intron 5) (**Figure 3**).



**Figure 3 : Structure des gènes HLA de classe I classiques**

Les gènes HLA de classe I classiques sont composés de 8 exons. Les gènes HLA de classe I codent pour une chaîne lourde  $\alpha$  liée à la  $\beta 2m$  de manière non covalente. L'exon 1 code pour le peptide signal, les exons 2 et 3 codent respectivement pour les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  de la chaîne  $\alpha$ . L'exon 4 code pour le domaine  $\alpha 3$  de la chaîne  $\alpha$  reliée à la région transmembranaire codée par l'exon 5 et à la région intracytoplasmique codée par les exons 7 et 8. Les domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  forment la poche peptidique. Le sillon de liaison peptidique HLA de classe I peut accueillir un peptide de 8 à 10 acides aminés.

## 1.2. Polymorphisme allélique des gènes HLA de classe I

Le système HLA représente le locus génétique le plus polymorphe chez l'être humain avec 30862 allèles HLA rapportés à en juillet 2021 dont 22436 allèles HLA de classe I (Robinson et al., 2013). En raison de ce large polymorphisme, une nomenclature a été mise en place en 1968 ("Nomenclature for factors of the HL-A system," 1968) et mise à jour régulièrement (Marsh and WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System, 2010). Chaque allèle HLA possède une séquence unique avec au moins une désignation à quatre digits. Les deux premiers digits correspondent à la famille d'allèles correspondant la plupart du temps à l'antigène sérologique porté par la molécule correspondante (HLA-A\*01 pour la molécule HLA-A1). Les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> digits répertorient les groupes d'allèles qui diffèrent par une ou plusieurs substitution(s) dans la séquence modifiant la conformation de la molécule HLA codée (HLA-A\*01:03). Les cinquième et sixième digits décrivent les allèles qui diffèrent par des substitutions silencieuses (ou non codantes) au niveau des parties codantes (HLA-A\*01:03:01). Enfin,

les allèles qui ne diffèrent que par des polymorphismes au niveau des régions introniques ou régions non traduites 5' et 3' qui flanquent les exons et les introns sont décrits à l'aide d'un septième et huitième digit (HLA-A\*01:03:01:01). Le dictionnaire HLA répertorie les molécules HLA associées à chaque produit d'allèle HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1 à partir de données établies lors des Workshop HLA. Ainsi, un suffixe peut être ajouté pour indiquer le niveau d'expression de la molécule HLA correspondante. Le suffixe N « null » indique un produit d'allèle qui n'est pas exprimé en surface (HLA-A\*24:09N), le « L » est utilisé pour un produit d'allèle faiblement exprimé (« Low ») à la surface cellulaire (HLA-A\*30:14L). Le suffixe S « Soluble » est utilisé pour un allèle codant pour une molécule HLA soluble (HLA-B\*44:02:01:02S). De la même manière, pour les molécules présentes exclusivement au niveau du cytoplasme, le suffixe « C » est utilisé. Enfin, le suffixe « A » indique une expression « aberrante » du produit d'allèle et lorsqu'un doute subsiste sur l'expression de la molécule HLA, le suffixe « Q » pour questionnable est ajouté (HLA-A\*01:159Q). Cependant ce dictionnaire HLA est loin d'être exhaustifs et l'expression de nombreuses molécules HLA reste encore non connue.

Les gènes HLA-B possèdent le polymorphisme allélique le plus diversifié (n=8181) comparé à celui des gènes HLA-A et HLA-C (respectivement n=6921 et 6779 allèles). Cependant, les éléments de régulation de la transcription diffèrent entre les promoteurs des gènes HLA-C et HLA-A/B. Le gène HLA-C aurait pour origine la duplication d'un allèle du gène HLA-B. Pour appuyer cette théorie, une étude de comparaison de séquences a montré que les gènes HLA-B et HLA-C sont plus étroitement liés entre eux qu'ils ne le sont avec le gène HLA-A (Robinson et al., 2017). La distance entre les gènes HLA-B et HLA-C est de 8kb et ils sont transcrits dans la même orientation. La proximité entre ces deux gènes entraîne de fréquents déséquilibres de liaison (DL) entre les deux allèles HLA-B et HLA-C.

Des analyses cristallographiques ont montré une corrélation entre les sites fonctionnels et les résidus polymorphes pour les molécules HLA-A et HLA-B, mais non pour les molécules HLA-Cw malgré un nombre important de polymorphismes au niveau des domaines  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ . Cette différence s'explique par le fait que les molécules HLA-A et -B hautement polymorphes interagissent principalement avec les récepteurs des cellules T CD8 très divers, tandis que les molécules HLA-C moins polymorphes interagissent principalement avec les récepteurs de type immunoglobuline (KIR,

Killer cell Immunoglobulin like Receptor) présents au niveau des cellules NK et détaillés paragraphe III.2.1.5.

### **1.3. Historique des typages HLA et détermination des allèles HLA de classe I**

Le début des typages HLA de classe I dans le contexte de la transplantation clinique a commencé dans les années 1960 avec l'utilisation de méthodes sérologiques permettant de discriminer les molécules HLA exprimées. Cette méthode, considérée à un niveau antigénique, reste de faible résolution. Cette approche consiste à identifier les antigènes en utilisant la cytotoxicité dépendante du complément (Terasaki and McClelland 1964). Les lymphocytes sont incubés avec des panels de sérums contenant des anticorps anti-HLA connus. Par l'ajout du complément, les cellules liées à des sérotypes spécifiques sont lysées devenant perméables aux fluorochromes et permettant ainsi d'être visualisées au microscope (Mittal et al., 1968). Dans les années 1980, les réactions en chaîne par polymérase (PCR) ont révolutionné la biologie moléculaire permettant aux typages HLA d'évoluer sur des techniques basées sur l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Des méthodes de biologie moléculaire avec l'utilisation des oligo-sondes spécifiques de séquences (SSO), d'amorces spécifiques de séquences (SSP) et de séquençage biallélique Sanger (SBT) et plus récemment de séquençage nouvelle-génération (NGS) ont permis de révolutionner le génotypage HLA (Dunckley, 2012).

La technique de PCR-SSO utilise des amorces génériques pour un locus donné donc dans des régions conservées. Les produits de PCR sont ensuite déposés sur une membrane avant d'être hybridés avec des sondes oligonucléotidiques marquées par un marqueur radioactif ou une enzyme qui s'hybrident au niveau de séquences cibles génomiques complémentaires localisées dans des séquences conservées encadrant les régions polymorphes (Cao et al., 1999; Dalva and Beksac, 2007). La PCR SSP utilise des amorces spécifiques qui se lient et amplifient des séquences cibles complémentaires. L'amplification ne sera vraiment effective que si les séquences des amorces 5' et 3' sont complémentaires de la séquence présente dans l'ADN génomique. Une migration sur un gel d'électrophorèse avec agent s'intercalant dans l'ADN permet de visualiser les fragments amplifiés (Bunce and Passey, 2013). L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide et possible pour des typage HLA à l'unité. Une autre alternative est le

typage HLA par PCR en temps réel (RT-PCR) qui offre une option rapide et fiable. Cette méthode est semblable à la méthode SSP ou SSO. Cependant, les amorces sont hybridées avec un fluorophore permettant de mesurer optiquement la fluorescence sur l'ensemble de la matrice (Gersuk and Nepom, 2006). Cette méthode permet d'accorder les modèles pour l'attribution du génotype ces techniques sont rapides, plutôt réservées aux typages ponctuels comme la demande de typages HLA pour les dons d'organes. Néanmoins, la plupart des amorces HLA disponibles dans le commerce ne détectent pas les nouveaux allèles.

Basé sur la technologie de séquençage Sanger (Sanger and Coulson, 1975), le typage HLA par SBT commence par l'amplification de régions spécifiques des gènes HLA encadrant en particulier les exons 2 et 3 les plus polymorphes des gènes HLA de classe I. Les régions amplifiées sont ensuite séquencées par extension à l'aide d'une polymérase après que les amorces se soient liées à la matrice d'ADN complémentaire. Cette technique permet des lectures de séquence d'une longueur moyenne de 500 à 1000 bases. Le typage HLA par SBT a permis l'identification du polymorphisme HLA base par base (Voorter et al., 2014) et a fourni les séquences de référence utilisées pour des analyses d'amplification basées sur les PCR décrites ci-dessus. Cependant, les limitations de la technique SBT rendent difficile l'extension de longues séquences ne permettant pas le séquençage du gène HLA en entier ni de lever certaines combinaisons d'allèles (Adams et al., 2004).

Plus récemment, le séquençage de nouvelle génération (NGS) pour le typage des gènes HLA a été développé permettant une efficacité, une précision et une accessibilité sans précédent. Cette technique permet aux laboratoires de typer des gènes HLA complets, incluant des régions codantes, non codantes et des régions régulatrices, à des volumes plus importants en multiplexant les échantillons. Les données NGS ont grandement contribué à la diversité des allèles HLA, la caractérisation de nouveaux allèles et de leur fonction immunologique et représentent une nouvelle source majeure de données. En effet, le NGS permet de séquencer les gènes HLA complets incluant les régions introniques et les régions 5'UTR et 3'UTR où se trouvent les principaux éléments de régulation d'expression.

#### **1.4. Expression des molécules HLA de classe I classique**

Les molécules HLA Ia sont exprimées à l'état basal à la surface de toutes les cellules nucléées. Cette expression est dépendante de l'enchâssement du peptide présenté au niveau de la molécule HLA, il existe en effet peu de molécules HLA « vides » à la surface des cellules. L'apprêtement (ou processing) des antigènes correspond à l'ensemble des étapes préalables à l'enchâssement d'un peptide. On distingue 3 étapes dans l'apprêtement : la première correspond à la fragmentation, les protéines à éliminer sont dégradées par le protéasome qui libère des peptides de longueur variable. La seconde étape est la translocation des peptides issus du protéasome vers le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP (Transporter Associated with Antigen Processing). Pour finir, l'un des peptides injectés dans le réticulum pourra alors s'enchâsser dans le sillon d'une molécule HLA de classe I. L'enchâssement du peptide avec la molécule HLA va permettre de stabiliser la molécule et ainsi permettre son acheminement vers la surface de la cellule (Cresswell, 2019; Del Val et al., 2020).

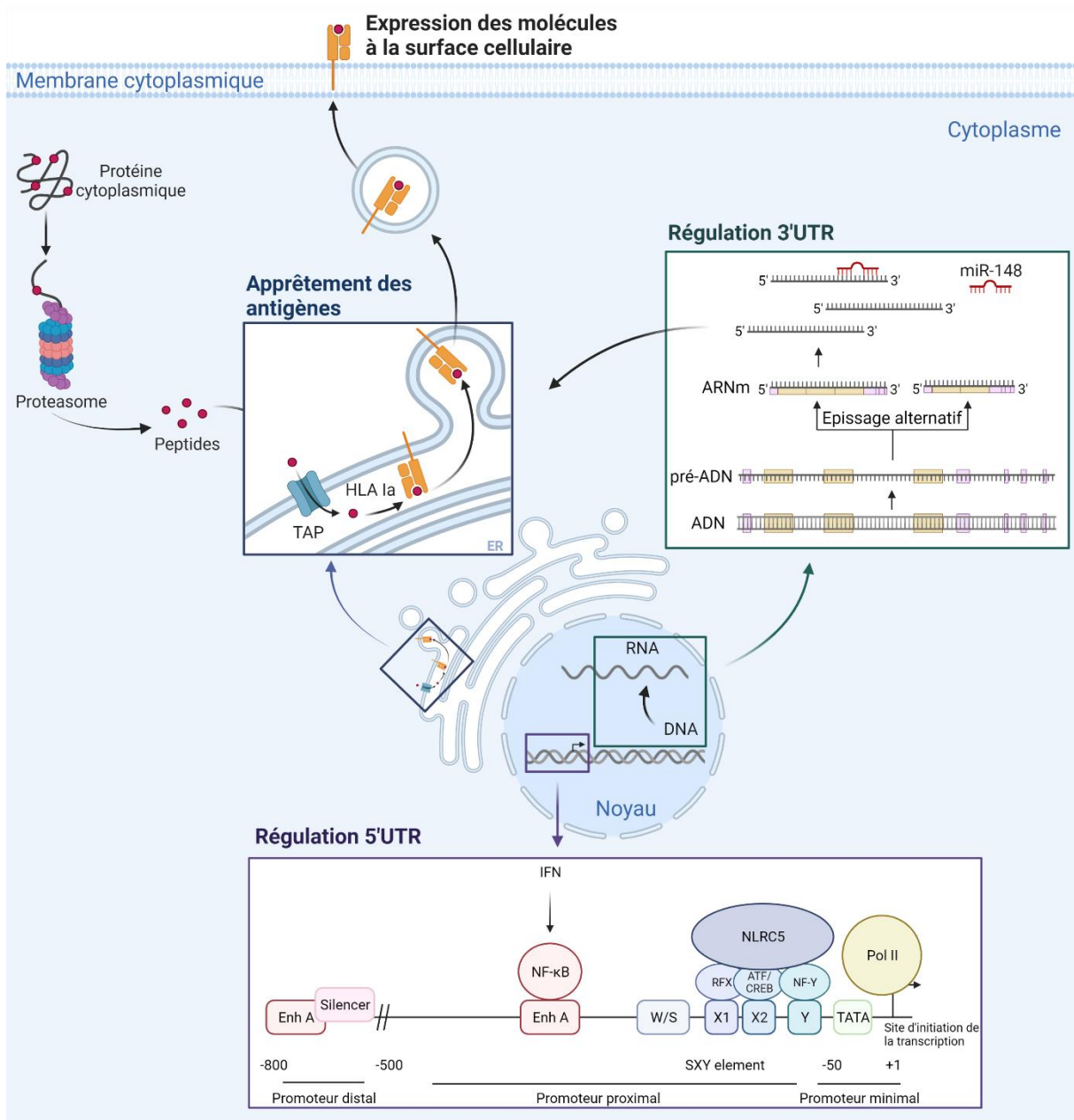
Cependant, divers paramètres modulent le niveau d'expression de ces molécules. Le premier paramètre est le polymorphisme lié aux spécificités des molécules HLA. En effet, des études ont montré que les molécules HLA-Cw étaient moins exprimées à la surface cellulaire que les molécules HLA-A et -B pouvant être lié au rôle de ces molécules (Apps et al., 2015; Bettens et al., 2014). En effet les molécules HLA-A et -B vont être associés à la présentation du peptide au récepteur des lymphocytes T CD8+ tandis que les molécules HLA-C sont davantage associées à la reconnaissance par les cellules NK via les récepteurs KIR. Le second paramètre est l'haplotype HLA. Bettens et al., ont montré un niveau d'expression homogène pour les individus homozygotes HLA-B et HLA-C avec HLA-B\*35 associés à l'allèle -C\*04:01 et HLA-B\*07 associé à l'allèle HLA-C\*07:02. L'équipe suggère alors que l'expression de l'ARNm (Acide RiboNucléique messenger) HLA-C était corrélée avec les haplotypes HLA-ABCD (Bettens et al., 2014). Le troisième paramètre est la régulation d'expression. En particulier, la partie 5'UTR des gènes HLA de classe I contient des sites de régulation de la transcription. Plusieurs domaines génomiques de cette région régulent la transcription incluant le promoteur distal (situé entre -800 et -700 pb en amont du site d'initiation de la transcription), le promoteur proximal (-500 et -50 pb) et le promoteur minimal contenant le codon d'initiation de la transcription.

Au niveau du promoteur proximal, l'ensemble des gènes HLA de classe I partage un motif de régulation de la transcription hautement conservé présentant les éléments « SXY » appelés enhancerosome. L'enhancerosome permet la fixation du facteur de transcription NLRC5, qui est une protéine du récepteur de type NOD (NLR). De plus, les gènes HLA de classe I contiennent au niveau du promoteur proximal, un site inductible par les cytokines EnhancerA (EnhA) et un élément de réponse stimulé par l'IFN $\gamma$  (ISRE - IFN $\gamma$ -stimulated response element). Des mutations au niveau du site EnhA affectent l'expression des molécules HLA de classe I correspondantes. Ainsi, une étude a montré qu'une mutation située dans le domaine EnhA au niveau de l'allèle HLA-C\*07 est associée à une faible expression de l'allotype correspondant à la surface cellulaire (Ramsuran et al., 2017). Quant au promoteur minimal, deux éléments sont associés à une variation du niveau d'expression des molécules HLA, les mutations de la TATA box et le polymorphisme observé au niveau du codon d'initiation de la transcription. Pour ce dernier, une étude récente a montré la présence de sept codons d'initiation de la transcription différents induisant des transcrits HLA-C alternatifs au niveau des cellules NK (Li et al., 2018). Les mutations au niveau de la région 3'UTR vont également avoir un rôle important dans la régulation de l'expression des molécules HLA Ia. En effet, le polymorphisme allélique HLA-C au niveau de la région 3'UTR affecte le site de liaison pour un miRNA nommé has-miR-148. La liaison de ce miRNA aux ARNs HLA-C entraîne une importante dégradation post-transcriptionnelle et donc une expression des molécules HLA-C correspondantes plus faible. En résumé, les mutations au niveau des régions 5'UTR et 3'UTR affectent principalement l'expression des molécules HLA-Cw, mais à un moindre niveau pour les molécules HLA-B pour lesquelles il a été montré un niveau de transcrit similaire entre les allèles. En plus du polymorphisme allélique, la méthylation de l'ADN impacte l'expression des molécules HLA et tout particulièrement des molécules HLA-A. L'équipe de Carey et al. a montré que l'expression élevée d'un allotype (ex HLA-A24) était associée à une méthylation d'un seul site CpG (cytosine-guanine dinucléotide) comparativement à un allotype faiblement exprimé (ex HLA-A3) pour lequel plusieurs sites CpG sont méthylés (Carey et al., 2019). Le troisième paramètre pouvant influencer la régulation d'expression des molécules HLA concerne les transcrits alternatifs induits par l'épissage alternatif et/ou les sites de polyadénylation alternatifs (PAS). Li et al. ont démontré des variants dans l'épissage alternatif des ARNs HLA-C au niveau des cellules NK de divers tissus qui entraîne une

différence d'expression des molécules HLA-C. De plus, il a été montré pour HLA-A que des épissages alternatifs peuvent supprimer l'exon 3 qui a pour conséquence d'induire une non-expression de la molécule correspondante (Li et al., 2018). L'épissage alternatif affecte également l'expression des molécules HLA-A. En effet, les molécules HLA-A utilisent en alternance le PAS distal qui entraîne un faible niveau d'expression des molécules HLA à la surface des cellules au repos et le PAS proximal qui permet un niveau d'expression plus élevé des molécules HLA. Cette transition du PAS proximal au PAS distal est influencée par une infection avec certains agents pathogènes. Contrairement à HLA-A, HLA-B et -C ne sont pas influencés par cette transition puisque ces gènes ne possèdent que le PAS distal le plus conservé. L'expression des molécules HLA est aussi impactée par l'affinité avec le peptide. Plus l'affinité entre les deux est grande, plus la molécule HLA-Cw sera stable à la surface cellulaire. Il a été montré pour les molécules HLA-Cw que la configuration de la fente de liaison impacte l'avidité avec le peptide. Plus la fente est large et plus la molécule HLA-Cw peut accueillir une large diversité de peptides et donc être davantage exprimée à la surface des cellules (Kaur et al., 2017).

Pour finir, dans un contexte tumoral ou infectieux, le niveau d'expression des molécules HLA de classe I est très souvent altéré. En effet, certains virus (CMV, VIH) et cellules leucémiques peuvent présenter une diminution de l'expression des molécules HLA I à la surface cellulaire afin d'échapper à la réponse immunitaire des lymphocytes T. Ces parties seront détaillées dans le chapitre IV.2 et IV.4.





**Figure 4 : Expression des molécules HLA de classe I classiques.**

Expression différentielle des molécules HLA-Cw liée à des sites polymorphes au niveau des régions régulatrices 5'UTR, 3'UTR ainsi que dans l'apprêtement des Ag. Le promoteur HLA de classe I contient trois domaines distincts régulant la transcription : i) le promoteur minimal contenant la TATA box et la séquence d'initiation permettant à l'ARN polymérase II de se fixer ; ii) le promoteur proximal (situé entre -500 et -50pb) contient les éléments nécessaires à la fixation des facteurs de transcription, régulé par l'interféron ; iii) le promoteur distal (situé entre -800 et -700pb) contenant le site de régulation appelé enhancer A (Enh A). Les transcrits alternatifs induits par épissage alternatif influencent l'expression des molécules HLA-Cw. Les produits d'allèles HLA-C qui possèdent un site de liaison au miR-148 dans la région 3'UTR sont exprimés plus faiblement par rapport aux produits d'allèles HLA-C qui abrogent la liaison au miR-148. La structure de la fente de liaison au peptide a un impact sur l'expression des molécules HLA-Cw à la surface cellulaire. Inspirée de (Kaur et al., 2017; René et al., 2016).

## **2. Gènes et molécules HLA de classe I non classiques et apparentés**

Les molécules HLA de classe I non classiques (HLA Ib) se distinguent des molécules du HLA Ia par leur polymorphisme plus limité, un niveau d'expression cellulaire inférieur et une expression tissulaire plus restreinte. Chez l'Homme, il existe plusieurs molécules HLA de classe I non classiques incluant : HLA-E, -F, -G. il existe également des molécules HLA de classe I apparentées incluant MICA et MICB.

### **2.1. Gène et molécules HLA-E**

Le gène HLA-E est situé sur le bras court du chromosome 6 dans la région 6p21.3 au sein des gènes HLA-I entre les loci HLA-C et HLA-A. Le gène HLA-E se caractérise par un polymorphisme allélique limité par rapport aux gènes HLA de classe I classiques (Lee et al., 1998). À ce jour, on dénombre 271 allèles HLA-E codants pour 110 molécules différentes. Malgré un polymorphisme allélique plus limité, une étude (Strong et al., 2003) montre que le polymorphisme du gène HLA-E peut impacter l'expression des molécules correspondantes. En effet, il a été montré que le produit de l'allèle HLA-E\*01:01 présentant une arginine en position 107 (Arg107) était associé à une faible expression de la molécule HLA-E correspondante, comparativement au produit de l'allèle HLA-E\*01:03 avec une Gly107 associé à une forte expression de la molécule HLA-E (Strong et al., 2003). Cette différence d'expression pourrait impacter l'interaction de la molécule présente sur les trophoblastes avec le récepteur CD94/NKG2 présent sur les cellules NK lors de grossesse.

La molécule HLA-E présente une homologie structurelle comparable à celle des molécules HLA-I classiques avec notamment trois domaines extracellulaires ( $\alpha$ 1-3), un domaine transmembranaire et un domaine intracytoplasmique. La molécule HLA-E doit également se lier à la  $\beta$ 2-microglobuline et nécessite une association avec un peptide pour être exprimée en surface. Néanmoins, contrairement aux molécules HLA de classe I classiques, les caractéristiques uniques du sillon de liaison peptidique de la molécule HLA-E restreignent le peptide à un groupe de nonamères qui sont principalement dérivés des résidus d'acides aminés (3 à 11) de la séquence signal des molécules HLA de classe Ia. Ainsi, son expression dépend de l'expression d'autres molécules HLA de classe I. Toutefois, les différentes molécules HLA de classe I ne sont pas toutes égales pour fournir une séquence signal à HLA-E. Ainsi,

il a été montré que certaines molécules HLA-B (HLA-B27, -B15, -B44, -B58) ne favorisent pas l'expression de la molécule HLA-E due à une différence au niveau de la séquence signal (Djaoud and Parham, 2020). La molécule HLA-E est exprimée à la surface des leucocytes dans le sang, des organes lymphoïdes et des cellules endothéliales retrouvées dans tous les tissus et organes vascularisés.

La molécule HLA-E représente le ligand des récepteurs CD94/NKG2 présent à la surface des cellules NK et de certaines cellules T. HLA-E se lie à la fois à la forme inhibitrice (CD94/NKG2A) et à la forme activatrice (CD94/NKG2C) (Braud et al., 1999). Le ligand HLA-E va donc moduler les fonctions des cellules tueuses naturelles (NK) comme détaillé chapitre III.2.3. Dans un contexte tumoral, la molécule HLA-E est exprimée à des niveaux élevés dans différents types de cancer, tels que les lymphomes (Marín et al., 2003), mélanomes (Derré et al., 2006), gliomes (Wischhusen et al., 2005) et carcinomes (Gooden et al., 2011; Levy et al., 2008). La liaison de HLA-E à NKG2A inhibe les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ (Gooden et al., 2011) et des cellules NK (Wischhusen et al., 2005). Dans un contexte de greffes de cellules souches hématopoïétiques (GCSH), de nombreuses études ont été réalisées sur les deux isoformes codées par les allèles HLA-E\*01 :01 et HLA-E\*01 :03 (Danzer et al., 2009; Ludajic et al., 2009; Tamouza et al., 2006; Tsamadou et al., 2019, 2017). Notamment, plusieurs études montrent que dans un contexte de GCSH HLA-E compatible, le génotype HLA-E\*01 :03 améliorerait la survie globale (SG) (Danzer et al., 2009; Ludajic et al., 2009; Tamouza et al., 2006). Cependant, les études se contredisent sur certains paramètres tels que la DFS (survie sans maladie) et l'incidence de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) (Neuchel et al., 2021). Ces contradictions proviennent notamment des paramètres de l'étude (appariement HLA-E, source du greffon, conditionnement et tailles de la cohorte) qui varie d'une étude à l'autre (Ludajic et al., 2009; Tamouza et al., 2006; Tsamadou et al., 2019, 2017).

## **2.2. Gène et molécules HLA-F**

Le gène HLA-F est situé sur le bras court du chromosome 6 dans la région 6p21.3 télomérique au locus HLA-A (Koller et al., 1989). Le gène HLA-F se caractérise par un polymorphisme allélique limité (Pyo et al., 2006) avec actuellement, 47 allèles qui codent pour 6 molécules différentes.

Le gène HLA-F a une structure similaire à celle des autres gènes HLA de classe I, à l'exception de la région 3' non traduite (Geraghty et al., 1990). L'exon 7 du gène HLA-F reste également non traduit, ce qui conduit à la production d'une queue cytoplasmique plus courte que les autres molécules HLA de classe I (Heinrichs and Orr, 1990). HLA-F est exprimé intracellulairement dans les cellules au repos (Wainwright et al., 2000) et à la surface cellulaire de certaines cellules, y compris les lymphocytes activés (Lee et al., 2010) et les cellules infectées par le virus (Lunemann et al., 2018). De plus, les molécules HLA-F ont également été retrouvées au niveau des cellules trophoblastiques présentes dans les caduques maternelles (Le Bouteiller et al., 1996). Cette expression de la molécule HLA-F par les trophoblastes est associée à la protection du fœtus. Il a été rapporté que les molécules HLA-F seraient également exprimées à la surface des cellules B, T et NK activés (Lee et al., 2010). HLA-F a été trouvé sous deux formes différentes ; en tant qu'hétérodimère avec la  $\beta$ 2m et peptides, et en tant que conformère ouvert sans  $\beta$ 2m et peptides (Burian et al., 2016; Garcia-Beltran et al., 2016). Les différentes conformations de la molécule HLA-F jouent un rôle important dans la détermination du type de liaison aux récepteurs des cellules NK. Il a été montré que la conformation ouverte se lie au KIR3DL2 inhibiteur et KIR3DS1 activateur (Burian et al., 2016; Garcia-Beltran et al., 2016; Kiani et al., 2018) tandis que la forme hétérodimère se lie au transcrit de type Ig (LILRB1 et LILRB2) (Dulberger et al., 2017). L'expression des molécules HLA-F a été retrouvée dans divers tissus cancéreux. En effet, Zhang et al., ont montré dans une cohorte de patients atteints de carcinome épidermoïde de l'œsophage que des taux élevés de HLA-F étaient corrélés à une mauvaise évolution de la maladie (Zhang et al., 2013). Bien que HLA-F n'ait pas été étudié aussi intensivement que les molécules HLA-E et G, un nombre croissant de preuves révèle sa pertinence clinique dans diverses pathologies, notamment les infections virales (Bernard, 2017; Kiani et al., 2019; Koyro et al., 2021), la grossesse (Hackmon et al., 2017; Langkilde et al., 2020), les maladies auto-immunes (Santos et al., 2018) et cancers (Ishigami et al., 2015; Wuerfel et al., 2020).

### **2.3. Gène et molécules HLA-G**

Le gène HLA-G est situé sur le bras court du chromosome 6 dans la région 6p21.3 au sein des gènes HLA de classe I. La séquence du gène HLA-G présente une homologie proche (86%) de la

séquence consensus des gènes HLA-classe I classiques. La différence avec la séquence consensus réside au niveau de l'exon 6, le gène HLA-G possède un codon-stop qui génère une molécule HLA-G plus courte par rapport aux molécules HLA de classe I classiques (Geraghty et al., 1992). HLA-G possède un polymorphisme allélique limité avec à ce jour 88 allèles répertoriés (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla>) codants pour 26 molécules. La molécule HLA-G est exprimée sous forme de protéine liée à la membrane, mais peut être également exprimée sous forme de protéine soluble avec une extrémité C-terminale unique. Son expression est principalement restreinte à l'interface fœto-maternelle au niveau du cytotrophoblaste extravilleux et du placenta (Goldman-Wohl et al., 2000; Hviid et al., 2004). Cependant, la molécule HLA-G est également exprimée au niveau de quelques tissus adultes sains comme le thymus et le pancréas (Cirulli et al., 2006; Lefebvre et al., 2000) et sur différents types cellulaires tels que les cellules souches mésenchymateuses, quelques monocytes activés et les précurseurs érythroïdes et endothéliaux (Menier et al., 2004). L'expression des molécules HLA-G dépend de plusieurs facteurs tels que les facteurs de transcription, les miARN (miR-148a) et les facteurs environnementaux comme des facteurs de croissance, des cytokines pro/anti-inflammatoires (Interleukine et interféron) ou encore les hormones (glucocorticoïdes, le  $\beta$  estradiol, la progestérone et la prolactine). En particulier, les études ont montré que l'expression de la molécule HLA-G est liée au polymorphisme de délétion/insertion (del/ins) de 14 paires de bases (pb) au niveau de l'exon 8 du gène HLA-G (Chen et al., 2008; Martelli-Palomino et al., 2013). Chen et al., ont montré que le génotype del/ins et del/del conduit à une expression plus forte de la molécule HLA-G et inversement pour le génotype ins/ins qui conduit à une expression faible de la molécule HLA-G (Chen et al., 2008). En 2011, Boukouaci et al., ont analysé ce dimorphisme chez 157 patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse familiale, dans laquelle des analyses univariées et multivariées ont montré que les donneurs homozygotes ins/ins de 14pb étaient corrélés à la survenue d'une GVHD aiguë sévère (grades III et IV) (Boukouaci et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la diminution de l'expression de la molécule HLA-G causée par l'insertion de 14pb est un facteur de risque dans la GCSH.

De nombreuses études ont rapporté une expression de la molécule HLA-G associée aux tumeurs solides comme par exemple le cancer du sein (da Silva et al., 2013), le carcinome hépatocellulaire (Cai

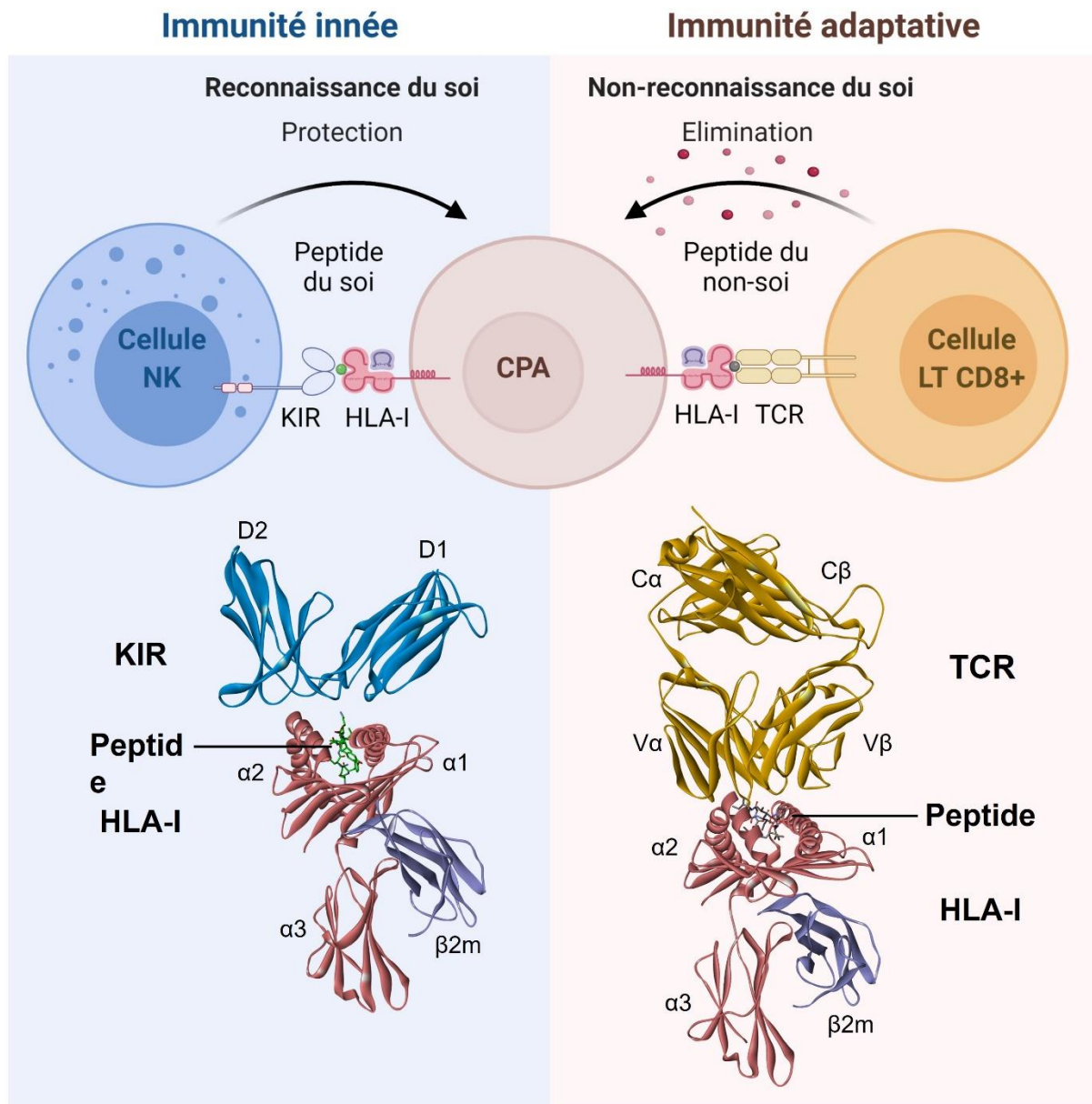
et al., 2009), le carcinome épidermoïde de l'œsophage (Zheng et al., 2014). L'expression de la molécule HLA-G a également été associée à d'autres pathologies telles que les infections virales, des maladies auto-immunes (Wiśniewski et al., 2010) et inflammatoires (Graebin et al., 2012). La molécule HLA-G est le ligand des récepteurs exprimés au niveau des cellules NK telles que les récepteurs inhibiteurs de type immunoglobuline (ILT, Immunoglobulin-like transcript) ILT2 et ILT4, les récepteurs CD8 et CD160 et le récepteur activateur KIR2DL4 (Apps et al., 2008) qui seront détaillés chapitre III.2.

#### **2.4. Gènes et molécules MICA, MICB**

Les gènes MICA et MICB sont localisés dans la région HLA de classe I et sont proches du locus HLA-B. Ils codent pour des protéines fortement glycosylées qui partagent une faible homologie (18 % à 30 %) avec les molécules HLA de classe I. Ils présentent un niveau de polymorphisme relativement élevé avec actuellement 388 allèles MICA codant pour 192 variants protéiques et 236 allèles MICB codants pour 42 variants protéiques. Contrairement aux autres molécules HLA de classe I classiques, les molécules MICA et MICB ne se lient pas à la  $\beta_2m$  et peuvent être exprimées dans des cellules TAP-déficientes, de ce fait leur expression est indépendante de la liaison aux peptides. MICA et MICB sont exprimées essentiellement au niveau des cellules épithéliales, en particulier principalement au niveau de l'épithélium gastro-intestinal ou l'épithélium cortical thymique. Ces molécules ne sont généralement pas exprimées à la surface cellulaire des cellules saines. MICA et MICB sont induites en réponse à divers facteurs de stress, tels qu'un choc thermique, un remodelage, une transformation de la chromatine ou une infection par certains agents infectieux comme le Cytomégalovirus humain (CMV) ou le Papillomavirus humain (HPV). Les molécules MIC sont des ligands des récepteurs NKG2D exprimés à la surface des cellules NK et de certains LT qui comprennent les LT CD8<sup>+</sup> et LT  $\gamma\delta$  (Iannello et al., 2016; Raullet et al., 2013). L'engagement de NKG2D-MICA entraîne l'activation des réponses cytotoxiques des LT et des cellules NK contre les cellules stressées (cellules tumorales) exprimant MICA ou MICB à leur surface.

Pour résumer, les molécules HLA classe I possèdent un large polymorphisme allélique et une expression variable des molécules correspondantes à la surface cellulaire dépendant de nombreux

paramètres génétiques. Elles possèdent un rôle central dans l'immunité innée et adaptative puisqu'elles initient les réponses cytotoxiques dans différents contextes infectieux et tumoraux, en particulier des cellules NK que nous décrirons dans les prochains chapitres.



**Figure 5 : Rôle des molécules HLA de classe I classiques dans l'immunité**

Les molécules HLA de classe I classiques ont un rôle dans l'immunité innée et adaptative. Dans l'immunité innée, les molécules HLA de classe I vont être reconnues par les récepteurs inhibiteurs et activateurs des cellules NK. En particulier les récepteurs KIR inhibiteurs reconnaissent les molécules HLA de classe I du soi et vont conférer une protection. Dans l'immunité adaptative, les molécules HLA de classe I vont être reconnues par le TCR des LT. Dans cette illustration, le TCR des LT CD8+ va reconnaître les molécules HLA de classe I présentant un peptide du non-soi entraînant l'élimination de la cellule présentatrice d'antigènes (CPA) par cytotoxicité. Référence cristallographie de la base de données RSCB PDB : KIR2DL1/HLA-Cw4 (1IM9) (Fan et al., 2001) et TCR/HLA-A2 (6AM5).

### III) Les cellules Natural Killer

#### 1. Caractéristiques générales

Les cellules NK ont été découvertes en 1975 avec les travaux de Kiessling et Herbermann qui ont permis d'identifier une nouvelle population lymphocytaire prenant la forme de grands lymphocytes granuleux. Ils ont observé que contrairement aux LT, ces cellules avaient une activité cytotoxique naturelle contre différentes cellules leucémiques (Kiessling et al., 1975). De par cette activité, ces cellules ont été nommées « Natural Killer ». Les cellules NK font partie de l'immunité innée et vont être les premières cellules à intervenir contre un pathogène. Les cellules NK ne sont pas restreintes par le système HLA ce qui les distingue des  $LT\alpha\beta$ . Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux représentant 5 à 20% des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et se développent à partir de progéniteurs lymphoïdes communs dans la moelle osseuse. Elles sont retrouvées majoritairement dans le sang périphérique, mais peuvent être également détectées dans les organes lymphoïdes (rate, amygdales, ganglions périphériques) et dans certains tissus (foie, poumon et placenta) (Di Santo and Vosshenrich, 2006). Les cellules NK sont identifiées comme étant CD3<sup>-</sup> et CD56<sup>+</sup>. Sur la base du marqueur CD56, 2 sous-populations de cellules NK sont définies, les cellules NK CD56<sup>dim</sup> et les cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> (90%) sont localisées essentiellement dans le sang périphérique et possèdent une forte activité cytotoxique. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> (10%) sont localisées préférentiellement dans les tissus lymphoïdes secondaires, produisent des cytokines, mais sont faiblement cytotoxiques (Cooper et al., 2001).

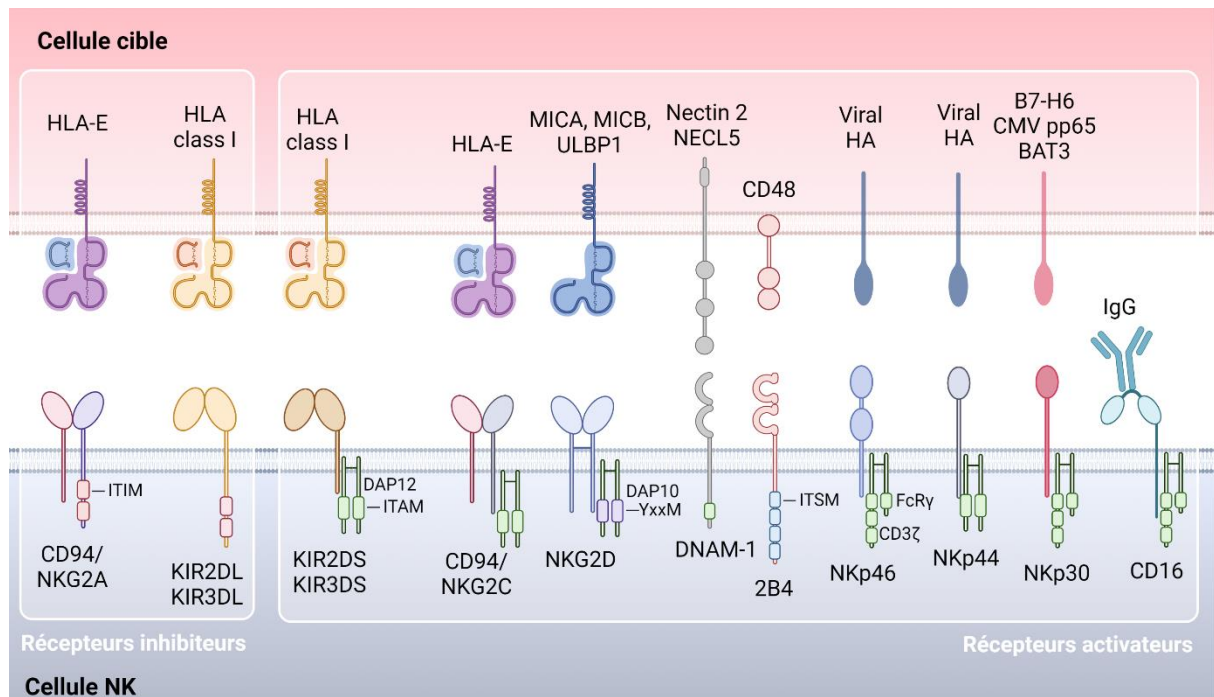
Les cellules NK sont capables de lyser des cibles présentant des molécules HLA de classe I différentes du soi comme les cellules allogéniques, un défaut d'expression des molécules HLA de classe I comme les cellules leucémiques ou infectées par un virus, ou encore des molécules du soi induites par un stress comme MICA/B. Les récepteurs KIR et l'hétérodimère CD94/NKG2A représentent les deux principaux récepteurs NK inhibiteurs engagés dans la reconnaissance du soi manquant. Les cellules NK possèdent également des récepteurs activateurs, comme les KIR, le CD94/NKG2D et les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR). L'ensemble des signaux émis par ces récepteurs va permettre une balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs qui déterminera l'activation ou non des cellules NK et la lyse



de la cellule cible. De plus, l'expression de ces récepteurs inhibiteurs et activateurs est fortement associée à la différenciation et à la maturation des cellules NK. En effet, des sous-populations de cellules NK peuvent être définies sur la base de marqueurs de différenciation. Au cours de leur développement, les cellules NK acquièrent d'abord l'expression du récepteur NKG2A et à un stade ultérieur, l'expression des KIR, puis le récepteur CD57 de différenciation terminale (Cooper et al., 2001).

## **2. Récepteurs des cellules NK**

Les récepteurs des cellules NK peuvent être classés en 3 familles : les récepteurs de la superfamille des immunoglobulines (Ig), les récepteurs de la superfamille des lectines de type C et les NCR (**Figure 6**). La superfamille des Ig comprend les récepteurs KIR et les récepteurs leucocytaires de type immunoglobine (LILR) ou aussi nommés ILT (Chen et al., 2020). Les récepteurs de la superfamille des lectines de type C comprennent les hétérodimères CD94/NKG2. La famille NCR comprend trois récepteurs transmembranaires (TM) de type I, appelés NKp46, NKp44 et NKp30. En plus de ces trois classes de récepteurs, d'autres récepteurs sont exprimés à la surface des cellules NK tels que les récepteurs de co-stimulation, de cytokines et les récepteurs impliqués dans la circulation des cellules NK. Dans cette partie, seront détaillés les principaux récepteurs activateurs et inhibiteurs ainsi que leurs ligands impliqués dans la régulation des fonctions des cellules NK et tout particulièrement les récepteurs KIR.



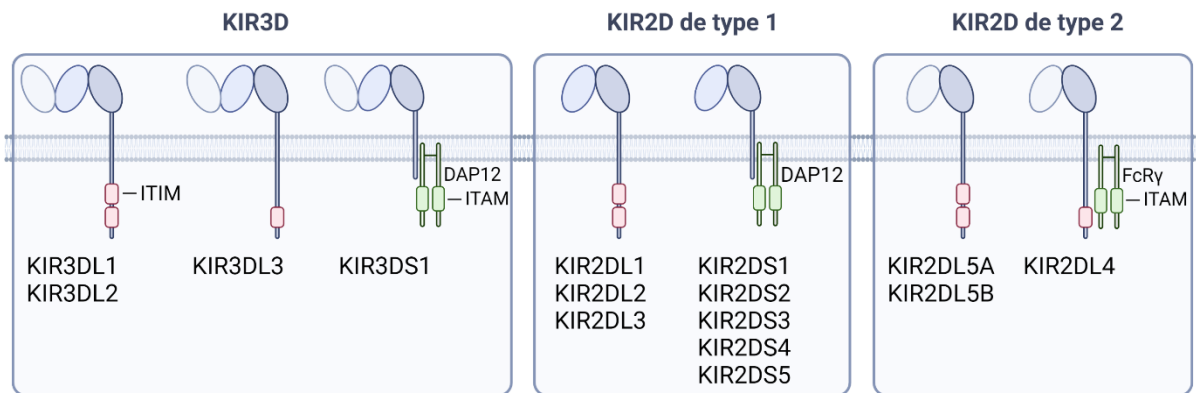
**Figure 6 : Principaux récepteurs et ligands des cellules NK.**

Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL/3DL et CD94/NKG2A reconnaissent respectivement les molécules HLA de classe I et les molécules HLA-E. Les récepteurs activateurs KIR2DS/KIR3DS, CD94/NKG2C, NKG2D, DNAM-1 et 2B4 reconnaissent respectivement les molécules HLA classe I, HLA-E, MICA-B/ULBP1, Nectin 2 et NECL5, et CD48. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) NKp46 et NKp44 se lient aux molécules virales HA, le récepteur NKp30 se lie aux molécules virales B7-H6, BAT3 et pp65. Le récepteur CD16 reconnaît les fragments Fc des immunoglobulines G (IgG). Inspirée de (Vivier and Ugolini, 2010).

### 2.1. Les récepteurs Killer cell Immunoglobulin like Receptor

Les récepteurs KIR représentent une famille de récepteurs de la superfamille des Ig. La famille KIR est composée de différents récepteurs avec deux (KIR2D) ou trois (KIR3D) domaines Ig extracellulaires (Borrego et al., 2002). La queue intracytoplasmique peut être longue (KIR2DL, KIR3DL) avec 2 motifs ITIM (Immune tyrosine-based inhibitory motif) ou courte (KIR2DS, KIR3DS) et couplée avec la molécule DAP12 portant un motif ITAM (Immune tyrosine-based activating motif) (Colonna, 1997) discriminant respectivement les KIR inhibiteurs et des KIR activateurs (**Figure 7**). Il existe aussi des récepteurs KIR non exprimés, car codés par des pseudogènes (KIR2DP1, KIR3DP1). Génétiquement, la structure, l'organisation et la taille des gènes KIR varient selon les individus. De plus, les gènes KIR possèdent un large polymorphisme allélique. Dans ce paragraphe, seront décrites la diversité et la

complexité du répertoire KIR en partant des gènes, puis du polymorphisme allélique pour finir sur l'expression et la fonction des récepteurs KIR et la description de leurs ligands.



**Figure 7 : Structure des récepteurs KIR**

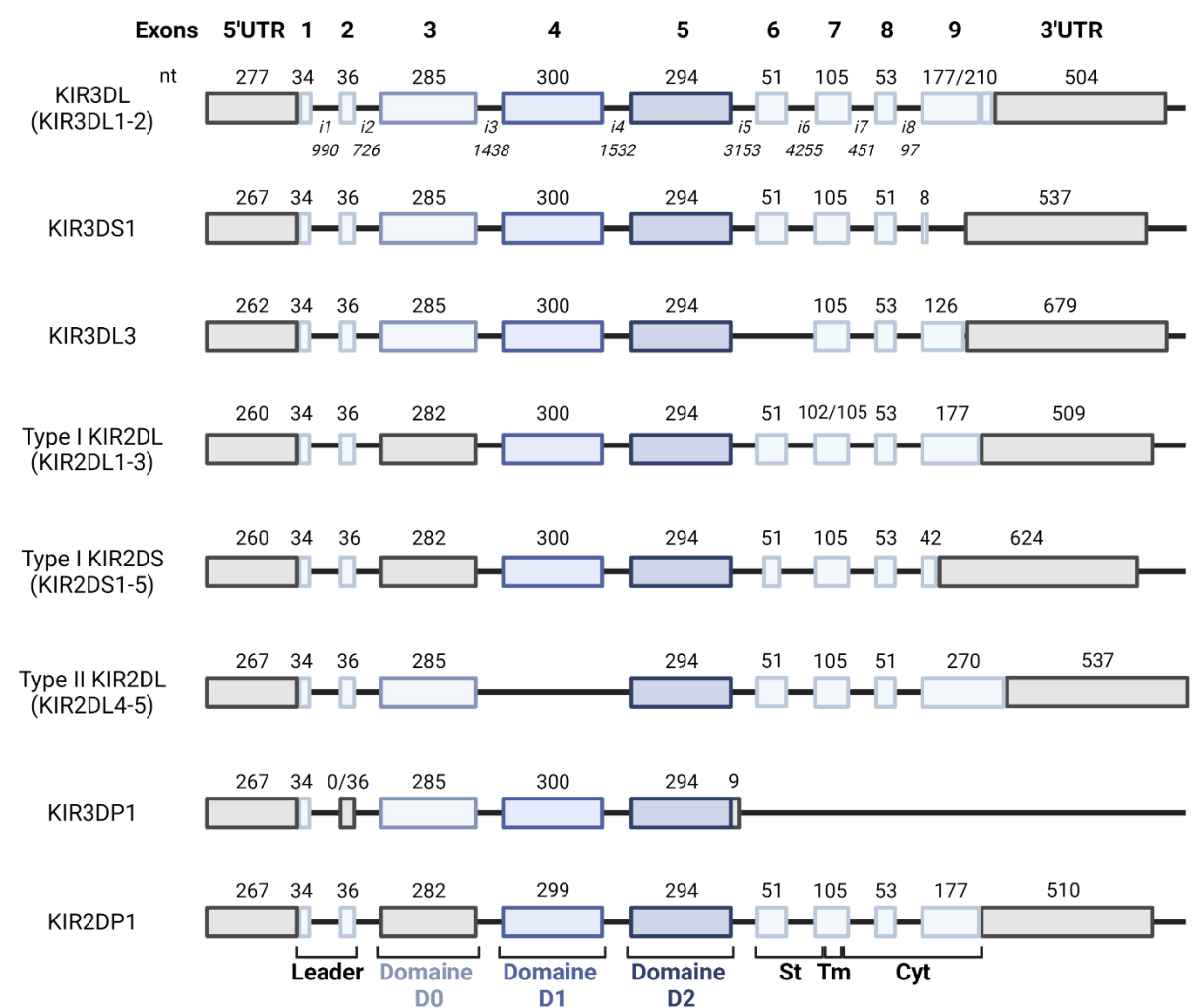
Les récepteurs KIR possèdent deux ou trois domaines Ig-like extracellulaires (KIR2D ou KIR3D). Les KIR3D possèdent les trois domaines D0, D1 et D2. Les KIR2D de type I possèdent les domaines D1 et D2. Les KIR2D de type 2 possèdent les domaines D0 et D2. Les récepteurs KIR ont une partie intracytoplasmique qui peut être longue (KIR2DL, KIR3DL) ou courte (KIR2DS, KIR3DS). Les KIR2DL, KIR3DL et KIR2DL4 portent dans leurs parties intracytoplasmiques un ou deux motifs ITIM qui délivrent des signaux inhibiteurs. Les KIR2DS et KIR3DS s'associent avec les protéines adaptatrices DAP12 qui portent deux motifs ITAM délivrant des signaux activateurs. Le KIR2DL4 peut s'associer aux protéines adaptatrices Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  qui délivrent des signaux activateurs. Inspirée de la base de données IPD-KIR.

### 2.1.1. La génétique des récepteurs KIR

Sur le plan génétique, contrairement aux gènes HLA de classe I, la structure, l'organisation et la taille des gènes KIR varient. La famille des gènes KIR est constituée de 16 loci différents (KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, KIR2DP1, KIR3DP1) localisés dans une région de 100-200 kb au niveau du complexe LRC (Leukocyte Receptor Complex). Les gènes KIR possèdent une organisation en tête-bêche et sont disposés à 2,4kb des uns des autres, à l'exception de l'intervalle entre le pseudogène KIR3DP1 et KIR2DL4 qui est de 14kb (Hsu et al., 2002).

Les gènes KIR possèdent de 4 à 9 exons avec une taille génomique entière variant de 4kb pour le pseudogène KIR3DP1 jusqu'à 16kb pour le gène KIR3DL2. Les gènes KIR possèdent également de longues séquences introniques séparant chaque exon. Il existe trois organisations génomiques KIR, la

première concerne les gènes codant pour les récepteurs KIR avec une longue queue intracytoplasmique et trois domaines extracellulaires de type Ig tels que KIR3DL1/2. Ces gènes KIR sont constitués de 9 exons chacun correspondant à des régions fonctionnelles de la protéine (**Figure 8**). Les exons 1 et 2 codent pour le peptide signal et les deux premiers acides aminés de la protéine. Les exons 3, 4 et 5 codent chacun pour un domaine extracellulaire de type Ig (respectivement D0, D1 et D2). L'exon 6 code pour la tige reliant le domaine D2 à la partie transmembranaire codée par l'exon 7. Enfin, les exons 8 et 9 codent pour la partie intracytoplasmique portant deux motifs ITIM. KIR3DL3 possède une structure exons/introns similaire à l'exception de l'absence de l'exon 6 et d'un codon-stop au niveau de l'exon 9. Le gène KIR3DS1 a la même structure exons/introns que son homologue inhibiteur KIR3DL1, mais avec une taille de l'exon 9 plus courte de 8kb. Il est intéressant de noter que KIR3DL1/3DS1 sont définis comme des allèles du même gène, bien que leurs fonctions soient différentes. La deuxième et troisième organisation des exons/introns correspondent aux gènes KIR2D : KIR2D de type I comprend les gènes codant pour les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2/3 allèles du même gène et les récepteurs activateurs KIR2DS1/2/3/4/5. Cette organisation est similaire à celle des KIR3D vues précédemment. Ces KIR sont constitués de 8 exons avec les exons 4 et 5 codant chacun pour les domaines D1 et D2 et une région homologue à l'exon 3 codant pour le domaine D0 des récepteurs KIR3D appelé « pseudo-exon 3 » (Vilches et al., 2000; Wilson et al., 1997). De surcroît, le gène KIR2DS4 est retrouvé sous deux formes, le KIR2DS4 comme décrit en amont et son variant 1D qui se caractérise par une délétion de 22pb au niveau de l'exon 5 codant pour le domaine D2 bloquant la transcription du récepteur KIR2DS4 correspondant (Hsu et al., 2002). La dernière catégorie inclut les gènes KIR2D de type II comprenant les gènes KIR2DL4/5. Ils possèdent 8 exons, mais possèdent une délétion de 22kb au niveau de l'exon 4 codant pour le domaine D1, de ce fait les exons 3 et 5 codent pour les domaines D0 et D2.



**Figure 8 : Organisation des gènes KIR**

Les gènes KIR ont été regroupés en fonction de leur similitude structurale avec en plus certains gènes KIR représentés seuls avec une structure particulière. Les régions codantes ou exons sont représentées par des cases bleues avec leur taille en pb indiquée au-dessus. Les régions régulatrices 5'UTR, 3'UTR, le pseudoexon 3 et l'exon 2 absent au niveau du gène KIR3DP1 sont représentés en gris. Pour les gènes KIR3DL, la taille en pb des introns est indiquée en dessous. Les parenthèses en bas du diagramme illustrent la manière dont les exons codent pour chaque domaine et région protéique. Les deux premiers codent le peptide signal, les exons 3,4 et 5 codent respectivement les domaines Ig extracellulaires D0, D1 et D2. L'exon 6 code la partie « stem » qui lie les domaines extracellulaires et transmembranaires. L'exon 7 code la partie transmembranaire et les exons 8 et 9 codent la partie intracytoplasmique. Inspirée de la base de données IPD-KIR.

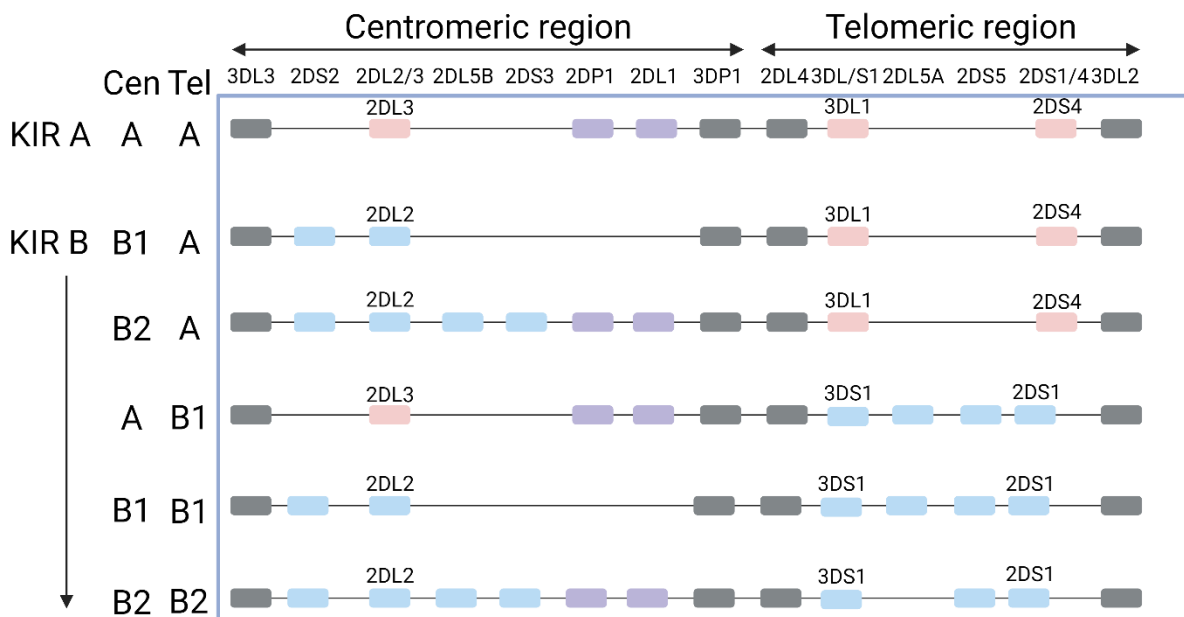
### 2.1.2. Génotypes KIR

Le nombre et la nature des gènes KIR diffèrent selon les individus permettant de discriminer deux haplotypes KIR (A et B) (Uhrberg et al., 1997). Les haplotypes KIR A et B possèdent tous les deux 4 gènes conservés (KIR3DL3, KIR3DP1, KIR2DL4 et KIR3DL2) présents chez tous les individus, hormis

quelques rares exceptions. Le gène KIR3DL3 délimite l'extrémité centromérique de la région contenant les gènes KIR, tandis que le gène KIR3DL2 délimite l'extrémité télomérique, ces deux gènes limitant la région LRC. Au centre de la région LRC, sont retrouvés les gènes KIR3DP1 et KIR2DL4. L'haplotype KIR A est défini par un ensemble fixe de neuf gènes KIR (KIR3DL3, KIR2DL3, KIR2DP1, KIR2DL1, KIR3DP1, KIR2DL4, KIR3DL1, KIR2DS4 et KIR3DL2) avec le KIR2DS4 comme seul gène activateur. En revanche, les haplotypes B sont plus diversifiés avec un nombre variable de gènes KIR et se caractérisent par la présence de gènes KIR inhibiteurs spécifiques tels que KIR2DL2 et de plusieurs gènes KIR activateurs. La combinaison des haplotypes KIR A et B a permis de décrire 660 génotypes KIR dans le monde (<http://www.allelefrequencies.net>). Les fréquences des gènes KIR sont proches de 100% pour les KIR2DL1/2/3/3DL1 inhibiteurs alors que les fréquences des gènes KIR activateurs sont faibles, hormis pour KIR2DS4 dont les variants non exprimés 1D sont fréquents. Différentes méthodes commerciales ou internes, incluant l'utilisation d'amorces ou de sondes KIR spécifiques, permettent de déterminer la présence ou l'absence des gènes KIR. Des études ont montré que les fréquences des haplotypes et génotypes KIR varient selon les populations (Augusto et al., 2019; Hollenbach et al., 2013; Yawata et al., 2006). En effet, une majorité (>50%) d'individus porte le génotype KIR AA dans les populations asiatiques (Jiang et al., 2012; Tao et al., 2021; Uhrberg et al., 1997) alors que seulement 35% des Européens possèdent ce génotype (Amorim et al., 2021; Middleton et al., 2007).

Au-delà de la définition initiale des haplotypes KIR A et B, les gènes KIR conservés permettent de délimiter 2 parties chromosomiques au niveau du LRC dont les gènes KIR centromériques (cen) (2DS2, 2DL2/3, 2DL5B, 2DS3, 2DP1, 2DL1) et télomériques (tel) (3DL1/S1, 2DL5A, 2DS5, 2DS1, 2DS4). Selon la présence ou l'absence des gènes 2DL2/3/S2, les motifs cenAA (2DL3 uniquement), cenAB (2DL3 avec 2DS2 et/ou 2DL2) et cenBB (2DS2 et/ou 2DS2, pas de 2DL3) sont définis. Selon la présence ou l'absence des gènes 2DS1/S4/3DL1/S1, les motifs telAA (3DL1 et 2DS4 uniquement), telAB (3DL1 et 2DS4 avec 3DS1 et/ou 2DS1) et telBB (absence de 3DL1 et/ou 2DS4) sont définis. Cette subdivision en motifs KIR peut augmenter la diversité des génotypes KIR. Ainsi, les individus

avec un génotype KIR AB peuvent présenter différents motifs cen et tel alors que les individus avec un génotype KIR AA ne présentent que des motifs cenAA et telAA.



**Figure 9 : Haplotypes et motifs KIR**

Le nombre et la nature des gènes KIR diffèrent selon les individus permettant de discriminer deux haplotypes KIR (A et B). Les haplotypes KIR A et B possèdent 4 gènes conservés (en gris). L'haplotype KIR A est défini par un ensemble fixe de neuf gènes KIR avec 3 gènes KIR qui lui sont spécifiques (rose), KIR2DL3, KIR3DL1 et le KIR2DS4 comme seul gène activateur. Les haplotypes B sont plus diversifiés avec un nombre variable de gènes KIR et se caractérisent par la présence de plusieurs gènes KIR activateurs. Les gènes associés aux haplotypes B sont représentés en bleu tandis que les gènes communs aux deux haplotypes sont représentés en violet. Chaque haplotype est divisé en 2 régions (centromérique et télomérique), délimitées par les gènes de structures. La combinaison des haplotypes KIR A et B a permis de décrire 660 génotypes KIR dans le monde (<http://www.allelefrequencies.net>). Inspirée de la base de données IPD-KIR.

Un autre paramètre important de la diversité du contenu en gènes KIR est la variation du nombre de copies (CNV – Copy Number Variation). La disposition des gènes KIR en orientation tête à queue et leur forte homologie de séquences permet un gain ou une perte de gènes KIR traduisant un ou plusieurs CNV. Ces CNV sont dus au processus nommé « recombinaison homologue non allélique » (NAHR) générant des remaniements chromosomiques qui surviennent pendant la méiose ou la mitose. De plus, il a été montré que les CNV n'affectaient pas tous les gènes KIR de manière similaire (Jiang et al., 2012). En effet, Jiang et al. ont montré que les deux gènes définissant les extrémités de la région KIR (KIR3DL2 et KIR3DL3) étaient peu touchés par le CNV (Jiang et al., 2012). En résumé, les CNV

permettent non seulement de générer de nouveaux haplotypes KIR étendus ou contractés, mais permettent également la formation de nouveaux gènes de fusion tels que le KIR3DL1 (de l'exon 1 à 5) avec le KIR3DL2 (de l'exon 6 à 9) (Norman et al., 2009). Au niveau phénotypique, la fréquence d'expression des récepteurs KIR se sont avérées plus élevées chez les individus ayant 2 copies du gène KIR comparativement aux individus ayant seulement 1 copie, montrant un effet du CNV sur l'expression de KIR (Béziat et al., 2013b; Li et al., 2008; Pelak et al., 2011). Enfin, Béziat et al., ont montré que le CNV des gènes KIR influence l'éducation des cellules NK au niveau du répertoire, mais n'a pas d'influence sur l'éducation des cellules NK au niveau de la cellule seule (Béziat et al., 2013b).

### **2.1.3. Polymorphisme allélique KIR**

En plus d'une variabilité au niveau du contenu en gènes, les KIR possèdent également une variabilité allélique importante avec une augmentation du nombre d'allèles connus passant de 87 allèles KIR en 2002 contre 1110 allèles KIR référencés en décembre 2020 (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). Comparativement aux allèles HLA de classe I, ce nombre d'allèles KIR peut sembler réduit, mais il est sans doute sous-estimé étant donné que le typage des allèles KIR reste limité à quelques équipes de recherche. Le polymorphisme allélique des gènes KIR est élevé pour les KIR inhibiteurs (le plus fort étant pour 3DL3 avec 228 allèles) et limité pour les KIR activateurs (le plus faible étant pour 2DS1 avec 33 allèles). Pour nommer les allèles KIR, une nomenclature a été mise en place en utilisant après le nom du gène, un astérisque comme séparateur avant une désignation numérique de l'allèle (2DL1\*) (Marsh et al., 2003). Les trois digits suivants l'astérisque servent à nommer les différents allèles d'un même gène (KIR2DL1\*003). Les deux digits qui suivent sont utilisés pour distinguer deux allèles qui diffèrent uniquement par des mutations silencieuses dans les régions codantes (KIR2DL1\*00302) et enfin les 2 derniers digits permettent de distinguer les allèles qui diffèrent par des substitutions dans les régions non codantes (KIR2DL1\*0030202).

Depuis plus de 15 ans, des amplifications à l'aide d'amorces ou de sondes KIR spécifiques ainsi que des techniques de séquençage Sanger sont utilisées pour attribuer les gènes et certains allèles KIR (Hsu et al., 2002; Middleton et al., 2008; Uhrberg et al., 1997). Cependant, les limitations de la technique SBT rendent difficile le séquençage de longues séquences et ne permettent pas d'amplifier les gènes



KIR dans leur intégralité vu la taille des gènes. Plus récemment, les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis d'attribuer les allèles de tous les gènes KIR (Maniangou et al., 2017; Norman et al., 2016; Vendelbosch et al., 2013; Wagner et al., 2018) par l'amplification des gènes KIR en entier et la possibilité de tester des dizaines d'échantillons par analyse. Cependant, la technique NGS KIR reste difficile à mettre en place notamment liée à différents facteurs tels que la taille importante des introns, le contenu en gènes KIR variable ou encore le nombre de copies des gènes KIR. Des études montrent une diversité allélique limitée dans les gènes activateurs KIR (KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR3DS1) avec actuellement (KIR-IPD 2.10.0) 33 à 88 allèles KIR par gène connu (Amorim et al., 2021; Middleton et al., 2007; Vierra-Green et al., 2012; Wagner et al., 2018). En plus de la diversité globale limitée, la distribution des allèles des gènes activateurs KIR était fortement asymétrique. Wagner et al., ont montré que l'allèle le plus fréquent des gènes activateurs KIR (à l'exception de KIR2DS4) représentait au moins 60 % (KIR2DS1) et jusqu'à 97 % (KIR2DS5) de l'ensemble d'échantillons. Pour KIR2DS4, cinq allèles prédominant dans une cohorte européenne ont été trouvés à des fréquences similaires (Amorim et al., 2021; Wagner et al., 2018). En revanche, les gènes inhibiteurs KIR présentent généralement plus de diversité. En particulier, pour les gènes avec trois domaines extracellulaires (KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3), de nombreux allèles différents ont été identifiés à des fréquences assez uniformément réparties (Amorim et al., 2021; Middleton et al., 2007; Wagner et al., 2018). Pour les gènes KIR avec deux domaines extracellulaires, KIR2DL1 et KIR2DL4 possèdent des distributions de fréquences alléliques plutôt larges, tandis que KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL5 ont chacun deux allèles communs ayant une fréquence combinée d'environ 90 % (Amorim et al., 2021; Wagner et al., 2018).

Comme les génotypes KIR, les fréquences des allèles KIR varient selon les populations étudiées. En effet, les données de fréquences des allèles KIR dans une population japonaise ont montré que pour les gènes KIR2DL1/2/3/4, KIR3DL1/2, KIR3DS1, et KIR2DS4, seulement un allèle de chaque gène KIR était représenté à une fréquence élevée (44 à 89 %) (Yawata et al., 2006), n'étant pas le cas pour une population européenne (Middleton et al., 2008). Cependant, il est intéressant de noter que malgré un nombre important d'allèles KIR2DL1 identifiés dans le monde (73 allèles en déc 2020), seulement 5

allèles prédominants (KIR2DL1\*001, \*002, \*003, \*004 et \*007) sont retrouvés dans une population Européenne (Meenagh et al., 2008). D'autre part, on retrouve chez cette même population irlandaise une forte fréquence de l'allèle KIR3DL1\*004 non exprimé à la surface des cellules NK alors qu'il est absent dans la population Japonaise (Yawata et al., 2006; Shilling et al., 2002; Gagne et al., 2013). Il est intéressant de noter que le groupe de P. Parham a été le premier à décrire que le polymorphisme allélique des gènes KIR est en synergie avec un contenu génétique variable, ce qui permet d'individualiser les génotypes KIR (Shilling et al., 2002). Plusieurs études faites sur des populations Européennes ont montré une association entre certains allèles KIR2DL1 et l'haplotype KIR. Il est montré que l'haplotype A est associé aux allèles KIR2DL1\*001, \*002 et \*003, tandis que les haplotypes B sont associés aux allèles KIR2DL1\*004 et \*007 (Dubreuil et al., 2020; Hilton et al., 2012, 2015; Huhn et al., 2018a; Vargas et al., 2020a). De plus, certains allèles des deux gènes conservés KIR2DL4 et 3DL2 sont plus fréquents au niveau des haplotypes B (n=54) qu'au niveau des différents haplotypes A (n=39). Le plus remarquable est l'allèle KIR2DL4\*005 retrouvé chez 46% des individus d'haplotype KIR B et de l'allèle KIR3DL2\*007 retrouvé chez 35% des individus d'haplotype KIR B (Middleton et al., 2007).

En outre, différents déséquilibres de liaison (LD) ont été décrits entre les gènes KIR. Notamment, il est fait mention pour la première d'un fort déséquilibre de liaisons entre les allèles KIR2DL1, 2DL3, -3DL1 et -3DL2 dans 34 familles (Shilling et al., 2002). Dans cette étude, il est observé des LD entre les allèles KIR2DL1 et KIR2DL3 dont les gènes sont localisés dans la moitié centromérique et entre les allèles KIR3DL1 et KIR3DL2. De plus, des combinaisons spécifiques d'allèles ont été observées entre les gènes KIR2DL5 et KIR2DS3. En particulier, *KIR2DL5B\*002* est adjacent à *KIR2DS3\*00103* dans la région centromérique, tandis que *KIR2DL5A\*001* (ou \*005) est adjacent à *KIR2DS3\*002* dans la région télomérique (Du et al., 2008).

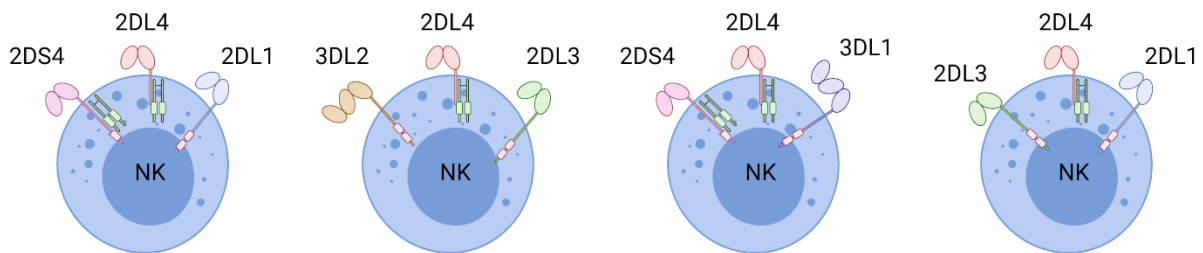
Pour terminer, la détermination des allèles KIR est également utile pour le positionnement des gènes KIR sur un haplotype donné. En effet, Ordóñez et al. ont montré que l'allèle KIR2DS3\*001 était associé à la partie centromérique, et que les allèles KIR2DS3\*002 et KIR2DS3\*003N étaient associés à la partie télomériques des haplotypes KIR (Ordóñez et al., 2008). L'allèle KIR2DS5 \*002 est à la même position télomérique que les allèles KIR2DS3\*002, ce qui impliquerait que ces allèles

appartiennent au même locus KIR2DS3/S5. Ces études de LD pourraient aider à prédire les allèles KIR à partir du contenu en gènes KIR (Amorim et al., 2021). Ce polymorphisme allélique KIR est d'autant plus important puisqu'il impacte le phénotype et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup> comme largement décrit pour le KIR3DL1 (Boudreau et al., 2017; Carr et al., 2005; Gardiner et al., 2001; Parham, 2005; Pugh et al., 2019).

#### **2.1.4. Expression des récepteurs KIR sur les cellules NK**

La distribution des récepteurs KIR à la surface des cellules NK est clonale, due à une expression stochastique des gènes KIR. Due à cette expression clonale, chaque cellule NK exprime un répertoire KIR distinctif, qui est variable à la fois en nombre et en combinaison de récepteurs exprimés (Uhrberg, 2005). Les cellules NK peuvent exprimer aucun, un ou plusieurs KIR en fonction du génotype. La diversité des haplotypes KIR conduit à des répertoires KIR avec une gamme de complexité qui varie entre 16 et 2048 types de clones différents (Manser et al., 2015). Les régions promotrices de la plupart des gènes KIR sont structurellement très similaires avec plus de 90% d'identité de séquences d'ADN semblant indiquer que les gènes KIR possèdent des propriétés régulatrices similaires (Trowsdale et al., 2001). Le processus qui établit ce modèle clonal d'expression des KIR à la surface des cellules NK est basé sur une régulation épigénétique (Chan et al., 2005; Santourlidis et al., 2002) par méthylation de l'ADN et par des modifications des histones telles que l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation d'acides aminés en position N-terminale (Santourlidis et al., 2008; Turner, 2002). Ces processus conduisent à l'activation sélective de gènes KIR. Cependant, il est encore difficile de savoir comment la déméthylation de l'ADN est ciblée et limitée à un gène KIR spécifique, car les promoteurs des gènes KIR sont très similaires et sont étroitement regroupés dans le locus KIR (Uhrberg, 2005). De nombreux autres récepteurs diversifient davantage ce modèle d'expression clonal tels que les récepteurs CD16, NKp30, NKp46, NKG2D et CD57 (Horowitz et al., 2013). Nous avons donc un répertoire de cellules NK KIR diversifié, avec des sous-populations NK exprimant différentes combinaisons de KIR voire aucun KIR (**Figure 10**). Cependant, il est encore difficile à ce jour d'étudier l'ensemble de ces sous-ensembles de cellules NK KIR<sup>+</sup>. En effet, due au fort degré d'homologie de séquences en acides aminés entre les récepteurs KIR, la plupart des anticorps monoclonaux (AcM) spécifiques des récepteurs

KIR reconnaissent des épitopes partagés par deux ou plusieurs KIR inhibiteurs, ainsi que leurs homologues activateurs. Pour pallier à cette problématique, notre équipe a développé au sein du laboratoire des mAbs (8C11 et 1F12) spécifiques de certains récepteurs KIR (David et al., 2009). L'anticorps 1F12 va reconnaître les populations NK KIR2DS2<sup>+</sup> et KIR2DL3<sup>+</sup> alors que l'anticorps GL183 développé dans le commerce reconnaît les récepteurs KIR2DL2/L3/S2. En combinant les deux anticorps, nous pouvons ainsi étudier la population NK KIR2DL2<sup>+</sup> seule. Ainsi, les individus de génotype KIR AA avec un contenu en gènes KIR limité présentent un répertoire de cellules NK moins diversifié avec des sous-populations NK KIR<sup>+</sup> observées en plus grandes fréquences que pour des individus de génotype KIR B<sup>+</sup> avec un contenu en gènes KIR plus large et des fréquences plus faibles de sous-populations NK KIR<sup>+</sup> correspondantes (Parham, 2005).

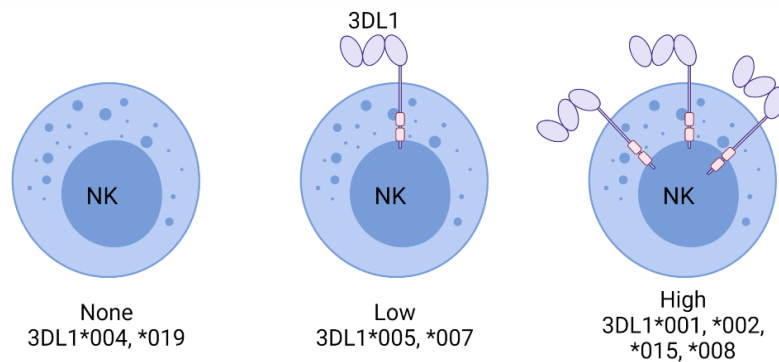


**Figure 10 : Expression clonale des récepteurs KIR sur les cellules NK**

Les cellules NK présentent une distribution clonale des récepteurs KIR. Nous avons donc un répertoire de cellules NK KIR diversifié, avec des sous-populations NK exprimant différentes combinaisons de KIR. Dans cette figure, 4 clones représentatifs sont illustrés avec différentes combinaisons de récepteurs KIR activateurs et inhibiteurs exprimés. Inspirée de (Parham, 2005).

Outre le contenu en gènes KIR, l'expression des produits codés par les allèles KIR (allotypes) exprimés à la surface des cellules NK peut différer en fonction du polymorphisme allélique, comme cela a été largement documenté pour 3DL1 par le groupe de P. Parham (Gardiner et al., 2001; Pando et al., 2003; Thomas et al., 2008). Notamment, notre équipe a décrit un fort niveau d'expression (3DL1\*001, 3DL1\*002, 3DL1\*003, 3DL1\*008 et 3DL1\*020), un faible niveau d'expression (3DL1\*005, 3DL1\*006 et 3DL1\*007) ou une non-expression (KIR3DL1\*004) du récepteur KIR3DL1 à la surface des cellules NK en fonction des allèles KIR3DL1 (Gagne et al., 2013). Cette différence d'expression des allotypes KIR3DL1 au niveau des cellules NK pourrait en partie être expliquée par un

polymorphisme situé au niveau du promoteur du gène KIR3DL1 qui affecterait le promoteur sens et anti-sens (Li et al., 2008) (**Figure 11**). De surcroît, Li et son équipe ont montré que 3 SNP situés sur le promoteur du KIR2DL1 au niveau des sites YY1 et SP1 recrutant des facteurs de transcription induisent une activité transcriptionnelle élevée dans les deux sens comparativement au gène KIR2DL3. De la même manière que pour KIR3DL1, le niveau d'expression du KIR2DL1 à la surface des cellules NK est variable en fonction du polymorphisme allélique du gène KIR2DL1. En effet, les allotypes (KIR2DL1\*004, \*007) portant une mutation au niveau de la queue intracytoplasmique en position 245 (Cys245) montrent une faible expression des récepteurs KIR2DL1 et une faible fréquence des cellules NK KIR2DL1<sup>+</sup> par rapport aux allotypes possédant une Arg245 (2DL1\*001, \*002 et \*003) (Bari et al., 2009; Le Luduec et al., 2019).



**Figure 11 : Expression des allotypes KIR3DL1 sur les cellules NK.**

L'expression des produits d'allèles KIR3DL1 à la surface des cellules NK diffère en fonction du polymorphisme allélique KIR3DL1. En particulier, est illustré une non-expression (3DL1\*004 et 3DL1\*019), un faible niveau d'expression (3DL1\*005 et 3DL1\*007) ou un fort niveau d'expression (3DL1\*001, 3DL1\*002, 3DL1\*008 et 3DL1\*015) du récepteur KIR3DL1 à la surface des cellules NK. Inspirée de (Parham, 2005).

En plus de ces paramètres, les éléments de transcription vont également impacter l'expression des récepteurs KIR. Les analyses des régions intergéniques des gènes KIR ont révélé la présence de plusieurs promoteurs qui coordonnent la transcription des gènes. Les gènes KIR possèdent un promoteur proximal avec une activité transcriptionnelle bidirectionnelle, alors qu'un promoteur distal en amont est unidirectionnel. Le promoteur distal n'est pas spécifique d'un tissu, il est actif à la fois dans les cellules NK et les lignées cellulaires autres que les cellules NK. Les éléments L1 et ALU présents dans le promoteur distal abritent plusieurs sites de liaisons au facteur de transcription (Stulberg et al., 2007).

L'un des sites de liaison de facteur de transcription retrouvé sur le promoteur distal est le site c-myc. Les sites c-myc des gènes KIR3DL1/S1, KIR2DL1/S1, KIR2DL1 et KIR2DS3 sont situés à environ 1150 bases en amont du site proximal d'initiation de la transcription. Des sites c-myc des gènes KIR2DL2/S2, KIR2DL3 et KIR3DL2 existent également à la position -1150, cependant, un polymorphisme à la première position du site empêche la liaison du facteur de transcription c-Myc. Il existe tout de même un site consensus c-Myc pour les gènes KIR2DL2/S2, KIR2DL3 et KIR3DL2 situés dans un élément Alu à la position -1190. La stimulation par l'IL-15 induit la liaison de c-Myc au niveau du promoteur distal des gènes KIR entraîne directement la transcription (Cichocki et al., 2009). Le promoteur distal des gènes KIR permet également d'établir des signatures histones actives pendant le développement des cellules NK. Santourlidis et al. ont montré par une analyse comparative des modifications de la chromatine au sein du locus KIR que malgré l'absence d'association significative entre l'expression des récepteurs KIR et les modifications chromatiniennes, il existe cependant des différences spécifiques entre les cellules exprimant des récepteurs KIR et celles n'exprimant pas de KIR (Santourlidis et al., 2008). Le promoteur proximal des gènes KIR s'étend sur environ 270 bases et contient une multitude de sites de liaison de facteurs de transcription impactant la transcription des gènes KIR (Stewart et al., 2003). De plus, la méthylation de l'ADN semble être le régulateur épigénétique central de la transcription des gènes KIR, car les modifications des histones N-terminales sont similaires entre les gènes KIR exprimés et non exprimés (Chan et al., 2005). Enfin, il a été montré que les produits d'allèles KIR non exprimés subissent une méthylation au niveau du site cytosine-phospho-guanine entourant le site d'initiation de la transcription, tandis que les produits d'allèles KIR exprimés sont dépourvus du site cytosine-phospho-guanine (Chan et al., 2005).

#### **2.1.5. Les ligands des récepteurs KIR**

Les ligands des récepteurs KIR sont principalement les molécules HLA de classe Ia. Les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 ont pour ligands toutes les molécules HLA-Cw divisées en deux groupes initialement basés sur les positions polymorphes des acides aminés 77 et 80 situés sur le domaine  $\alpha 2$  de la molécule HLA (Colonna et al., 1993). En particulier, le KIR2DL1 reconnaît spécifiquement les molécules HLA-Cw du groupe 2 (HLA-C2) telles que les molécules HLA-

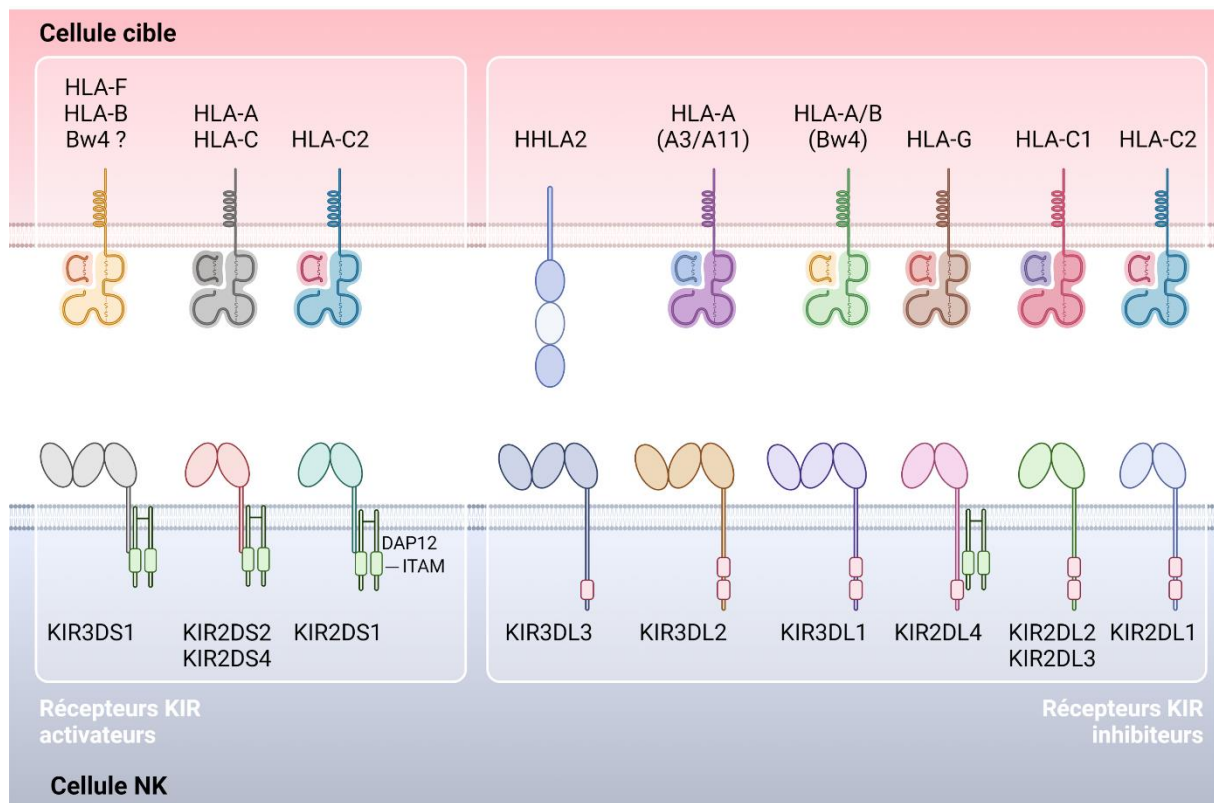
Cw2, -Cw4, -Cw5, -Cw6 et -Cw15 (Boyington et al., 2000; David et al., 2013; Fan et al., 2001). La reconnaissance du KIR2DL1 pour les molécules HLA-C2 se fait par la liaison entre la méthionine 44 du domaine D2 du KIR2DL1 avec la lysine 80 du domaine  $\alpha 2$  des molécules HLA-C2. Le peptide présenté par les molécules HLA-Cw semble jouer un rôle dans l'affinité de liaison de KIR2DL1/C2 puisqu'une substitution en position P8 sur le peptide par un résidu acide entraîne une perte de liaison du ligand (Rajagopalan and Long, 1997; Saunders et al., 2015). KIR2DL2/3 reconnaît les molécules HLA-Cw du groupe C1 (HLA-C1) tels que HLA-Cw1, -Cw3, -Cw7, -Cw8 et -Cw12. La reconnaissance entre les deux se fait par la liaison entre la lysine 44 du domaine D2 du KIR2DL2/3 avec l'asparagine 80 du domaine  $\alpha 2$  des molécules HLA-C1 (Boyington et al., 2000). Cependant, la reconnaissance de KIR2DL2/3 pour les molécules HLA-Cw du groupe C1 est moins stricte que celle de 2DL1 pour les molécules HLA-Cw du groupe C2 puisque certains molécules HLA-Cw du groupe C2 telles que HLA-Cw4 sont également reconnues par KIR2DL2/3 (Moesta et al., 2008; David et al., 2013). De plus, l'avidité du KIR2DL2 pour ses ligands HLA-Cw est plus forte que celle du KIR2DL3 (Frazier et al., 2013; Moesta et al., 2008). Les récepteurs KIR2DL2/3 ont non seulement des liaisons avec les molécules HLA-Cw mais également avec le peptide présenté (acides aminés 7 et 8) par les molécules HLA-Cw. Le peptide peut donc moduler les interactions KIR/HLA-C. Ce mécanisme a été retrouvé dans le cadre des infections liées au virus de l'hépatite C, le peptide présenté par les molécules HLA-Cw du groupe C2 augmentant l'affinité du récepteur pour son ligand et permettant ainsi un échappement viral (Lunemann et al., 2016). Le récepteur activateur KIR2DL4 a pour ligand la molécule HLA-G exprimée sur les cellules du trophoblaste pendant la grossesse (Rajagopalan et al., 2001).

Comme leurs homologues inhibiteurs, les récepteurs KIR activateurs reconnaissent les molécules HLA-Cw. KIR2DS1 reconnaît les ligands C2 comme son homologue 2DL1 inhibiteur, mais avec une affinité plus faible (Moretta et al., 1995; Morvan et al., 2008). KIR2DS2 reconnaît les molécules HLA-C1 et la molécule HLA-A11 (Liu et al., 2014 ; David et al., 2013). De la même manière que son homologue KIR2DL2, la reconnaissance du KIR2DS2 pour son ligand est fortement peptide-dépendante (David et al., 2013; Liu et al., 2014). KIR2DS4 reconnaît certaines molécules HLA-Cw portant les

épitopes C1 ou C2 et la molécule HLA-A11 (Graef et al., 2009). Quant aux ligands KIR2DL5 et KIR2DS3, ils restent à ce jour inconnus.

KIR3DL1 interagit avec certaines molécules HLA-B et HLA-A ayant les motifs sérologiques Bw4 (Stern et al., 2008). Les molécules HLA-B peuvent être divisées en deux groupes, Bw4 et Bw6, basés sur les positions polymorphes des acides aminés 77 et 80-83 de la protéine (Farid et al., 1978). La molécule Bw6 est définie par la sérine au résidu 77 et l'asparagine au résidu 80, tandis que la molécule Bw4 est caractérisée par au moins sept motifs différents d'acides aminés aux positions 77 et 80-83. Le motif Bw4 est retrouvé sur les molécules HLA-B13, -B27, -B37, -B38, -B44, -B49, -B51, -B57. De plus, le motif Bw4 est également présent sur plusieurs molécules HLA-A telles que HLA-A23, -A24 et -A32. En ce qui concerne le récepteur KIR3DS1, des études ont démontré que KIR3DS1 pourrait se lier à HLA-B Bw4 (Carlomagno et al., 2017; O'Connor et al., 2015) de manière dépendante des peptides. En particulier, il a été montré que les peptides dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) peuvent faciliter la liaison de KIR3DS1 aux molécules HLA-B Bw4+ (O'Connor et al., 2015). Plus récemment, les molécules HLA-F se sont révélées être des ligands de haute affinité pour KIR3DS1 (Carlomagno et al., 2017; O'Connor et al., 2015). Quant au KIR3DL2, il reconnaît certaines molécules HLA-A (-A3 et -A11) (Döhning et al., 1996; Pende et al., 1996) et la molécule HLA-F (Goodridge et al., 2013). Le KIR3DL2 se lie également aux peptides présentés au niveau des acides aminés en positions P7 et P8 permettant la modulation de l'interaction récepteur-ligand (Dulberger et al., 2017). Outre les ligands HLA de classe I, la molécule HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2) membre de la famille B7 et fortement exprimée dans plusieurs cancers solides et hématologiques a récemment été identifiée comme ligand du KIR3DL3.





**Figure 12 : Ligands des récepteurs KIR**

Le KIR3DS1 reconnaît les molécules HLA-F et HLA-B Bw4. Les KIR2DS2 et KIR2DS4 reconnaissent certaines molécules HLA-A et HLA-C. Les récepteurs KIR2DL1 et KIR2DS1 reconnaissent les molécules HLA-C du groupe C2. Les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 reconnaissent les molécules HLA-C du groupe C1. Le récepteur KIR2DL4 reconnaît la molécule HLA-G. Le récepteur KIR3DL1 reconnaît le motif Bw4 présent au niveau de certaines molécules HLA-A et HLA-B. Le récepteur KIR3DL2 reconnaît les molécules HLA-A3 et HLA-A11. Enfin, le récepteur KIR3DL3 reconnaît la molécule HHLA2.

Pour résumé, génétiquement la structure, l'organisation et la taille des gènes KIR varient selon les individus permettant la distinction de deux haplotypes KIR. L'haplotype KIR A étant défini par un ensemble fixe de neuf gènes KIR tandis que l'haplotype B est défini comme un nombre variable de gènes KIR allant de 7 à 14 gènes. Les KIR possèdent un large polymorphisme allélique, plus élevé pour les gènes inhibiteurs. Les récepteurs KIR sont exprimés de façon clonale à la surface des cellules NK. Ces données prises ensemble nous montre que génétiquement et phénotypiquement le répertoire NK KIR possède une grande variabilité. De plus, les récepteurs KIR ont pour principaux ligands les molécules HLA montrant leur importance dans l'immunité. En effet, dans le contexte physiologique, elles reconnaissent les molécules HLA de classe I, tandis que dans un contexte tumoral ou infectieux les

NK KIR détectent l'absence ou la diminution de l'expression des HLA de classe I. Hors les récepteurs, les KIR ne sont pas les seuls récepteurs importants dans l'immunité NK, il existe d'autres récepteurs que nous décrivons à la suite.

## **2.2. Les récepteurs leucocytaires de type immunoglobuline**

Les récepteurs leucocytaires de type immunoglobuline sont une famille de 11 récepteurs (LILRB1-5 & LILRA1-6). Les gènes LILR sont situés dans la région LRC sur le chromosome 19. Les gènes LILR se composent de 2 pseudogènes et de 11 gènes fonctionnels codants pour cinq récepteurs activateurs (LILRA1, 2, 4-6), cinq récepteurs inhibiteurs (LILRB1-5) et une molécule soluble (LILRA3). Les membres de la famille LILR ne sont pas polymorphes par rapport aux KIR. LILRB1, LILRB2, LILRB4 et LILRA3 sont modérément polymorphes, et LILRB3 est plus polymorphe comparativement aux autres gènes LILR (Brown et al., 2004; Young et al., 2008). Les récepteurs LILR sont exprimés à la surface des cellules NK et aussi des neutrophiles, éosinophiles, macrophages, DC, LB, LT, ostéoclastes, cellules endothéliales et des neurones. Les LILR inhibiteurs possèdent deux ou quatre domaines de type Ig et une longue queue cytoplasmique avec des motifs ITIM. Les LILR activateurs possèdent comme pour les LILR inhibiteurs deux ou quatre domaines de type Ig, mais ont une courte queue cytoplasmique qui se lie à la chaîne FcR $\gamma$  contenant des motifs ITAM permettant la transduction d'un signal d'activation. Les formes solubles des LILR sans les régions transmembranaires et cytoplasmiques sont générées par épissage alternatif, servant ainsi de régulateurs négatifs (Jones et al., 2009). Les récepteurs LILR sont classés en tant que membres du groupe 1 (LILRB1, LILRB2 et LILRA1-3) ou du groupe 2 (LILRB3-5 et LILRA4-6) sur la base de la conservation des résidus LILRB1 qui reconnaissent les molécules HLA de classe I.

Bien que la famille LILR ait été identifiée il y a plus de 15 ans, de nombreuses problématiques restent à être élucidées. En particulier, les ligands de 6 récepteurs LILR sur 11 sont inconnus, et les principaux ligands identifiés à ce jour sont des molécules HLA de classe I ou HLA-like (Hirayasu and Arase, 2015). Les récepteurs LILR modulent un large éventail de fonctions immunitaires, notamment la régulation de l'inflammation, la tolérance immunitaire et la différenciation cellulaire. Pour finir,

l'expression des gènes et les polymorphismes de ces récepteurs seraient associés à des maladies auto-immunes et infectieuses telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'infection à cytomégalovirus.

### **2.3. Les récepteurs CD94/NKG2**

Les récepteurs CD94/NKG2 sont exprimés principalement par les cellules NK et les LT CD8+. Ils sont membres de la superfamille des récepteurs lectine de type C. Ce sont des hétérodimères composés d'une sous-unité commune invariante appelée CD94, liée par des liaisons disulfures à une glycoprotéine codée par un gène de la famille NKG2 (Lazetic et al., 1996). La famille NKG2 comprend au total 7 récepteurs (NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F et NKG2H). Sur 7 de ces récepteurs, seulement 5 se lient à la molécule CD94 (NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2D, NKG2E et NKG2H). Les gènes codant pour les récepteurs NKG2 se situent au niveau du chromosome 12 (12p12.3-13.2) sur le complexe génique NK (NKC - Natural Killer Complex). Les récepteurs CD94/NKG2 peuvent être inhibiteurs tels que NKG2A ou activateurs tels que NKG2C, NKG2E. Les récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs contiennent des motifs ITIM au niveau de la région intracytoplasmique (Carretero et al., 1997). Les récepteurs CD94/NKG2 activateurs contiennent un résidu chargé positivement au niveau de leur région transmembranaire permettant d'interagir avec la molécule DAP12 portant des motifs activateurs ITAM (Lanier, 1998). Le ligand des récepteurs CD94/NKG2A-C est la molécule HLA de classe I non classique HLA-E (Braud et al., 1999). Dans des conditions physiologiques, le récepteur CD94/NKG2A a une meilleure affinité pour son ligand HLA-E que le récepteur CD94/NKG2C permettant d'induire des signaux d'inhibition plutôt que d'activation de la lyse afin d'éviter la dégranulation des cellules NK face à des cellules saines. La reconnaissance de la molécule HLA-E par le complexe inhibiteur CD94/NKG2A joue un rôle dans l'éducation des cellules NK CD94/ NKG2A+ (Horowitz et al., 2016). Le récepteur CD94/NKG2C est important dans la reconnaissance des cellules infectées par le CMV humain. En effet, les récepteurs NKG2C vont reconnaître les peptides viraux issus de la protéine UL40 du CMV présentés par la molécule HLA-E (Gumá et al., 2006).

### **2.4. Le récepteur NKG2D**

Le récepteur NKG2D fait partie comme NKG2A et NKG2C de la superfamille des lectines de type C. Contrairement aux autres récepteurs de la famille NKG2, NKG2D ne forme pas d'hétérodimère

avec le CD94. Il est codé par le gène KLRK1 (Killer cell Lectin-like Receptor subfamily K member 1) situé dans la région NKC au niveau du chromosome 12. Le NKG2D est exprimé à la surface des cellules NK et de certains LT qui comprennent les LT  $\alpha\alpha$  CD8<sup>+</sup> et LT  $\gamma\delta$  (Iannello et al., 2016; Raulet et al., 2013). Le récepteur NKG2D est un récepteur activateur qui s'associe avec la molécule DAP10 possédant une séquence YINM, qui après phosphorylation de la tyrosine permet la liaison de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) au complexe Grb2-Vav1 permettant la transduction d'un signal activateur (Lanier, 2009). Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance du soi induit par le stress cellulaire. En effet, les principaux ligands du NKG2D sont les molécules HLA de classe I apparentées MIC-A et MIC-B et certaines protéines liant UL16 (ULBP1-6) (Cosman et al., 2001; Diefenbach et al., 2001). Ces ligands sont peu exprimés à la surface des cellules saines, mais vont être induits par le stress à la surface des cellules infectées par un pathogène viral ou encore à la surface des cellules tumorales. L'engagement du récepteur NKG2D pour son ligand active la cascade de signalisation qui conduit à la réponse cytotoxique des cellules NK.

## **2.5. Les récepteurs de cytotoxicité naturelle**

Les récepteurs NCR ont été identifiés à l'origine par l'équipe de Moretta il y a plus de 20 ans (Pende et al., 1999; Sivori et al., 1997; Vitale et al., 1998). La famille NCR comprend trois récepteurs transmembranaires (TM) de type I, appelés NKp46, NKp44 et NKp30. Les NCR sont un groupe de récepteurs des cellules NK capables d'induire directement la lyse des cellules cibles (Moretta et al., 2000). Les récepteurs NKp44 et NKp30 sont codés respectivement par les gènes NRC2 et NRC3, tous deux situés sur le chromosome 6 (6p21.1) dans la région HLA de classe III alors que le récepteur NKp46 est codé par le gène NRC1 situé dans la région LRC du chromosome 19 (19q13.42).

Le récepteur NKp46 a été le premier NCR à être identifié à la surface des cellules NK (Sivori et al., 1997). Toutes les cellules NK matures expriment le récepteur NKp46. Néanmoins, il a été montré que NKp46 est également exprimé par les cellules lymphoïdes innées 1 (ILC1) et ILC3 (Spits et al., 2013) et certaines populations de LT ( $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ ) (Tomasello et al., 2012; Yu et al., 2011). Le récepteur NKp46 possède deux domaines Ig de type C2 N-terminaux associés à un seul domaine transmembranaire et à une région cytoplasmique possédant des résidus aminés hautement chargés. La

queue cytoplasmique est dépourvue de tout motif de signalisation. Néanmoins, une arginine située au niveau du domaine transmembranaire permet au récepteur NKp46 de s'associer aux protéines adaptatrices CD3 $\zeta$  et FcR $\gamma$  qui peuvent activer les cellules NK via leurs motifs ITAM. Le NKp46 interagit avec une large variété de ligands d'origine bactérienne, parasitaire ou virale, à des ligands cellulaires. Il a été démontré que NKp46 possède des ligands bactériens, tels que la vimentine exprimée à la surface des cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis* et des ligands d'origine parasitaire, telle que la protéine membranaire des érythrocytes de *Plasmodium falciparum* (PfEMP1) (Chen et al., 2020). Les ligands de NKp46 comprennent les ligands des cellules tumorales, tels que des ligands du mélanome et du myélome même si un grand nombre de ces ligands reste encore inconnu. Bien qu'il ait été montré l'importance des récepteurs de la famille NCR dans la lyse des cellules tumorales, les premiers ligands identifiés pour cette famille de récepteurs étaient des protéines virales tels que l'hémagglutinine (HA), l'hémagglutinine neuraminidase (HN). L'expression du récepteur NKp46 est liée à l'effet cytotoxique des cellules NK. En effet, la liaison de NKp46 avec son ligand peut favoriser la cytotoxicité des cellules NK, augmenter la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  participant au processus d'immunité anti-infectieuse et de destruction des cellules tumorales (Chen et al., 2020).

Contrairement à NKp46 et NKp30, le récepteur NKp44 est exprimé uniquement à la surface des cellules NK activées (Vitale et al., 1998). Cependant, l'expression de NKp44 peut également être retrouvée sur d'autres cellules telles que les cellules NK déciduales et un sous-ensemble de DC plasmacytoïdes. Le récepteur NKp44 est composé d'un seul domaine extracellulaire d'Ig de type V, relié à un seul domaine transmembranaire et une courte queue intracytoplasmique contenant un ITIM. Néanmoins, par la lysine chargée positivement dans la région transmembranaire, NKp44 interagit également avec la molécule DAP12 qui transmet des signaux d'activation aux cellules NK (Cantoni et al., 2003). Tout comme NKp46, le récepteur NKp44 possède de nombreux ligands de diverses origines. NKp44 reconnaît des ligands exprimés par les cellules tumorales, tels que l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), le facteur de croissance dérivé des plaquettes DD (PDGF-DD), le nidogen-1 et NKp44L. Il reconnaît également des ligands viraux tels que, HA et HN et des ligands bactériens, tels que des composants de paroi cellulaire de *Mycobacterium tuberculosis*.

Comme NKp46, le récepteur NKp30 est exprimé sur les cellules NK, qu'elles soient activées ou non. De plus, NKp30 peut être exprimé au niveau des LT du sang du cordon en présence l'IL-15 (Li et al., 2011), des cellules T V $\delta$ 1<sup>+</sup> en présence d'IL-2 et IL-15 lors de l'engagement du TCR (Correia et al., 2011). Le récepteur NKp30 est composé d'un domaine d'Ig extracellulaire. Comme NKp46, le domaine intracellulaire de NKp30 ne possède pas de motif de signalisation. Néanmoins, l'homodimère CD3 $\zeta$  et l'hétérodimère CD3 $\zeta$ /FcR $\gamma$  peuvent tous les deux se lier au récepteur NKp30 et ainsi médier l'activation des cellules NK. NKp30 joue également un rôle dans la reconnaissance des cellules tumorales, puisqu'il a pour ligands, les molécules B7-H6, BAG6/BAT3 (BCL2-associated athanogene 6/nuclear HLA-B-associated transcript-3 protein) et galectine-3 exprimées sur les cellules tumorales. Comme pour NKp46, les récepteurs NKp44 reconnaissent des ligands viraux, tels que HA du virus de la vaccine et du poxvirus et pp65 du CMV humain et des ligands parasites, tels que PfEMP1. De plus, tous les NCR, y compris NKp30, peuvent reconnaître les glycosaminoglycanes d'héparine sulfate (HS-GAG) qui sont considérablement surexprimés à la surface des cellules tumorales.

## **2.6. Le récepteur CD16 (Fc $\gamma$ RIIIa)**

Le récepteur CD16, également connu sous le nom de Fc $\gamma$ RIII, est exprimé à la surface des NK, des neutrophiles, des monocytes, des macrophages et quelques sous populations de LT $\gamma$  $\delta$  (Angelini et al., 2004; Clémenceau et al., 2008; Lafont et al., 2001). Le CD16 est une molécule de la superfamille des immunoglobulines (IgSF) qui comprend deux récepteurs Fc, Fc $\gamma$ RIIIa (CD16a) et Fc $\gamma$ RIIIb (CD16b) (Vivier et al., 1991).

Le récepteur CD16 est impliqué dans le déclenchement de la lyse par les cellules NK par la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). C'est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG (Koene et al., 1997). Le CD16 peut être associé à différents hétérodimères permettant la transduction du signal. En effet, le récepteur CD16 peut se lier avec des homodimères de TCR $\zeta$  (CD247) contenant 3 motifs ITAMs, avec des homodimères de la protéine adaptatrice FcR $\gamma$  (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ) contenant un seul motif ITAM ou avec les deux hétérodimères à la fois TCR $\zeta$ /Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  (Blázquez-Moreno et al., 2017). L'engagement du CD16 avec les fragments Fc des Ac entraîne la phosphorylation des motifs ITAM permettant le recrutement des protéines kinase Src qui aboutira à

l'activation de la cytotoxicité des cellules NK par ADCC (Sánchez-Mejorada and Rosales, 1998). Le CD16 sur les cellules NK humaines induit l'expression de récepteurs de surface tels que l'IL-2-R (CD25) et la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IFN-gamma et le TNF (Anegón et al., 1988). Pour finir, le récepteur CD16 représente une cible possible en immunothérapie anticancéreuse à l'aide d'AcM ou de bispecific NK cell engage (BiKE), tels que les anti-CD19/CD16 utilisés dans les lymphomes B (Schrama et al., 2006) qui sera détaillé dans le paragraphe VI.2 « Exploitation de l'ADCC avec les anticorps monoclonaux, les BiKE et les TriKE ».

## **2.7. Autres récepteurs NK**

### **2.7.1. Les Toll-Like Receptors (TLR)**

La famille des récepteurs de type Toll (TLR) se compose de 10 récepteurs reconnaissants chacun des ligands spécifiques de composants microbiens, appelés PAMP. La reconnaissance TLR des PAMP conduit à l'activation du système immunitaire inné. Plus particulièrement, la reconnaissance des PAMP par les TLR active la fonction cytotoxique des cellules NK et va également permettre le recrutement des lymphocytes circulants sur le lieu de l'infection (Kawai and Akira, 2011). Les voies de signalisation médiées par les TLR se composent de la voie dépendante de MyD88 et de la voie dépendante du TRIF, qui induisent toutes deux l'expression de cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-12 (Akira and Takeda, 2004). Enfin, ces récepteurs sont également impliqués dans la réaction croisée entre les cellules NK et les DC (Ferlazzo et al., 2004; Vivier et al., 2008). En effet, la reconnaissance des PAMP par les TLR3 exprimés sur les DC, induit une libération d'IL-2 qui va activer la cytotoxicité des NK vis-à-vis des DC. Cette augmentation de la cytotoxicité contre les DC permet aux cellules NK de tuer les DC immatures et d'assurer la survie sélective des DC matures.

### **2.7.2. Le récepteur 2B4**

Le récepteur 2B4 (SLAMF4, CD244) est un membre de la molécule d'activation des lymphocytes de signalisation (SLAM), faisant partie de la superfamille des Ig. Le récepteur 2B4 est exprimé à la surface des cellules de l'immunité telles que les NK, un sous-ensemble de cellules T CD8+, les cellules T  $\gamma\delta$ , les monocytes, les basophiles, les éosinophiles et dans divers tissus, comme la rate et les ganglions

lymphatiques. Chez l'Homme, le récepteur 2B4 est constitué d'un domaine extracellulaire N-terminal, d'un domaine de type Ig de type variable (IgV), d'un domaine de type Ig constant 2 types (IgC2), d'un domaine transmembranaire unique et d'une queue cytoplasmique contenant trois motifs de tyrosine. La queue cytoplasmique de 2B4 contient des motifs de commutation à base de tyrosine (ITSM - Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif), les motifs de commutation peuvent véhiculer un signal d'activation ou d'inhibition, selon le type de cellules immunitaires, le récepteur et la protéine liée (Ostrakhovitch and Li, 2006). L'ITSM présent sur le récepteur 2B4 se lie au SAP et envoie des signaux d'activation. Cependant, en l'absence de SAP, SHP1/SHP2 ou EAT2 se lie à l'ITSM et entraîne un signal inhibiteur (Veillette and Latour, 2003). Le récepteur 2B4 a pour ligand la molécule CD48, appartenant au glycoposphatidylinositol (GPI) de la famille CD2 et est exprimé par toutes les cellules hématopoïétiques. Une étude a montré que l'expression du ligand CD48 est liée à la progression de la tumeur telle que le mélanome B16 (Vaidya et al., 2005), à une immunosuppression ainsi qu'à des réponses inflammatoires. L'expression de CD48 au niveau des tumeurs montre l'importance du rôle du récepteur 2B4 dans l'activité antitumorale.

### **2.7.3. Le récepteur DNAM-1**

Chez l'homme, DNAM-1 est exprimé sur la majorité des monocytes, des cellules T et des cellules NK ainsi que sur un sous-ensemble de cellules B (Fuchs and Colonna, 2006; Shibuya et al., 1996). DNAM-1 est un membre de la superfamille des récepteurs Ig. DNAM-1 est constitué de deux domaines extracellulaires de type Ig et d'une partie intracytoplasmique contenant un résidu tyrosine impliqué dans la signalisation. DNAM-1 a pour ligands deux membres de la famille nectin/Necl de la superfamille des Ig : Necl-5, (PVR, CD155), et nectine-2 (PRR2, CD112) (Bottino et al., 2003). Ces deux ligands sont exprimés sur les cellules infectées par un virus ou sur les cellules tumorales d'origine épithéliale et neurologique (Bottino et al., 2003). Dans les cellules NK et les CTL, l'engagement de DNAM-1 avec son ligand induit une forte cytotoxicité ainsi que la production de cytokines (Shibuya et al., 1998). Le DNAM-1 pourrait ainsi agir comme un récepteur de surveillance tumorale pour les cellules NK.



#### **2.7.4. Les récepteurs de costimulation et les molécules d'adhésion**

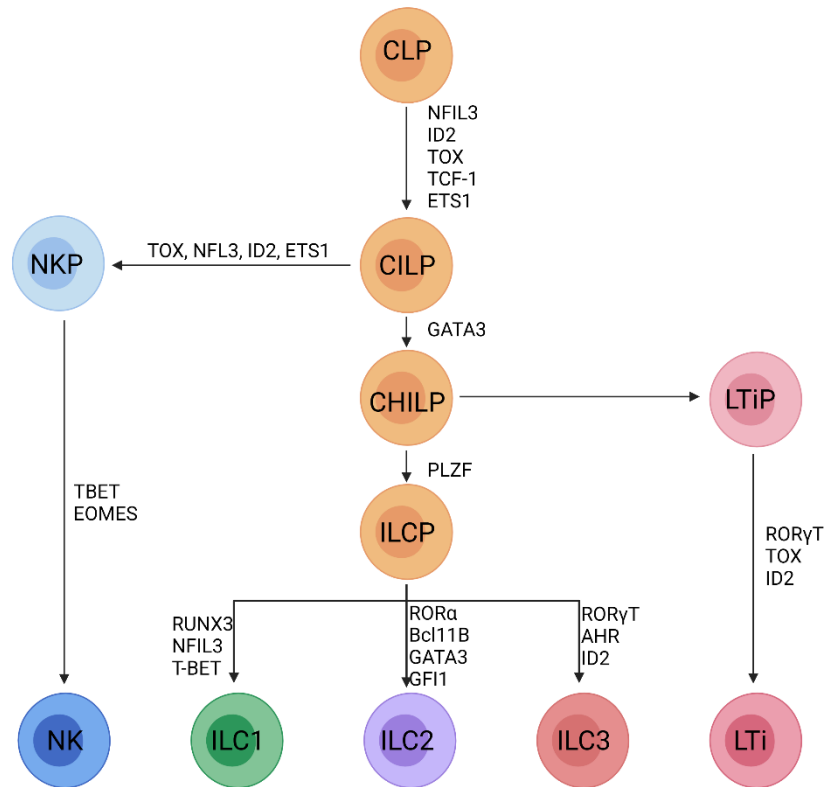
En plus de tous ces récepteurs NK mentionnés jusqu'à présent, les cellules NK expriment également plusieurs récepteurs de costimulation. Le rôle de ces récepteurs est de renforcer et d'amplifier l'activation des cellules NK médiée par d'autres récepteurs NK tels que les NCR, DNAM-1 ou encore NKG2D. On peut citer un grand nombre de récepteurs de co-stimulation et d'adhésion tels que : CD48 et CD58 (LFA-3) qui ont pour ligand la molécule CD2, CD28 reconnaît la molécule CD80 (B7-1), CTLA4 reconnaît CD86 (B7-2), OX40 a pour ligand OX40L, CD27 reconnaît CD70, LFA-1 reconnaît la molécule ICAM-1 et NKp80 a pour ligand la molécule AICL (activation-induced C-type lectine). Enfin le récepteur NTB-A (NK-T-B antigène) qui est un membre de la famille SLAM. Ce récepteur est détecté à la surface de toutes les cellules NK, des LT et B (Chen et al., 2020). NTB-A, comme le récepteur 2B4, reconnaît les molécules HA du virus influenza (Duev-Cohen et al., 2016).

#### **2.7.5. Les récepteurs de cytokines**

La famille de cytokines portant une chaîne  $\gamma$  commune ( $\gamma_c$  ou CD132), joue un rôle essentiel dans l'activation et la régulation de l'immunité adaptative et innée. La chaîne  $\gamma_c$  est une glycoprotéine transmembranaire de type I servant de sous-unité de signalisation pour les cytokines IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 et IL-21 (Boulanger and Garcia, 2004). Chacune de ces cytokines se lie à un récepteur (IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL9R, IL-15R et l'IL-21R) de haute affinité spécifique de la chaîne  $\gamma_c$  (Takeshita et al., 1992). Les complexes IL-2R et IL-15R possèdent chacun une chaîne  $\gamma_c$  spécifique et partagent la même chaîne  $\beta$ , l'IL-2R $\beta$  (CD122) (Bamford et al., 1994). Les cellules NK expriment des récepteurs de cytokines au début de leur développement qui sont nécessaires pour leur maturation, leur homéostasie et leurs fonctions (Meazza et al., 2011; Rosmaraki et al., 2001). En particulier, l'IL-2R $\alpha$  (CD25) est exprimé sur les cellules NK activées et augmente considérablement leur affinité pour l'IL-2 ce qui entraîne leur prolifération et la production de molécules lytiques telles que la perforine et le Granzyme B (Gasteiger et al., 2013).

### 3. Le développement des cellules NK

Les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) cependant, des sites de développement autres que la MO ont été trouvés. En effet, des populations présentant le même profil que les CSH CD34+ dans les tissus et le sang périphérique ainsi que dans le foie et l'utérus (Freud and Caligiuri, 2006; Male et al., 2010). Dans la MO, les CSH CD34+ se développent en progéniteurs communs lymphoïdes (CLP). Les CLP sont des progéniteurs hématopoïétiques capables de générer les LT et B, et les cellules lymphoïdes innées (ILC) (Scoville et al., 2019). Cette différenciation nécessite une interaction avec les cellules stromales et la présence de facteurs de croissance comme SCF (stem cell factor), de l'IL-7 et du ligand FLT3L (fms-like tyrosine kinase 3 ligands) (Di Santo and Vosshenrich, 2006). Après cette différenciation, les CLP vont se différencier en progéniteurs lymphoïdes innés communs (CILP) partagés par les ILC et les cellules NK (Artis and Spits, 2015). Durant la dernière décennie, les cellules lymphoïdes innées (ILC) ont été identifiées. En fonction de leur développement et de leurs fonctions, les ILC ont été classés en 5 sous-populations : NK, ILC1, ILC2, ILC3 et LTi (Vivier et al., 2018) (**Figure 13**). Les cellules NK vont avoir une fonction similaire aux LT CD8+ alors que les ILC1, ILC2 et ILC3 vont avoir une fonction semblable aux cellules Th. Plus particulièrement, les cellules ILC1 et Th1 vont réagir face aux agents pathogènes intracellulaires alors que les cellules ILC2 et Th2 ciblent les parasites extracellulaires et les cellules ILC3 et Th17 ciblent les micro-organismes extracellulaires, tels que les bactéries et les champignons (Vivier et al., 2018).

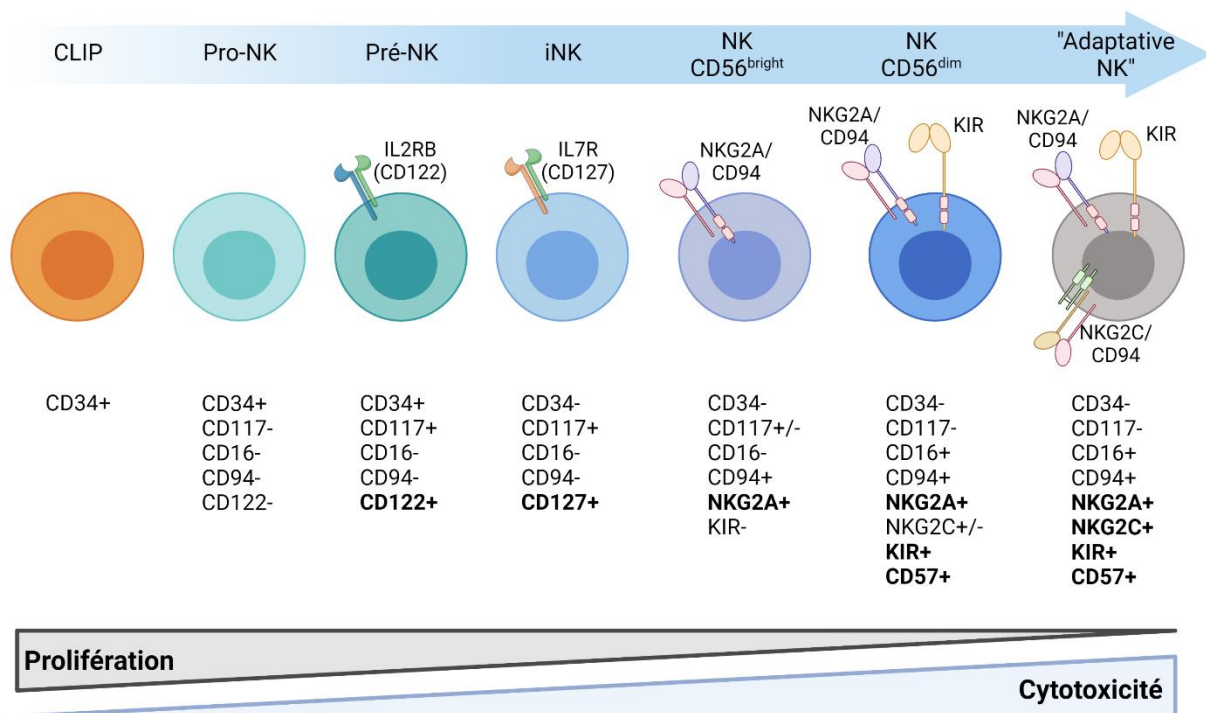


**Figure 13 : Classification de cellules Lymphoïdes Innées (ILC)**

Les ILC se développent à partir des CILP (progéniteurs lymphoïdes innés communs) qui se différencient eux-mêmes à partir des CLP (progéniteurs lymphoïdes communs). Les CILP peuvent se différencier en cellules précurseurs des cellules NK (NKP) ou en CHILP (progéniteurs lymphoïdes innés auxiliaires communs). Les CHILP peuvent se différencier en LTiP (progéniteurs inducteurs de tissu lymphoïde) ou en ILCP (précurseurs de cellules lymphoïdes innées). Les LTiP se différencient en LTi et les ILCP sont capables de se différencier en ILC1, ILC2 ou ILC3. Chaque étape de différenciation est dépendante des facteurs de transcription indiqués. Inspirée de (Vivier et al., 2018).

Après la différenciation en CILP, cinq stades différents de développement des cellules NK ont été établis par Freud et Caligiuri (Freud and Caligiuri, 2006) (**Figure 14**) : le premier stade correspond à la différenciation des CLIP en progéniteurs des cellules NK ou « pro-NK ». Elles présentent un phénotype CD34<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD94<sup>-</sup> CD117<sup>-</sup>. Ces cellules n'expriment pas de CD122 et ne répondent donc pas à l'IL-2 et l'IL-15. L'IL-15 est une cytokine importante pour le développement des cellules NK puisqu'elle induit la différenciation et la maturation de cellules souches CD34<sup>+</sup> en cellules NK CD56<sup>bright</sup>. Le second stade correspond à la différenciation en précurseurs NK ou « pré-NK ». Elles se caractérisent par un phénotype CD34<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD94<sup>-</sup> CD117<sup>+</sup> & CD122<sup>+</sup>. Ces cellules NK ont acquis le marqueur CD122 et sont donc capables de répondre à l'IL-2 et l'IL-15. De plus, ces cellules

sont capables d'exprimer le récepteur CD161. Le récepteur CD161 reconnaît la molécule LLT1 (lectine-like transcript-1) exprimée sur les cellules tumorales de lymphome non hodgkinien (Braud et al., 2018; Montaldo et al., 2012). Le troisième stade est la transition en cellules NK immatures ou « iNK ». Elles se caractérisent par la perte des marqueurs CD34 et CD45RA et par l'acquisition progressive de récepteurs activateurs tels que NKG2D, NKp30 et NKp46. À ce stade, les cellules NK ne sont pas capables de cytotoxicité. Les cellules capables de répondre à l'IL-15 vont acquérir séquentiellement le récepteur CD56 marquant la différenciation des cellules iNK en cellules NK CD56<sup>bright</sup>, c'est le quatrième stade. Les cellules CD56<sup>bright</sup> présentent des récepteurs activateurs tels que le NKG2D, le NKp30 et NKp46 et présentent également le CD94/NKG2A comme seul récepteur inhibiteur. Ces cellules sont maintenant capables de produire de l'IFN $\gamma$  et sont douées de cytotoxicité naturelle via l'expression de perforine et de Fas-ligand (Fas-L). Lors du cinquième stade, les cellules NK nommées cellules NK CD56<sup>dim</sup> vont avoir une expression du CD56 plus faible. Ces cellules se caractérisent par la perte d'expression des marqueurs CD117 et CD127 et par l'acquisition du CD16, CD94/NKG2C et des récepteurs KIR (Killer Immunoglobuline like-receptors). Elles représentent la population la plus cytotoxique face à une cible. Enfin, les cellules NK vont acquérir l'expression du CD57, marqueur de sénescence qui caractérise les cellules NK en phase terminale (Björkström et al., 2010).



**Figure 14 : Développement des cellules NK**

Dans ce modèle de développement, les cellules NK se différencient à partir des CILP (progéniteur lymphoïde commun). Les CILP se différencient en progéniteurs des cellules NK ou « pro-NK ». Puis, les pro-NK se différencient en pré-NK qui deviennent ensuite des cellules NK immatures (iNK). Après ces stades, les cellules NK acquièrent leur fonctionnalité et leur capacité de production de cytokines. Les cellules NK CD56<sup>bright</sup> sont caractérisées par leur capacité de cytotoxicité faible et d'une capacité de prolifération et de production de cytokines augmentée. Les cellules NK CD56<sup>dim</sup> sont caractérisées par leur capacité de cytotoxicité élevée et d'une faible capacité de prolifération et de production de cytokines. La différenciation en cellules NK "adaptatives" ou "memory-like NK" se produit en réponse à une infection par le CMV, caractérisée par une expansion clonale des sous-populations NK NKG2C<sup>+</sup> éduquées et plus différenciées KIR2DL<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>. Inspirée de (Cichocki et al., 2009).

#### 4. Éducation fonctionnelle des cellules NK

L'éducation des cellules NK est un processus permettant aux cellules NK d'acquérir des capacités fonctionnelles et une tolérance au soi. Ce phénomène est régi par des interactions entre les récepteurs inhibiteurs des cellules NK avec leurs ligands (He and Tian, 2017). Le processus d'éducation des cellules NK est régulé par des signaux inhibiteurs et activateurs. Chez l'Homme, l'éducation fonctionnelle des cellules NK est régulée principalement par les récepteurs KIR inhibiteurs qui reconnaissent les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C. Cependant, les récepteurs CD94/NKG2A

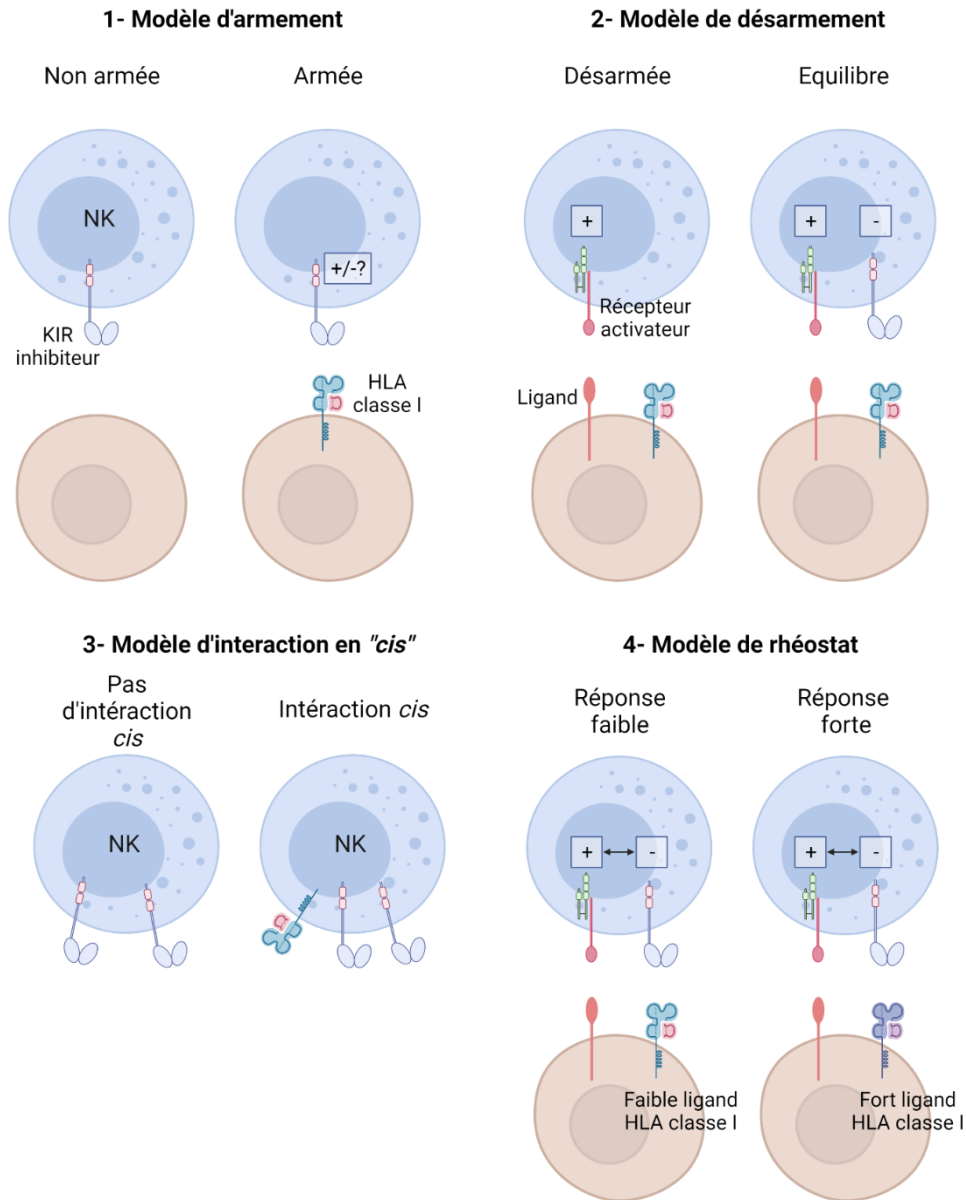
jouent également un rôle dans l'éducation des cellules NK. En effet, ces récepteurs CD94/NKG2A sont les premiers récepteurs inhibiteurs reconnaissant les molécules HLA-E à être exprimés sur les cellules NK au cours de leur différenciation avant les récepteurs KIR. À la fin du processus "d'éducation", seules les cellules NK matures exprimant au moins un récepteur KIR spécifique des molécules HLA de classe I du soi seront complètement "éduquées", et les cellules NK n'ayant pas de ligands KIR seront considérées comme "non éduquées" (Anfossi et al., 2006; Kim et al., 2005). Le phénomène de licensing permet une réponse antitumorale et antivirale et la tolérance au soi, régulées principalement par les KIR inhibiteurs reconnaissant les molécules HLA Ia et NKG2A/HLA-E. Des études démontrent l'importance des récepteurs KIR inhibiteurs dans l'éducation des cellules NK, en particulier des récepteurs KIR2DL1/2 (Anfossi et al., 2006) et KIR3DL1 (Boudreau et al., 2016; Pugh et al., 2019; Yawata et al., 2006).

De nos jours, plusieurs théories et concepts sont proposés pour expliquer le phénomène d'éducation des cellules NK. On dénombre 4 modèles d'éducation des cellules NK permettant le développement fonctionnel et la tolérance au soi des cellules NK (Höglund and Brodin, 2010) (**Figure 15**): le premier modèle est le modèle « Arming » ou « licensing » qui consiste à l'engagement d'un récepteur inhibiteur avec une molécule CMH de classe I du soi, cet engagement « éduque » les cellules NK pour devenir fonctionnellement compétentes. À l'inverse, l'absence d'engagement du récepteur inhibiteur avec son ligand induit des cellules NK dites « non éduquées » (Kim et al., 2005; Yokoyama and Kim, 2006). Dans ce modèle, l'éducation des cellules NK KIR+ permet à ces cellules de discriminer les cellules saines présentant un niveau d'expression normal de molécules HLA de classe I en surface, de celles présentant un défaut ou une diminution du niveau d'expression des molécules HLA de classe I, faisant ainsi référence à la théorie du « missing-self » (Kärre, 2008).

Le second modèle est le « modèle de désarmement », il est basé sur l'existence de cellules NK dépourvues de récepteur inhibiteur reconnaissant les molécules CMH de classe I (Fernandez et al., 2005). Dans ce modèle, les cellules NK sont activées par « défaut » et vont devenir anergiques ou hyporéactives due à l'absence d'un récepteur inhibiteur (Höglund and Brodin, 2010; Raulet and Vance,

2006). Il est mentionné que la reconnaissance des cellules NK immatures sans récepteur inhibiteur avec des cellules du soi bloquerait la maturation des NK et qu'elles resteraient hyporéactives.

Le troisième modèle est le modèle *cis*-interaction, il a été défini à partir de souris ne possédant pas de récepteurs KIR, mais des récepteurs Ly49 ayant les mêmes fonctions et les mêmes ligands que les KIR inhibiteurs. Ce modèle est basé sur la capacité des récepteurs Ly49 à se lier aux molécules CMH de classe I en *cis* soit sur une même membrane cellulaire (Chalifour et al., 2009). Les récepteurs Ly49 sont ainsi clustérisés par leurs interactions avec les molécules CMH de classe I empêchant leur déplacement vers la synapse immunologique. En conséquence, l'influence inhibitrice des récepteurs Ly49 dans la réponse est diminuée et les cellules NK auront une meilleure réponse. Récemment, la littérature a démontré que les interactions KIR-HLA en *cis* pouvaient également être observées chez l'Homme (Boudreau et al., 2016). À l'inverse des récepteurs Ly49, les KIR n'ont pas de tige flexible. Il a été proposé que ces interactions *cis* entre les molécules HLA et les récepteurs KIR se produisent dans les endosomes (Li et al., 2008). Enfin, le dernier modèle d'éducation des cellules NK, appelé le modèle de rhéostat (Brodin and Höglund, 2008; Joncker et al., 2009), repose sur la force du signal inhibiteur reçu par l'ensemble des récepteurs engagés dans la synapse immunologique. Cette force de signal peut donner une réactivité accrue ou diminuée aux cellules NK, suggérant une notion quantitative. Ce modèle est basé sur les modèles d'armement ou désarmement, mais de manière quantitative plutôt que binaire comme décrits plus haut.



**Figure 15 : Modèles d'éducation des cellules NK**

Dans le modèle d'armement (1), l'engagement des récepteurs inhibiteurs avec les molécules HLA de classe I induit l'acquisition des capacités fonctionnelles des cellules NK. Dans le modèle de désarmement (2), l'interaction des récepteurs activateurs et l'absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs conduit à une anergie des cellules NK. Les cellules redeviennent réactives suite à l'engagement avec les molécules HLA de classe I. Dans le modèle d'interaction-cis (3), les récepteurs inhibiteurs peuvent se lier aux molécules HLA de classe I exprimées à la surface de la cellule NK elle-même. Enfin, dans le modèle de rhéostat (4), les capacités des réponses des cellules NK dépendent de la force du signal inhibiteur. Inspirée de (Höglund and Brodin, 2010).

Ces quatre modèles d'éducation fonctionnelle des cellules NK sont basés essentiellement sur les récepteurs inhibiteurs, mais les récepteurs activateurs pourraient jouer un rôle. Ainsi, le KIR2DS1 est le

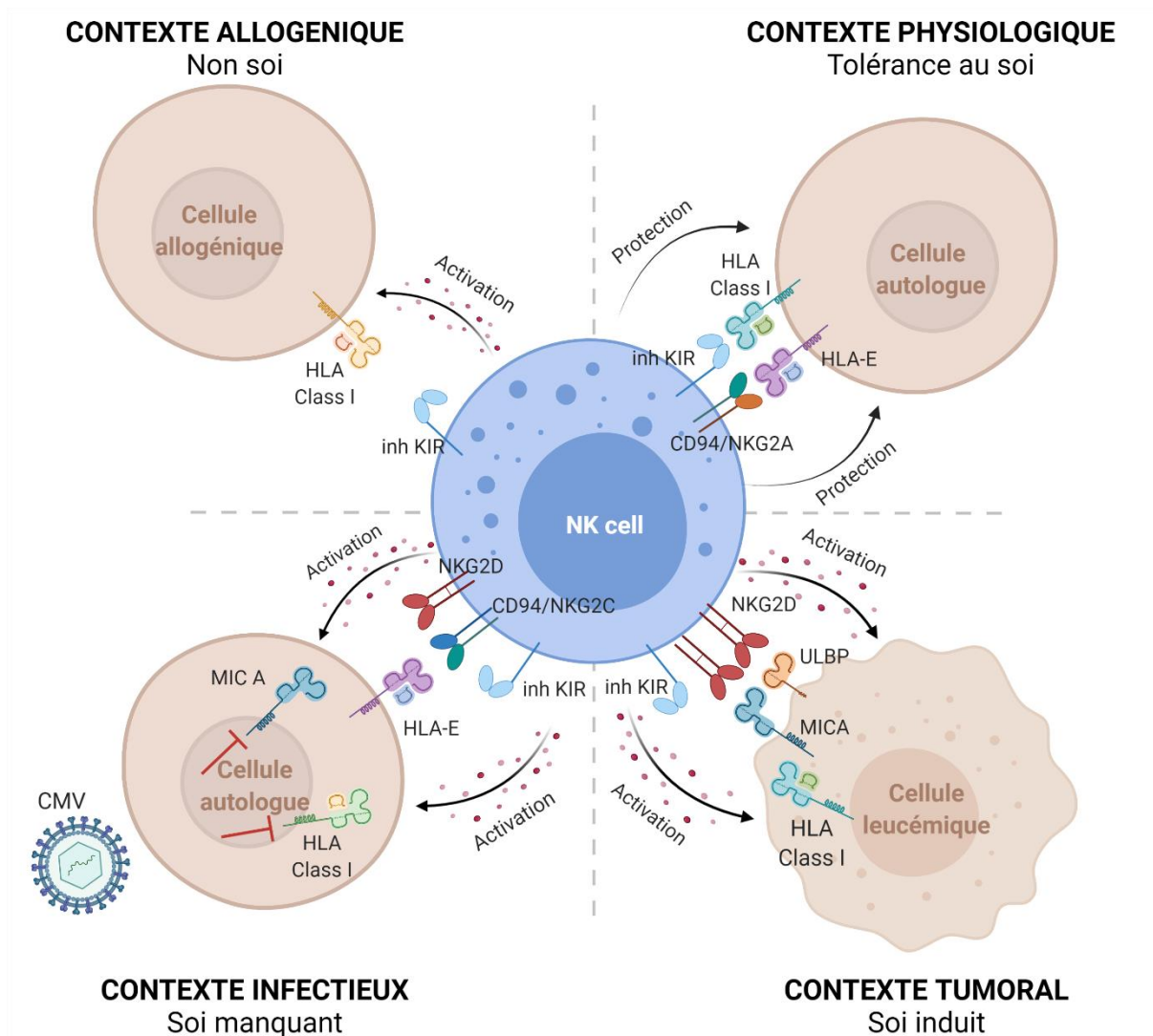


mieux décrit comme KIR activateur participant à l'éducation des cellules NK. Les cellules NK KIR2DS1+ sont alloréactives vis-à-vis de cellules possédant une molécule HLA-C du groupe C2 seulement lorsqu'elles sont issues d'individus C2- (David et al., 2009). En effet, les cellules NK KIR2DS1+ deviennent anergiques chez les individus C2+ à cause de l'exposition forte et prolongée du KIR2DS1 avec le ligand C2 exprimé à la surface des cellules autologues (Fauriat et al., 2010) permettant de limiter une réponse immunitaire autoréactive.

## **IV) Rôles des cellules NK dans l'immunité**

### **1. Les fonctions des cellules NK**

Les cellules NK permettent une élimination des cellules infectées par des virus, des cellules tumorales et des cellules allogéniques par différents mécanismes tels que la production de cytokines, la cytotoxicité naturelle ou encore l'ADCC. La cytotoxicité des cellules NK face aux cellules infectées par un virus ou cellules tumorales résulte d'une synapse immunologique intégrant plusieurs récepteurs activateurs et inhibiteurs. Les cellules NK lysent leurs cibles par la reconnaissance du soi manquant ou altéré (théorie du missing-self), du soi induit ou encore la reconnaissance du non-soi infectieux (**Figure 16**). Dans ce chapitre, nous allons décrire les fonctions majeures des cellules NK ainsi que leurs rôles dans l'immunité antivirale, grossesse et immunité antitumorale.



**Figure 16 : Activation des cellules NK dans différents contextes**

Dans un contexte physiologique, la reconnaissance du "soi" implique principalement des interactions entre les récepteurs inhibiteurs polymorphes de type immunoglobuline présents au niveau des cellules NK (inh KIR) et les molécules HLA de classe I classiques, ainsi que des interactions entre l'hétérodimère CD94/NKG2A et la molécule HLA-E non classique. Dans un contexte allogénique, les récepteurs KIR peuvent reconnaître des molécules HLA différentes du soi conduisant à l'activation des cellules NK. Dans un contexte tumoral ou d'infections virales, l'absence d'expression des molécules HLA de classe I du soi ou « soi manquant » conduit à l'activation des cellules NK qui vont lyser les cellules cibles. L'absence d'interaction des KIRs inh. avec leurs ligands HLA de classe I ou de CD94-NKG2A avec HLA-E induit l'activation de la lyse des cellules NK. En plus des interactions KIR/ligands KIR, les interactions du ligand MICA induit, du ligand ULBP exprimé sur les cellules tumorales ou de la molécule HLA-E en activant respectivement les récepteurs NKG2D ou CD94/NKG2C peuvent activer la lyse des cellules NK.

Le déficit en cellules NK (NKD) représente un sous-ensemble des maladies d'immunodéficience primaire (MIP) (Bonilla et al., 2005). Pour être considéré comme un NKD, l'impact sur les cellules NK

doit représenter l'anomalie immunologique majeure chez le patient. Le NKD peut être divisé en deux types principaux selon que les cellules NK sont présentes ou non dans le sang périphérique (Orange, 2012). Le NKD classique (CNKD) est défini comme l'absence de cellules NK et leur fonction parmi les lymphocytes du sang périphérique. Le NKD fonctionnel (FNKD) est défini comme la présence de cellules NK dans les lymphocytes du sang périphérique, ayant une activité cellulaire défectueuse. En d'autres termes, dans un contexte de CNKD, les cellules NK sont absentes tandis que dans un contexte de FNKD, les cellules NK sont présentes, mais ne sont pas fonctionnelles. Les CNKD et FNKD vont être subdivisés en fonction du gène particulier qui est responsable du phénotype lorsqu'il est identifié. À ce jour, trois gènes ont été identifiés, deux gènes pour le CKND qui sont GATA2 (Mace et al., 2013) et MCM4 (Gineau et al., 2012) et un gène pour le FNKD qui est FCGR3A (de Vries et al., 1996; Grier et al., 2012; JAWAHAR et al., 1996). L'étude des personnes atteintes de NKD a permis de montrer l'importance et les différentes fonctions des cellules NK au sein de l'immunité (Orange, 2013, 2002). En particulier, plusieurs études ont montré que les personnes atteintes de NKD ont une plus grande sensibilité aux infections à *Herpesvirus* et *papillomavirus* (Biron et al., 1989; Etzioni et al., 2005; Hsu et al., 2011; Lopez et al., 1983; Mace et al., 2013; Notarangelo and Mazzolari, 2006; Ornstein et al., 2013; Vinh et al., 2010). Divers traitements ont été appliqués aux patients atteints de CNKD et de FNKD. La majorité des approches thérapeutiques se sont focalisées sur l'administration de médicaments antiviraux prophylactiques pour prévenir des infections au virus de l'Herpès (Biron et al., 1989; Etzioni et al., 2005; JAWAHAR et al., 1996; Ornstein et al., 2013). L'administration cytokine a également été décrite, soit pour un effet antiviral, soit pour un effet direct sur les cellules NK (Mace et al., 2013). Enfin, pour les patients dont la déficience est perçue comme mettant la vie du patient en danger, une greffe de cellules souches hématopoïétiques peut être une option. Cela a été appliqué avec succès dans CNKD1 (Cuellar-Rodriguez et al., 2011), ainsi que dans CNKD autrement non défini (Notarangelo and Mazzolari, 2006).

### **1.1. Prolifération des cellules NK**

Plusieurs cytokines peuvent stimuler la prolifération des cellules NK telles que l'IL-15, l'IL-2 et l'IL-21. L'IL-2 est le premier membre identifié de la famille des cytokines  $\gamma$ . Elle est produite par les

LT CD4+, les LT CD8+, les cellules NK et les cellules NKT (Sim and Radvanyi, 2014). L'IL-2 se lie au récepteur de l'IL-2, qui se compose de trois sous-unités IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$  et IL-2R $\gamma$ . L'IL-2 joue un rôle crucial dans la prolifération des cellules NK. Plus particulièrement, il a été rapporté que l'IL-2 favorise la maturation fonctionnelle des cellules NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup>, induisant ainsi l'expression des récepteurs KIR, CD16, NCR et de la perforine (Kim et al., 2006). En plus de jouer un rôle dans la prolifération des cellules NK, l'IL-2 intervient également dans la régulation des fonctions effectrices des cellules NK, telles que l'activité cytolytique et la production de cytokines. L'IL-15 constitue la principale cytokine permettant l'homéostasie et la survie des cellules NK. Elle est produite par les DC activées et les macrophages. Contrairement à d'autres cytokines qui exercent leurs fonctions en tant que protéines solubles, l'IL-15 est liée sur les CPA exprimant IL-15R $\alpha$ . L'IL-15R $\alpha$  présente l'IL-15 aux cellules NK exprimant les sous-unités IL-15R $\beta$  (Dubois et al., 2002). D'un point de vue fonctionnel, l'IL-15 est connue pour être étroitement liée à l'IL-2, puisque comme l'IL-2, l'IL-15 permet d'induire, l'activation des cellules NK, la production de cytokines, ainsi que le maintien de l'homéostasie et de la survie des cellules NK. Cependant, il a été démontré que l'IL-15 induit une réponse proliférative améliorée des cellules NK par rapport à l'IL-2 (Sun et al., 2003). Dans les immunothérapies anticancéreuses utilisant des cellules NK adoptives qui sera détaillé chapitre VI.4, l'IL-2 et l'IL-15 peuvent être utilisées pour l'expansion et l'activation des cellules NK *in vitro* avant le transfert (Meghnam et al., 2017). Bien que l'IL-2 soit la plus largement utilisée en clinique, la stimulation par l'IL-15 permettrait aux cellules NK d'afficher des performances cytolytiques supérieures et induirait une population de cellules NK de type mémoire.

Pour finir, la dernière interleukine impliquée dans la prolifération des cellules NK est l'IL-21. En effet, l'IL-21 en synergie avec l'IL-15 montre une expansion des cellules NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> à partir de cellules progénitrices hématopoïétiques de la moelle osseuse (Parrish-Novak et al., 2000). De plus, l'IL-21 potentialise l'expansion induite par l'IL-15 des cellules NK à partir des CSH de la MO ou du sang périphérique et favorise l'activation fonctionnelle de ces mêmes cellules par augmentation de la réponse cytotoxique des cellules NK CD56<sup>+</sup> CD16<sup>-</sup> (Parrish-Novak et al., 2000).

## **1.2. Production de cytokines par les cellules NK**

Un autre rôle des cellules NK est la production de cytokines permettant de recruter et d'activer les cellules de l'immunité innée et adaptative sur les sites inflammatoires et tumoraux. La principale cytokine produite par les cellules NK est l'IFN- $\gamma$ . L'IFN- $\gamma$  est un interféron de type II qui joue un rôle dans le développement de résistance des infections microbiennes à l'hôte et dans la protection contre le développement des tumeurs (Cooper et al., 2001). Elle induit la maturation des DC et polarise les cellules T vers un phénotype Th1 (Ferlazzo et al., 2004; Vivier et al., 2008). Les cellules NK pourraient polariser directement les cellules T (Parronchi et al., 1992) ou modifier les CD pour qu'elles deviennent des inducteurs de l'immunité Th1 (Mailliard et al., 2003). Les cellules NK peuvent également sécréter différents facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor). Le rôle du TNF- $\alpha$  est d'activer la prolifération des LB et d'activer la différenciation des monocytes et des macrophages (Higuchi et al., 1997). En plus de l'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ , les cellules NK sécrètent des cytokines immunorégulatrices comme l'IL-5, IL-8, IL-10, IL-13 et des facteurs de croissance comme le GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor), le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) et l'IL-3 sont (Cooper et al., 2001). Ensemble, ces cytokines vont permettre dans un environnement inflammatoire et tumoral d'induire la prolifération et l'activation des cellules de l'immunité innée et adaptative. Enfin, les cellules NK produisent également des cytokines chimiotactiques telles que MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, la lymphotoxine, et l'IL-8. Ces cytokines chimiotactiques sont impliquées dans le recrutement des différentes cellules de l'immunité innée et adaptative sur les sites inflammatoires et tumoraux (Fauriat et al., 2010).

Bien que les cellules NK sécrètent un large panel de cytokines, elles doivent dans un premier temps être activées pour remplir cette fonction. Dans un contexte infectieux, les cellules NK peuvent être activées par divers agents pathogènes ou par des ligands TLR. Néanmoins, une coopération entre les cellules NK et les DC est nécessaire. En effet, les DC constituent une source de cytokines connues pour déclencher les fonctions des cellules NK, telles que l'IL-12, l'IL-18, l'IL-15 et les interférons de type I. Des études *in vitro* montrent que l'IL-12 en synergie avec l'IL-18 permet d'induire la production

d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK. Quant à l'IL-15, comme mentionné plus haut, elle est responsable de la prolifération des cellules NK.

### **1.3. Cytotoxicité des cellules NK**

La cytotoxicité est l'une des fonctions principales des cellules NK. La liaison des récepteurs activateurs avec leurs ligands et l'absence de liaison des récepteurs inhibiteurs avec leurs ligands entraîne la formation d'une synapse immunologique lytique aboutissant à l'activation des cellules NK et à la libération de molécules cytotoxiques stockées dans les lysosomes sécrétoires. Les protéines cytotoxiques majeures sont les perforines, les granzymes A et B et les granulysines. Les protéines cytotoxiques sont relarguées par exocytose au niveau de la synapse immunologique. Ce phénomène est appelé dégranulation. Les perforines vont permettre l'entrée des granzymes dans le cytoplasme en créant des pores dans la membrane plasmique. Une fois dans le cytoplasme, les granzymes induisent la mort de la cellule cible par apoptose par la voie des caspases. Les autres protéines permettant une activité cytotoxique des cellules NK sont les protéines de la famille des LAMP (Lysosomal-Associated Membrane Protein) comprenant les molécules LAMP-1 et CD107a. Ces protéines sont libérées à la surface des cellules NK lorsqu'elles reconnaissent l'absence de molécules HLA de classe I au niveau des cellules cibles. Pour les tests fonctionnels évaluant la cytotoxicité naturelle des cellules NK, le marqueur CD107a est souvent utilisé par cytométrie de flux.

Les cellules NK peuvent également tuer les cellules cibles via l'engagement de ligands des récepteurs de mort. Cette voie de cytotoxicité cellulaire est médiée par des récepteurs de la superfamille des TNF-R (Tumor Necrosis Factor) exprimés à la surface des cellules cibles pour induire l'apoptose. Les deux principaux récepteurs TNF sont les récepteurs Fas (CD95) et TRAIL-R (TNF-related apoptosis receptor) (Zamai et al., 1998). Fas et TRAIL-R sont activés, respectivement, par les ligands FasL (CD95L) et TRAIL exprimés à la surface des cellules NK et les CTL (Smyth et al., 2005). L'expression de ces récepteurs à la surface des cellules cibles peut être induite par des cytokines comme l'IL-2, l'IL-15 ou l'INF- $\gamma$  secrétées par les cellules NK activées. Le récepteur Fas est exprimé à la surface de cellules de différents tissus. Cependant, la majorité des cellules tumorales diminue l'expression du récepteur Fas à leur surface ne permettant pas leur élimination par les cellules NK (Reichmann, 2002). Contrairement

au récepteur Fas, le récepteur TRAIL est exprimé à la surface de certaines cellules leucémiques permettant d'induire la lyse spontanée par les cellules NK.

Enfin, une autre voie de cytotoxicité des cellules NK est l'ADCC via l'engagement du récepteur CD16 avec des fragments Fc des IgG. L'ADCC active plusieurs voies de signalisation telles que la voie perforine/granzyme qui vont provoquer la lyse des cellules cibles opsonisées par les anticorps. Elle peut également activer la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires permettant la maturation des DC induisant une initiation de la réponse immunitaire adaptative. De surcroît, l'ADCC des NK est très utilisée en clinique dans le traitement de certains cancers. Pour ce faire, des AcM spécifiques des antigènes tumoraux sont utilisés pour améliorer la fonction ADCC des cellules NK. Cette partie sera davantage détaillée dans le chapitre VI.6.

## **2. Immunité antivirale des cellules NK**

Les cellules NK jouent également un rôle important dans la défense de l'organisme contre les infections virales. En fonction du virus, différents récepteurs NK vont moduler la réponse antivirale. Dans cette partie, nous allons présenter les mécanismes et les récepteurs NK engagés pour répondre à une infection virale en fonction de différents virus.

### **2.1. Cytomégalovirus**

Le CMV est un membre de la famille des virus *Herpesviridae*. Il affecte entre 50 et 98% de la population humaine selon les emplacements géographiques et les milieux socio-économiques. Bien que généralement bénin chez les individus sains, le CMV est préjudiciable pour les personnes immunodéprimées et les nouveau-nés et une infection CMV peut entraîner la mort. Une fois dans l'organisme, le virus reste latent dans l'hôte ponctué par des épisodes de réactivation. Le CMV évite l'élimination par le système immunitaire grâce à une variété de mécanismes d'échappement. Notamment, le CMV possède un ensemble de gènes qui codent pour des molécules qui interfèrent avec l'expression des molécules HLA de classe I à la surface des cellules infectées ou pour des homologues des molécules HLA (Manandhar et al., 2019). Parmi ces molécules, on retrouve les molécules US2, US3, US6 et US11, ce sont des protéines inhibitrices exprimées à différents stades de l'infection. Ensemble, ces protéines



assurent la régulation négative des molécules HLA de classe I pour éviter la reconnaissance par les cellules immunitaires telles que les DC ou encore les LT CD8<sup>+</sup>. Logiquement, cette sous-expression en surface des molécules HLA de classe I devrait déclencher la voie du « soi manquant » par les cellules NK permettant la détection et à l'élimination des cellules infectées par le CMV. Cependant, le CMV a évolué pour exprimer des homologues de certaines molécules HLA de classe I et de peptides, permettant d'inhiber l'activation des cellules NK. La première protéine immuno-évasive codée par le CMV est l'UL18. L'UL18 est un homologue des molécules HLA classe I qui possède une affinité de liaison plus élevée avec le récepteur inhibiteur des cellules NK LIR-1 (Chapman et al., 1999). Des mécanismes inhibiteurs supplémentaires existent tels que la production des protéines UL16 et UL40. L'UL16 agit en inhibant la production de MICA, MICB et de l'ULBP, ligands du récepteur activateur NKG2D. L'UL40 est un peptide produit par le CMV, homologue à la protéine de liaison HLA-E permettant son expression et sa reconnaissance par le récepteur inhibiteur NKG2A. En résumé, au travers de ces différents mécanismes, les cellules infectées par le CMV préservent l'expression à la surface cellulaire des ligands des récepteurs NK inhibiteurs tandis que l'engagement des récepteurs activateurs avec leurs ligands est évité par une régulation négative de leurs ligands. Ces interactions entre l'hôte et le CMV permettent au virus de persister dans le corps et de façonner la réponse immunitaire qui s'ensuit pour la vie.

Chez l'Homme, l'infection chronique par le CMV laisse des empreintes stables sur le répertoire des cellules NK. En particulier, Guma *et al.* ont observé une expansion des cellules NK matures (CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup>) exprimant CD94/NKG2C<sup>+</sup> chez les individus sains séropositifs CMV<sup>+</sup> appelés aussi cellules NK adaptatrices (Gumá et al., 2006). Par rapport aux cellules NK canoniques, ces cellules NK adaptatives possèdent une meilleure fonction d'ADCC, mais ont une cytotoxicité naturelle et une production d'IFN $\gamma$  plus faible. Le récepteur CD94/NKG2C est un récepteur activateur ayant pour ligand la molécule HLA-E, qui comme expliqué dans le paragraphe précédent est exprimé de façon stable à la surface des cellules infectées par le CMV, suggérant qu'il s'agit d'une réponse protectrice de l'hôte pour contrôler l'infection par le CMV et maintenir la latence. Cependant, le récepteur NKG2C n'est pas nécessaire pour la génération de cellules NK adaptatives. En effet, les individus porteurs d'une délétion homozygote sur le gène codant pour le récepteur NKG2C empêchant son expression à la surface

cellulaire montrent une réponse au CMV similaire aux individus ne portant pas de délétion. Il a été montré une expression du récepteur CD2 plus élevée à la surface des cellules NK adaptatives NKG2C- comparativement aux cellules NK NKG2C+, suggérant que les récepteurs CD2 et NKG2C ont des rôles croiser (Comeau et al., 2019). Si les cellules NK adaptatives possèdent une meilleure ADCC, de nombreuses cellules CD94/NKG2C<sup>+</sup> stimulées perdent par la suite l'expression de la molécule adaptatrice FcR $\gamma$ . Malgré la perte de FcR $\gamma$ , la signalisation via le récepteur Fc CD16 est préservée grâce à la capacité du CD16 à transmettre des signaux via le CD3 $\zeta$ . De plus, les cellules FcR $\gamma$ <sup>-</sup> présentent une réponse ADCC améliorée face au virus de l'Herpès-1 et au virus de la grippe.

Les cellules NK stimulées par le CMV ont une longue durée de vie (Corat et al., 2017) avec des empreintes épigénétiques stables qui sont transmises à la descendance cellulaire et qui ressemblent à celles trouvées au niveau des cellules T mémoires (Lee et al., 2015; Schlums et al., 2015). En effet, plusieurs études ont fait ressortir l'existence d'une population NK de type mémoire dans le contexte d'une infection à CMV (Béziat et al., 2013a; Della Chiesa et al., 2012; Foley et al., 2012b, 2012a; Lopez-Vergès et al., 2011; Schlums et al., 2015). Il a été observé lors d'une infection à CMV, une expansion des cellules NK NKG2C<sup>+</sup> avec une augmentation de l'expression du marqueur CD57 (Foley et al., 2012b). De plus notre équipe, a montré que le récepteur KIR2DL3 est préférentiellement coexprimé avec NKG2C sur les cellules NK amplifiées dans l'infection à CMV (Djaoud et al., 2013). Les cellules NK CD94/NKG2C<sup>+</sup> FcR $\gamma$ <sup>-</sup> sont donc les mieux adaptées pour combattre la réinfection ou la réactivation du HCMV chez les individus séropositifs suggérant qu'il s'agit d'une réponse protectrice de l'hôte pour contrôler l'infection par le CMV et maintenir la latence.

## **2.2. Virus de l'immunodéficience humaine**

Le VIH est un virus à ARN simple brin de sens positif qui appartient au genre *Lentivirus* de la famille des *Retroviridae* classé en deux types, VIH-1 et VIH-2. Le VIH-1 est une souche plus virulente et infectieuse que le VIH-2 et est la cause de l'infection mondiale par le VIH, à l'inverse du VIH-2 qui est une souche confinée à l'Afrique de l'Ouest. Il peut se transmettre par l'échange de divers fluides corporels provenant de personnes infectées tels que le sang, le lait maternel, le sperme et les sécrétions vaginales. Il peut aussi se transmettre de la mère à l'enfant pendant la grossesse, l'accouchement et

l'allaitement au sein. Fin 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dénombre environ 37,7 millions de personnes vivants avec le VIH, dont plus de deux tiers se situant sur le continent Africain (<https://www.who.int>). Le VIH cible les cellules du système immunitaire conduisant à une immunodéficience progressive chez les sujets infectés qui entraîne une augmentation de la sensibilité aux infections et à certains cancers. Le stade le plus avancé de l'infection à VIH est le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), qui en l'absence d'un traitement, peut mettre plusieurs années à apparaître selon les cas. Ce stade se définit par l'apparition de certains cancers, d'infections opportunistes ou d'autres manifestations cliniques sévères à long terme (<https://www.who.int>). Une combinaison hautement active de thérapie antirétrovirale permet de supprimer activement la réplication du virus dans l'organisme et permet au système immunitaire de se renforcer et de reconstituer sa fonction de protection face aux infections opportuniste et aux cancers (Zicari et al., 2019). Les principales cellules cibles du VIH-1 sont les cellules immunitaires telles que les LT CD4<sup>+</sup>, les macrophages et les DC (Fauci and Desrosiers, 1997). Les cellules infectées par le VIH sont reconnues par les cellules immunitaires innées et adaptatives telles que les cellules NK et les LT CD8<sup>+</sup>.

Dans le contexte de l'infection par le VIH, différentes combinaisons génétiques HLA/KIR ont été associées au rythme de progression de la maladie (Martin et al., 2007, 2002) ou à l'absence de contamination (Boulet et al., 2008). Plusieurs mécanismes permettent cette protection face à la maladie comprenant l'éducation des cellules NK KIR (Long et al., 2008) et l'interaction directe des KIR avec leurs ligands HLA présentant des motifs peptidiques dérivés du VIH-1. En particulier, le polymorphisme allélique KIR3DL1/Bw4 et la présence de son homologue KIR3DS1 associé aux motifs Bw4 auraient un effet protecteur sur l'avancement de la maladie. De plus, il a été montré que la présence du motif HLA-Bw4-80I en combinaison avec un allèle codant pour un récepteur KIR3DL1<sup>high</sup>, mais également la présence du gène KIR3DS1 permettait un meilleur contrôle viral (Martin et al., 2007, 2002). L'éducation des cellules NK KIR2D<sup>+</sup> par les molécules HLA-C permet aux cellules NK de reconnaître la perte des molécules HLA-C (missing-self) (Apps et al., 2013). Ainsi, pour le VIH, les résultats de l'infection diffèrent entre les personnes en fonction de l'éducation des cellules NK. De plus une étude récente l'infection par le HIV induit un changement dans la présentation du peptides par l'allotype HLA-

Cw3, qui induit une diminution de la liaison le récepteur KIR2DL3 (Vollmers et al., 2021; Ziegler et al., 2020)

Un autre moyen pour les cellules NK de prévenir l'infection des cellules par le VIH est la reconnaissance du récepteur NKG2D pour les ligands de stress MIC-A et MIC-B exprimées par les cellules infectées par le VIH. Cependant, le VIH est capable de limiter l'expression de ces protéines accessoires (Norman et al., 2011; Richard et al., 2010). Enfin, l'ADCC est un mécanisme utilisé par les cellules NK pour contrôler l'infection VIH. L'activité ADCC a été associée à une efficacité protectrice modeste dans l'essai du vaccin contre le VIH RV144 (Haynes et al., 2012) et a été impliquée dans les phénotypes de contrôle viral (Lambotte et al., 2009). Son efficacité contre le VIH est notamment due à des caractéristiques d'anticorps spécifiques comprenant une sous-classe et une glycosylation, qui peuvent être modifiées pour améliorer le recrutement et l'activation des cellules NK. Cependant, l'ADCC comme les autres voies de protection est également limitée par l'évasion virale, de par la protéine accessoire virale Vpu, le VIH désactive la reconnaissance virale médiée par l'ADCC à travers l'altération de la libération d'agrégats viraux (Alvarez et al., 2014; Li et al., 2020).

### **2.3. Virus de l'hépatite C (VHC)**

Le VHC appartient aux agents étiologiques de l'hépatite C. C'est un virus à ARN simple brin appartenant au genre *Hepacivirus* de la famille des *Flaviviridae*. L'infection par le VHC est généralement asymptomatique. Cependant, lors d'une persistance virale, le VHC peut entraîner un dérèglement du système immunitaire, une atteinte hépatique chronique grave de cirrhose du foie et de carcinome hépatocellulaire (Njiomegnie et al., 2020). Il existe deux formes d'infection causées par le VHC, l'hépatite C aiguë et l'hépatite C chronique permettant ainsi de classer le type et la gravité de l'infection. Dans le cas d'une infection aiguë, le corps est capable d'éliminer le virus dans les 6 mois suivant l'incidence, alors que dans le cas d'une infection chronique, le système immunitaire est incapable d'éliminer le virus et va donc persister dans le corps. Environ 55 à 85% des cas présentant une infection aiguë par le VHC évoluent vers la chronicité, 20 à 30% développent une cirrhose du foie et 1 à 4% évoluent vers un carcinome hépatocellulaire. Selon l'OMS, on estime dans le monde 71 millions

d'individus infectés par le VHC de manière chronique et en 2016, il est estimé à 399 000 décès dus à des complications liées au VHC (<https://www.who.int>). De la même manière que le VIH, le VHC se transmet par le sang ou par des fluides corporels.

Les récepteurs RIG-I et les TLR sont les principaux récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires associés aux agents pathogènes du VHC (Chigbu et al., 2019). L'élimination des hépatocytes infectés se fait majoritairement par les CTL et les NK, soit par cytolyse grâce à la perforine et granzyme B, soit par élimination non cytotytique via la production d'IFN- $\gamma$ . Les cellules NK jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection par le VHC. Des associations génétiques KIR/HLA ont mis en évidence que les individus de génotype KIR AA et HLA-C1 homozygotes étaient les plus résistants face au développement de l'infection du VHC vers une pathologie chronique (Khakoo et al., 2004; Knapp et al., 2010). Plus précisément, ces études ont révélé que les individus homozygotes pour KIR2DL3 et son ligand HLA-C1 sont capables d'éliminer spontanément le VHC (Hydes et al., 2015; Khakoo et al., 2004; Knapp et al., 2010). De plus, comme pour le VIH, la combinaison KIR3DL1/Bw4 a un impact sur le développement de la maladie. En effet, la combinaison du récepteur KIR3DL1 avec la molécule HLA-Bw4-80T est associée à la résistance aux infections chroniques par le VHC (Thöns et al., 2017).

Le VHC affecte l'activité des cellules NK par différents mécanismes tels que le contrôle de l'expression des molécules HLA classe I ou encore grâce aux peptides présents sur les molécules HLA. En effet, la protéine centrale du VHC augmente l'expression de TAP1 permettant à son tour d'augmenter l'expression des molécules HLA classe I à la surface des cellules infectées du foie empêchant ainsi la reconnaissance du soi manquant par les cellules NK (Herzer et al., 2003). De même, le peptide central du VHC peut se lier à certaines molécules HLA-Cw pour augmenter l'affinité du récepteur KIR2DL1 pour son ligand HLA-C2, entraînant une augmentation des signaux inhibiteurs (Lunemann et al., 2016). Une autre manière pour le VHC d'échapper à la cytotoxicité NK est d'augmenter la stabilité de la molécule HLA-E, ligand du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A exprimé sur les cellules NK (Nattermann et al., 2006). Une augmentation de l'expression des récepteurs CD94/NKG2A à la surface

des cellules NK couplée à une régulation négative des ligands du récepteur NKG2D par le VHC a également été retrouvée chez des individus atteints d'hépatite C (Jinushi et al., 2004).

L'infection chronique par le VHC entraîne un répertoire NK mémoire. L'influence du VHC sur le répertoire NK conduit à une diminution de sa diversité globale et modifie la fonction des populations NK favorisant le maintien de la charge virale. Ainsi, pendant l'infection par le VHC, on observe une augmentation des cellules NK CD56<sup>bright</sup> couplée à une expression accrue des marqueurs CD69 et CD95 (FasL) ainsi que des récepteurs NKp30 et NKp46. Les populations NK CD56<sup>bright</sup> présentent une plus grande production d'IFN- $\gamma$ , mais une cytotoxicité moindre. L'expansion de ces populations NK naïves avec une densité de récepteurs activateurs accrue montre une inefficacité pour combattre l'infection (Bhardwaj et al., 2016). Récemment, notre équipe a examiné, le rôle des combinaisons génétiques KIR/HLA et du phénotypage des cellules NK, LT et LT CD56+ sur la clairance spontanée (CS) du HCV dans une cohorte française co-infectée par le VIH-HCV. L'étude a montré des fréquences augmentées des ligands C2C2 dans le groupe de CS par rapport aux patients atteints du HCV chronique uniquement chez ceux d'origine européenne. Cette étude a montré l'importance à la fois du contexte individuel et de l'environnement HLA de classe I (Legrand et al., 2021).

### **3. Cellules NK et grossesse**

Les cellules NK semblent jouer un rôle central dans le bon déroulement d'une grossesse. En effet, les cellules NK présentes dans la muqueuse utérine sont les cellules immunitaires majoritaires. Ces cellules NK présentes dans la caduque sont appelées cellules NK déciduales ou cellules NK utérines (uNK), distinctes des cellules NK du sang périphérique (spNK). À la frontière fœto-maternelle, sont retrouvées les cellules trophoblastiques en contact direct avec l'utérus. Ces cellules envahissent les artères maternelles pour les transformer en vaisseaux à haut débit. Cette transformation va permettre l'augmentation du flux sanguin utérin afin d'assurer une livraison suffisante de nutriments maternels et d'oxygène au placenta pour une croissance fœtale normale. Le trophoblaste est très invasif et est régulé par les cellules uNK. Contrairement aux cellules spNK, les cellules uNK sont faiblement cytotoxiques

et ne tuent normalement pas les cellules trophoblastiques (King et al., 1993), mais peuvent devenir cytotoxiques dans certaines situations telles qu'une infection à CMV (Siewiera et al., 2013). D'un point de vue phénotypique, les cellules uNK diffèrent des cellules spNK puisqu'elles expriment les récepteurs CD45RO, CD49a et CD69, et n'expriment pas CD16, CD45RA CD49f (Moffett-King, 2002). Les cellules uNK sont exclusivement retrouvées au niveau de la muqueuse, de l'endomètre et de la caduque. Les cellules uNK expriment une gamme de récepteurs NK qui reconnaissent les molécules d'adhésion, les signaux de stress et les ligands HLA de classe I (Apps et al., 2011; El Costa et al., 2008). Par ailleurs, les trophoblastes extravilloux (EVT), qui s'infiltrent profondément dans la paroi utérine, expriment un allotype maternel et paternel HLA-C (King et al., 2000) ainsi que les molécules HLA-E, HLA-G (Apps et al., 2008) et éventuellement HLA-F, mais pas les molécules HLA-A ou HLA-B polymorphes.

Les complications majeures lors de la grossesse sont réunies sous l'appellation « Great Obstetrical Syndromes » (GOS ; Grand syndrome obstétricaux), elles incluent la restriction de croissance fœtale intra-utérine (RGF), le travail prématuré, des fausses couches à répétition et enfin la pré-éclampsie qui se caractérise par un échec de la placentation (Brosens et al., 2011). Plusieurs études génétiques ont démontré des associations entre des combinaisons KIR/HLA de classe I avec certains GSO dont la pré-éclampsie suggérant que ces gènes peuvent avoir un rôle dans la grossesse. Plus particulièrement, Hiby et al. ont découvert que les génotypes KIR AA maternels associés aux molécules HLA-C2 fœtales étaient plus fréquents chez les femmes avec pré-éclampsie (Hiby et al., 2004). Les gènes KIR importants dans cette association sont le KIR2DL1 présent sur l'haplotype A et le KIR2DS1 présent sur l'haplotype B, les récepteurs correspondants se lient aux molécules HLA-C2, mais avec des rôles inversés (Xiong et al., 2013). En effet, la présence d'un haplotype B contenant le gène KIR2DS1 associé à la présence des molécules HLA-C2 paternelles est sous-représentée dans les grossesses pré-éclamptiques et dans les grossesses avec un poids de naissance faible suggérant que les cellules uNK actives peuvent empêcher la pré-éclampsie et stimuler la croissance fœtale. Ces résultats suggèrent un fort signal inhibiteur des cellules uNK médié par le récepteur KIR2DL1 qui a une grande affinité pour les ligands HLA-C2, empêchant l'invasion des trophoblastes et entraînant une réduction du flux sanguin. La réduction du flux sanguin réduire l'apport d'oxygène et de nutriments au fœtus qui se traduit

par une pré-éclampsie et un faible poids à la naissance. De plus, Huhn et al., ont montré l'impact du polymorphisme du récepteur KIR2DL1 sur le risque de pré-éclampsie. En particulier, l'équipe a montré que les individus possédant l'allotype KIR2DL1 avec une Arg245 ont un risque plus fort de développer une pré-éclampsie comparativement aux donneurs possédant l'allotype KIR2DL1 avec une Cys245 (Huhn et al., 2018a). En dehors de KIR2DL1 et KIR2DS1, d'autres récepteurs KIR interviennent dans le contrôle des cellules trophoblastiques tels que KIR2DS4 dont le gène est présent sur les motifs TelA+ et KIR2DS5 dont le gène est présent sur les motifs TelB+. La présence de ces deux gènes est également associée à une résistance à la pré-éclampsie (Kennedy et al. 2016). Ces résultats appuient l'hypothèse que l'activation des cellules uNK améliore l'invasion des trophoblastes et conduit à une bonne croissance fœtale. Les molécules HLA-G et HLA-E interviennent également dans la reconnaissance des cellules trophoblastiques par les cellules NK. Les molécules HLA-G sont reconnues non seulement par les cellules uNK via le KIR2DL4, mais également par les monocytes via LILRB (Rajagopalan and Long, 1999). De plus, le peptide leader des molécules HLA-G permet la stabilisation de l'expression des molécules HLA-E qui peuvent moduler les fonctions des cellules uNK médiées par l'inhibition du récepteur NKG2A et l'activation du récepteur NKG2C. Ainsi, en fonction des interactions KIR-HLA, les niveaux de chimiokines ou de cytokines sécrétées par les cellules uNK varient et modifient à leur tour l'invasion des cellules trophoblastiques (Hanna et al., 2006).

#### **4. Immunité anti-tumorale**

L'activité anti-tumorale des cellules NK a été mise en évidence pour la première fois par l'équipe de Kiessling en 1975. Au cours de cette expérience, l'objectif était d'évaluer les capacités des LT à tuer des cibles tumorales contre lesquelles les souris avaient été préalablement immunisées. Plus précisément, ces études ont montré que dans un modèle murin les cellules NK participent à la surveillance tumorale et impliquent également une réponse anti-tumorale. Chez l'homme, les cellules NK sont potentiellement capables d'éliminer les tumeurs dont l'expression des molécules HLA de classe I est réduite ou absente échappant ainsi au contrôle des cellules T CD8<sup>+</sup>. Leur rôle dans la surveillance des tumeurs est bien établi, puisqu'une faible activité cytotoxique des NK a été associée à une incidence plus élevée de cancers (Imai et al., 2000). Au-delà du rôle des cellules NK dans le contrôle des



hémopathies malignes (Ljunggren and Kärre, 1990; Moretta et al., 2014; Verheyden et al., 2009) et des métastases tumorales (Messaoudene et al., 2014; Pasero et al., 2015), plusieurs études ont fourni des preuves que la présence de cellules NK infiltrant les tumeurs (TI-NK) (comprenant le carcinome pulmonaire, gastrique, colorectal, de la tête et du cou et du rein) affecte également la tumorigenèse (Habif et al., 2019) et améliore les résultats cliniques des patients (Coca et al., 1997; Eckl et al., 2012; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002).

Les cellules NK sont potentiellement capables d'éliminer les tumeurs dont l'expression HLA de classe I est réduite ou absente. Cette reconnaissance du non-soi est principalement régie par les récepteurs inhibiteurs KIR qui reconnaissent certaines molécules HLA de classe I et le récepteur NKG2A qui reconnaît les molécules HLA-E. En l'absence d'interaction entre les récepteurs inhibiteurs NK avec les molécules HLA de classe I, l'immunosurveillance tumorale par les cellules NK peut être régulée par l'expression des récepteurs activateurs tels que NKG2D, DNAM-1, 2B4 et les NCR reconnaissant des ligands induits ou surexprimés à la surface des cellules tumorales (Lanier, 2005; Moretta et al., 2001). Cette balance de signaux NK inhibiteurs/activateurs active la production de granules cytotoxiques (perforine et granzymes) et de cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) qui aboutit à la lyse des cellules tumorales par les cellules NK.

Les récepteurs NK activateurs NKG2D, DNAM-1 et des NCR vont avoir un rôle important dans l'effet anti-leucémique régie par les cellules NK. Ces récepteurs reconnaissent des ligands peu exprimés par les cellules saines, mais surexprimés au niveau des cellules tumorales. NKG2D est le principal récepteur activateur associé à une reconnaissance antitumorale. Les ligands du NKG2D sont les protéines du stress MICA/B et les ULBP1-6. Les ligands des récepteurs NKG2D vont être exprimés par les cellules tumorales au cours de la transformation maligne. Des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence cette élimination des cellules tumorales induite par les récepteurs NKG2D (Pende et al., 2001). Les ligands de NKG2D (NKG2D-L) sont rarement exprimés par les cellules saines, mais sont induits à la surface lorsque la cellule est stressée à la suite d'une infection virale ou d'une transformation maligne. Ils sont donc appelés ligands du « soi-induit ». Les cellules exprimant le NKG2D-L sont détectées et éliminées principalement par les cellules NK. L'expression de NKG2D-L est régulée par

plusieurs mécanismes qui peuvent être transcriptionnels, traductionnels ou post-traductionnels. L'expression de NKG2D-L est induite par des dommages de l'ADN, une caractéristique de la transformation tumorale, qui conduit à l'activation des voies de réparation de l'ADN ATM-ATR (Gasser et al., 2005). Les travaux d'Imai et al. ont attribué un rôle du polymorphisme NKG2D dans l'immunosurveillance de cancer (Imai et al., 2000) et dans la prévention de la formation de cancer (Hayashi et al., 2006). En effet, ils ont identifié huit SNP dans le locus NKG2D (KLRK1) qui forment deux blocs d'haplotypes (NKG2Dhb1 et NKG2Dhb2). Chacun de ces blocs peut générer deux allèles majeurs liés à une activité cytotoxique faible (LNK) ou élevée (HNK). Les patients avec l'haplotype HNK1/HNK1 NK2GDhb1 ont une incidence plus faible de cancer par rapport à ceux avec l'haplotype LNK1/LNK1 (Imai et al., 2000). Le récepteur DNAM-1 est également important dans la reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK. L'implication de DNAM-1 dans la surveillance tumorale a été mise en évidence chez des souris déficientes en DNAM-1. DNAM-1 a pour ligands les molécules CD155 et CD112. Il a été mis en évidence dans plusieurs études chez l'Homme que les molécules CD155 et CD112 étaient surexprimées dans un contexte de cancers solides tels que le neuroblastome, mais également dans un contexte tumoral hématologique tel que les leucémies. Enfin, il a été montré que le récepteur NKp46 est impliqué dans la reconnaissance et la lyse de cellules tumorales par les cellules NK dans plusieurs cancers solides tels que le carcinome, le neuroblastome et le mélanome ainsi que dans plusieurs cancers hématologiques dont les leucémies, bien que la majorité des ligands tumoraux pour le récepteur NKp46 restent encore inconnus.

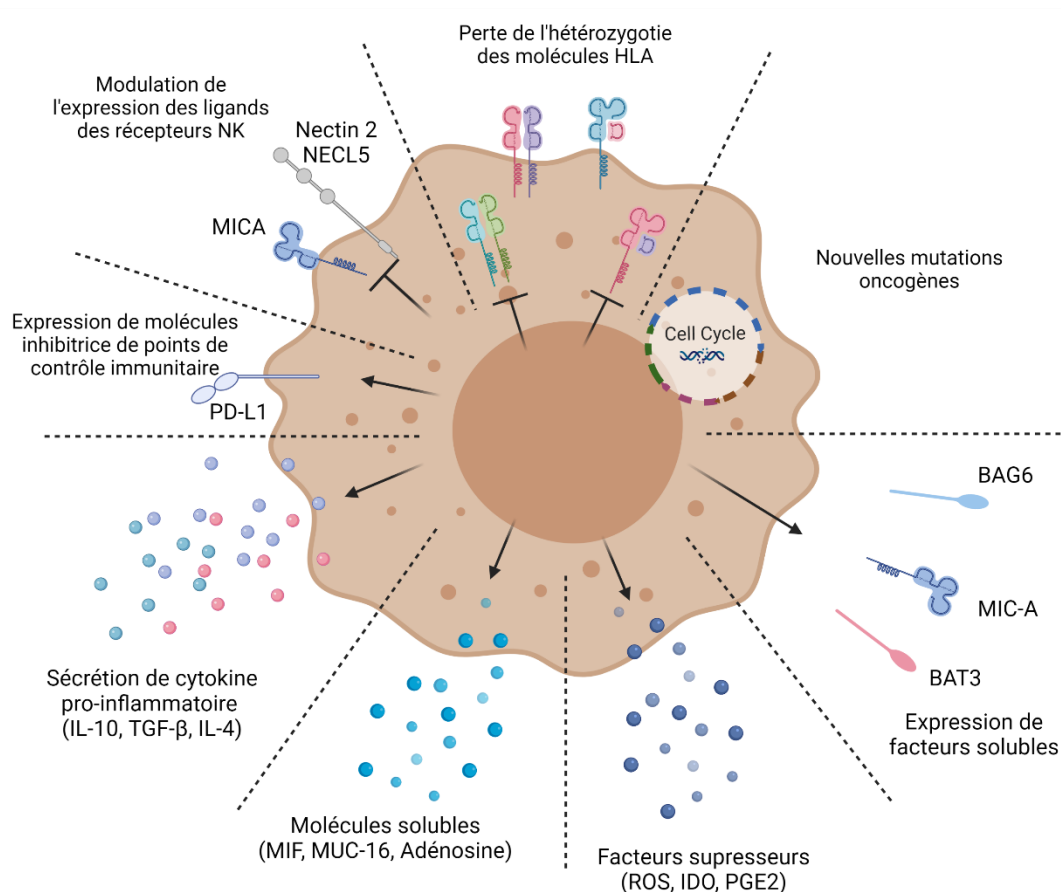
Nous venons de décrire l'importance des cellules NK dans la surveillance immunitaire des tumeurs. Cependant, plusieurs mécanismes permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires T et NK (Zeiser and Vago, 2019). En particulier, les cellules NK sont souvent en faible fréquence et/ou altérées à la fois dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes. Les cellules NK présentes dans les tumeurs solides (y compris les cancers du poumon, de l'estomac, colorectal, de la tête et du cou) sont généralement rares et présentent souvent un phénotype CD56<sup>bright</sup> et/ou une expression réduite des récepteurs activateurs conduisant à une diminution de l'activité antitumorale. Dans le cancer du sein, les cellules NK-TI sont présentes avec un

phénotype NK CD56<sup>bright</sup> avec de faibles niveaux de NKp30, NKG2D, DNAM-1 et CD16 et un faible potentiel cytotoxique (Mamessier et al., 2011). Dans les cancers du poumon à un stade précoce, les cellules TI-NK sont principalement CD56<sup>dim</sup> mais expriment des quantités limitées de récepteurs activateurs tels que NKp30, NKp80, CD16 et DNAM-1 et présentent une faible dégranulation et une faible production de cytokines (Platonova et al., 2011). Dans le carcinome rénal, les cellules NK infiltrantes expriment des niveaux élevés du récepteur inhibiteur CD94/NKG2A, ce qui contribue à une diminution de l'activité des cellules NK (Schleypen et al., 2003).

Le microenvironnement tumoral local peut exercer directement des effets suppresseurs sur les mécanismes effecteurs des cellules NK et contribuer à cet échappement tumoral. Une production accrue de cytokines anti-inflammatoires a été montrée dans différents types de cellules leucémiques (Naka et al., 2010). Notamment, les cellules myéloïdes immatures et les macrophages associés aux tumeurs (TAM) peuvent polariser une réponse Th2 et/ou produire des facteurs suppresseurs tels que l'IL-10, le TGF- $\beta$  et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Gabrilovich et al., 2012). De surcroît, les cellules tumorales peuvent entraver la réponse immunitaire NK par différents mécanismes inhibiteurs, notamment par l'expression d'IDO et/ou la production de PGE2 dans le mélanome métastatique. Ces molécules vont moduler l'expression de NKp30, NKp44 et NKG2D (Pietra et al., 2012). En particulier, l'expression d'IDO1 par les cellules leucémiques est corrélée à un pronostic défavorable chez les enfants atteints de LAM en dehors d'une greffe de CSH (Folgiro et al., 2014). Les tumeurs vont également sécréter des facteurs solubles tels que le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF), MUC-16 et l'adénosine (Hoskin et al., 2008). Les facteurs solubles MIF et MUC-16, exprimés dans la tumeur ovarienne, sont capables de réguler négativement NKG2D et d'interférer avec la formation des synapses entre les cellules tumorales et les cellules NK. De plus, la libération des molécules solubles MICA (ligand NKG2D) ou de BAT3/BAG6 et B7H6 (ligands de NKp30) représentent également un mécanisme d'échappement tumoral (Groh et al., 2002; Kaiser et al., 2007). Outre le microenvironnement tumoral, les molécules inhibitrices de points de contrôle immunitaire participent à l'échappement tumoral. Des études ont montré que l'inhibiteur du point de contrôle immunitaire PD-L1 joue un rôle majeur dans l'échappement tumoral (Atanackovic et al., 2014; Castelli et al., 2012; Giuliani et al., 2017;

Godfrey and Benson, 2012). Le PD-L1 peut être exprimé au niveau des tumeurs solides et des hémopathies malignes pour inhiber les fonctions des cellules T et NK et son expression peuvent être augmentée par l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules immunitaires, conservant son effet inhibiteur (Benson et al., 2010; Giuliani et al., 2017). Récemment, il a été montré chez des patients atteints de LAM que l'activité oncogène de JAK2<sup>V617F</sup> provoquait la phosphorylation de STAT3 et STAT5, ce qui augmentait l'activité du promoteur PD-L1 et l'expression de la protéine PD-L1 (Holmström et al., 2017). Un autre mécanisme majeur utilisé par les cellules leucémiques pour échapper à la lyse médiée par les cellules NK est la modulation de l'expression des ligands NKG2D et DNAM-1 à leur surface (Chan et al., 2014; Godfrey and Benson, 2012). Notamment, la régulation négative ou la libération de l'expression de MICA facilite l'échappement des cellules tumorales (El-Sherbiny et al., 2007; Jurisic et al., 2007; Rebmann et al., 2007; Soriani et al., 2009).

Une reconnaissance altérée des cibles tumorales par les cellules NK peut être due à une perte d'hétérozygotie HLA. En effet, après allogreffes de CSH HLA non-identiques, la perte d'une(es) molécule(s) HLA incompatible(s) représente un important mécanisme d'échappement immunitaire qui peut conduire à la rechute de la maladie initiale (Vago et al., 2009). Cette perte d'hétérozygotie de la (des) molécule(s) HLA incompatible(s) observée au niveau génomique est due soit à une délétion ou une dysrégulation de certains gènes HLA voire l'haplotype HLA complet incompatible(s) soit un défaut des voies de présentation des molécules HLA. Le niveau d'expression des autres molécules HLA identiques entre donneur et receveur reste cependant normal expliquant l'absence de lyse par les cellules NK. L'incidence de perte des molécules HLA après greffes de CSH haplo-identiques peut représenter jusqu'à un tiers des rechutes. Des études montrent que la diminution d'expression des molécules HLA et de ses régulateurs peut entraîner une rechute de la leucémie après greffes de CSH HLA identiques et non identiques (Christopher et al., 2018; Toffalori et al., 2012). Enfin, des études de séquençage ont révélé que la plupart des leucémies consistent en plusieurs clones génétiques dont un clone fondateur et des sous-clones. Dans le contexte des LAM, la progression du syndrome myélodysplasique (SMD) après allo-HCT est liée à l'expansion et à l'évolution des sous-clones leucémiques (Jacoby et al., 2018; Quek et al., 2016; Waterhouse et al., 2011).



**Figure 17 : Les différents mécanismes utilisés par les cellules tumorales pour l'immuno-évasion**

Le microenvironnement tumoral local peut exercer directement des effets supresseurs sur les mécanismes effecteurs des cellules NK et contribuer à cet échappement tumoral. Une production de cytokines anti-inflammatoires a été montrée dans différents types de cellules leucémiques. Une production de facteurs solubles tels que le facteur d'inhibition de la migration des macrophages (MIF), MUC-16 et l'adénosine a été démontré. Ces molécules sont capables de réguler négativement NKG2D. Les cellules tumorales peuvent entraver la réponse immunitaire NK par l'expression de facteurs supresseurs tels que ROS, IDO et PGE2 qui vont moduler l'expression des récepteurs NKp30, NKp44 et NKG2D. De plus, la libération des molécules solubles MICA (ligand NKG2D) ou de BAT3/BAG6 et B7H6 (ligands de NKp30) représentent également un mécanisme d'échappement tumoral. En dehors du microenvironnement tumoral local, les molécules inhibitrices de points de contrôle immunitaire participent à l'échappement tumoral en particulier PD-L1 qui joue un rôle majeur dans l'échappement tumoral. La modulation de l'expression des ligands NKG2D (MICA) et DNAM-1 (Nectin 2, NECL5) à la surface des cellules NK constitue aussi un mécanisme d'immuno-évasion. La perte de(s) molécule(s) HLA mésappariée(s) au niveau du génome représente un important mécanisme d'échappement immunitaire qui peut entraîner une rechute de la leucémie après allo-HCT. Pour finir, l'acquisition de nouvelles mutations oncogènes et la perte de gènes supresseurs de tumeurs après allo-HCT participent à l'évasion immunitaire. Inspirée de (Zeiser and Vago, 2019).

## V) Greffes de cellules souches hématopoïétiques

Les greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques représentent une thérapie cellulaire qui consiste à administrer des CSH saines prélevées chez un donneur à un patient leucémique. Les greffes de CSH sont une thérapie potentiellement curative pour les hémopathies malignes, l'anémie aplasique et les déficits immunitaires congénitaux. Au total, l'Agence de la Biomédecine a rapporté 4640 greffes de CSH allogéniques et autologues réalisées dans 78 centres en France en 2020. Depuis les années 1950, de nombreuses découvertes en lien avec l'évolution de la médecine ont permis d'avoir une meilleure compréhension de ces greffes et d'améliorer les traitements. Il existe deux groupes de greffes de CSH, les greffes autologues et allogéniques. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les greffes de CSH allogéniques réalisées chez des patients leucémiques adultes.

Les premières connaissances fondamentales sur les CSH remontent à la fin des années 1940 chez les survivants d'explosion de bombes atomiques au Japon. Ces connaissances ont pour but de soigner les maladies causées par les radiations aux organes et à l'hématopoïèse. En 1951, Lorenz et al. montrent un effet protecteur de la moelle osseuse (MO) prélevée chez des souris contre les dommages mortels d'une irradiation corporelle totale lorsque les souris reçoivent une perfusion intraveineuse de MO syngénique après une irradiation totale. Les études suivantes montrent une reconstitution de l'hématopoïèse après greffe de MO syngénique, mais il est également fait mention d'un rejet du greffon dû à la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD). En 1956, Barnes et Loutit, en plus d'avoir observé ce phénomène de GvH, montrent que chez des souris atteintes de GvH, l'éradication des cellules leucémiques appelée l'effet « greffon contre la leucémie » (GvL) (Barnes et al., 1956). En 1957, est réalisée la première greffe de CSH chez l'Homme entre jumeaux homozygotes (Mathe and Bernard, 1957). Entre 1957 et 1967, de nombreuses greffes de CSH (environ 200) seront réalisées, mais malheureusement, toutes les greffes de CSH allogéniques échouent (Bortin, 1970). Ces échecs sont principalement dus à l'effet GvH corroborant ainsi les observations faites initialement par Barnes et Loutit chez les souris. À ce stade, beaucoup de cliniciens et de chercheurs considèrent les greffes de CSH sans avenir. Cependant, quelques laboratoires/centres greffeurs en Europe et aux États-Unis continuent les études afin de mieux comprendre les mécanismes liés à la réussite/échec des greffes de

CSH. Il faudra attendre 1968 pour la reprise des essais cliniques grâce aux progrès réalisés dans la transplantation d'organe et grâce à la découverte et la compréhension du système HLA déterminant dans l'avancée des greffes de CSH. Autre point important fut la création dans les années 1980 de registres permettant de collecter des typages HLA auprès de donneurs volontaires de moelle osseuse (DVMO) non apparentés, d'abord au Royaume-Uni avec le registre Anthony Nolan, aux États-Unis avec le National Marrow Donor Registry, puis en 1986 en France avec le registre France greffe de moelle créé par les Pr Jean Dausset et Jean Bernard. Ces registres ont permis de contourner une limitation dans les greffes de CSH dites apparentées ou familiales. En effet, seulement 25% des patients ont des frères et sœurs HLA identiques qui peuvent être donneurs de CSH. Les registres de DVMO permettent alors le développement de greffes de CSH dites non apparentées. Au cours des 25 dernières années, de plus en plus de centres greffeurs de CSH et registres de DVMO ont été créés dans le monde. Afin de collecter et d'analyser le suivi clinique des greffes de CSH, des agences nationales et internationales ont été mises en place telles que l'Agence de la Biomédecine (ABM), la société européenne des greffes de MO (EBMT) et le Centre de recherche international sur les greffes de MO (CIBMTR). Ces données ont permis notamment de fournir de précieuses informations visant à établir des recommandations pour de meilleures approches thérapeutiques. Les premières années du 21<sup>e</sup> siècle, l'introduction de conditionnement non myéloablatif, de nouveaux traitements immunosuppresseurs, l'utilisation de greffons alternatifs comprenant les doubles greffes de sang de cordon (dUCB) et plus récemment les greffes de CSH HLA haplo-identiques non T déplétées ont permis une augmentation exponentielle des greffes de CSH.

## **1. Indications de greffes de CSH**

Dans ce chapitre, nous aborderons les indications de greffes de CSH essentiellement dans le contexte des LAM et leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) pour les patients adultes. Les greffes de CSH ne sont pas systématiquement proposées aux patients présentant des leucémies aiguës, un traitement par chimiothérapie est possible. Grâce à des progrès majeurs réalisés ces dernières années, le classement des catégories des risques pour les leucémies aiguës (LA) est mieux défini. Il inclut la numération des globules blancs, la réponse au traitement d'induction et également les données de cytogénétique pour

certaines marqueurs moléculaires et mutations somatiques (Döhner et al., 2017). De plus, les scores de risque et les comorbidités se sont précisés permettant une amélioration significative des résultats des greffes de CSH allogéniques (Shouval et al., 2015).

Les LAM sont les leucémies les plus fréquentes chez l'adulte. C'est la 1<sup>ère</sup> indication pour les allogreffes de CSH représentant 44% des indications en France en 2020 (ABM). Les patients sont traités par chimiothérapie. Environ 70 à 80% des patients âgés de moins de 60 ans et 50% des patients plus âgés obtiennent une rémission avec la chimiothérapie cytotoxique (Bower et al., 2016; Burnett et al., 2011). Les LAL sont la 2<sup>ème</sup> indication pour les allogreffes de CSH représentant 12,8% des indications en France en 2020 (ABM). Les GCSH allogéniques ne sont pas systématiquement proposées aux patients présentant une LAL à risque standard (Bassan et al., 2018), en particulier chez les patients MRM-négatifs. Cependant, les GCSH allogéniques restent la norme de soins chez les patients LAL à haut risque. Plusieurs facteurs sont à prendre en compte notamment l'âge du patient, le type de LAM ou de LAL et enfin la cytogénétique de la leucémie (Döhner et al., 2010; Malard and Mohty, 2020).

## **2. Protocole des greffes de CSH allogéniques**

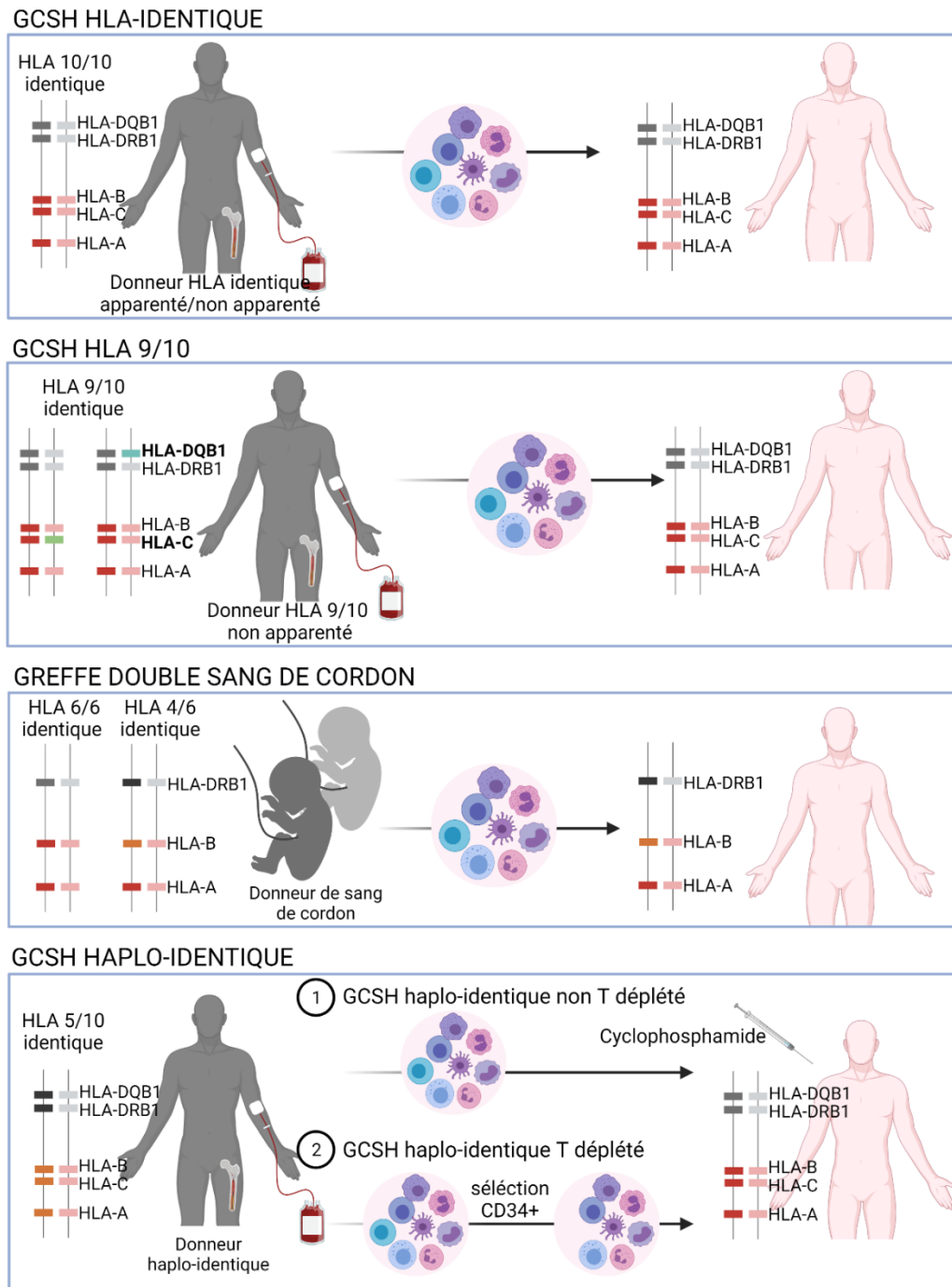
### **2.1. Critères de sélection des donneurs de CSH**

La sélection des donneurs de CSH se fait principalement en fonction du degré d'appariement des gènes HLA de classe I (HLA-A, -B, -C) et HLA de classe II (HLA-DRB1, -DQB1) entre le donneur et le receveur (**Figure 18**). En premier lieu, un donneur HLA-identique apparenté est recherché, on parle alors de donneur géno-identique, puisqu'il s'agit de frères ou sœurs partageant une compatibilité HLA 10/10 avec le patient. Cependant, l'héritage des gènes HLA à partir des haplotypes parentaux entraîne une probabilité de 25% de trouver un donneur HLA-identique 10/10 dans la fratrie. En l'absence d'un donneur HLA-identique apparenté, un donneur HLA-identique non apparenté est recherché au niveau des registres de DVMO national et internationaux, on parle alors de donneur phéno-identique. Bien que plus de 38 millions de donneurs potentiels de CSH non apparentés soient actuellement enregistrés dans le monde, il peut être difficile de trouver des donneurs compatibles en particulier pour les patients porteurs d'allèles HLA rares ou de LD inhabituels entre gènes HLA.



En l'absence d'un donneur de CSH HLA 10/10 identique, un donneur HLA 9/10 présentant certains mésappariements sélectifs, un donneur de sang de cordon ou plus récemment un donneur haplo-identique (HLA 5/10) peut être sélectionné. Dans le cadre d'une greffe de CSH HLA 9/10, une incompatibilité HLA-C entre D/R est recherchée en priorité puis le cas échéant une incompatibilité HLA-DQB1 ou HLA-A/B. Une autre option est possible avec les greffes réalisées à partir de 2 donneurs de sang de cordon ombilical (dUCBT). Dans ce contexte, le degré d'appariement HLA entre le donneur et le receveur est uniquement basé sur les gènes HLA-A, -B et -DRB1 avec un appariement HLA de 4/6 à 6/6. Alors que les premières dUCBT impliquaient des greffons provenant de frères et sœurs, à partir de 2006, les donneurs non apparentés sont devenus la source de UCB la plus fréquemment utilisée en France en l'absence de donneur HLA identique avec plus de 900 allogreffes UCB non apparentées réalisées en 2019 soit 47% des allogreffes réalisées au total (<https://www.agence-biomedecine.fr>). Quelque soit le type de greffe, une demande de prélèvement est faite avant greffe afin de vérifier ou d'affiner le typage HLA (haute résolution à 4 digits) et de tester la motivation et disponibilité du donneur. Ces dUCBT sont cependant en nette baisse ces dernières années. Au cours des 5 dernières années, les greffes de CSH haplo-identiques (CSH-haplo) non-T déplétées avec utilisation de cyclophosphamide post-greffe ont été introduites. Dans ce cas, le donneur et le patient ne partagent qu'un seul haplotype HLA, ce qui entraîne une probabilité de 50% de trouver un donneur haplo-identique dans la famille et par conséquent d'augmenter le nombre de donneurs potentiels de CSH. Depuis ces 5 dernières années, le nombre de greffes de CSH-haplo est en plein essor, l'ABM dénombre au cours de l'année 2019, 498 greffes de CSH-haplo réalisées soit 25% des greffes de CSH allogéniques. Actuellement, deux protocoles de greffes de CSH-haplo sont utilisés. Le premier protocole consiste à manipuler le greffon *ex-vivo* pour déléter les LT du greffon par une sélection positive des cellules CD34+ suivie d'une sélection négative des LT (Baumeister et al., 2020). Le second protocole consiste en une greffe de CSH haplo-identique non-T déplétée utilisant de la cyclophosphamide (CY) post-greffe (PTCy) à forte dose ou de l'anti-thymoglobuline (ATG) qui va permettre la déplétion *in vivo* des LT. La CY va cibler sélectivement les LT alloréactifs hautement prolifératifs au début de la greffe, tout en épargnant les compartiments des LT non alloréactifs et des CSH (Singh and McGuirk 2016).

En dehors des gènes HLA, d'autres critères sont également pris en compte dans le choix du donneur de CSH tels que l'absence de DSA (Donor Specific Antibody), RSA (Recipient Specific Antibodies), le sexe, le poids, le statut CMV, le groupe sanguin ABO, la source du greffon et potentiellement les incompatibilités KIR/HLA discutées ultérieurement.



**Figure 18 : La sélection des donneurs de CSH**

Appariement des gènes HLA donneur/receveur avant allogreffes de cellules souches hématopoïétiques (GCSH). L'appariement des gènes HLA-A, -B, -C, -DRB1 et -DQB1 entre les donneurs et les receveurs

au niveau des deux haplotypes est recherché en premier lieu avant GSCH apparentée ou non apparentée. En l'absence de donneurs 10/10 HLA-identiques apparentés/non apparentés, un donneur HLA 9/10 présentant certains mésappariements sélectifs peut être recherché. Dans ce cas, une incompatibilité HLA-C entre D/R est recherchée en priorité. En l'absence de tel donneur, une incompatibilité HLA-DQB1 ou HLA-A/B peut-être recherchée. En dehors d'une greffe HLA 9/10, une double greffe de sang de cordon ombilical (dUCBT) peut être également proposée. Dans ce contexte, les deux UCB et le patient sont généralement HLA 4/6 à 6/6 identiques avec prise en compte des gènes HLA-A, -B et -DRB1. Plus récemment, un donneur HLA haplo-identique 5/10 est recherché au niveau familial. L'utilisation de cyclophosphamide post-greffe comme prophylaxie contre la GvHD permet la suppression des cellules T alloréactives lors de la reconstitution à partir de greffons initialement non T déplétés.

## **2.2. Conditionnements pré-greffe de CSH**

Le régime de conditionnement est important et le choix est influencé par divers facteurs tels que l'âge du patient, le risque de la maladie, l'état de santé et de rémission avant greffe. Les régimes de conditionnement sont divisés en conditionnement myéloablatif (MA), et en conditionnement à intensité réduite (RIC). Le conditionnement MA provoque une cytopénie irréversible tandis que le conditionnement RIC provoque une cytopénie réversible de durée variable (Bacigalupo et al., 2009; Jethava et al., 2017).

Les patients atteints de LA âgés de moins de 45 ans ou les patients entre 45 et 65 ans sans aucune comorbidité sont traités efficacement par un conditionnement MA avec ou sans irradiation corporelle totale (TBI). Le conditionnement MA avec TBI consiste en l'administration d'une TBI unique (dose totale de 5 à 10 Gy), d'une TBI fractionnée (fTBI) (5 à 6 fractions sur 3 jours pour un total de 10 à 14 Gy) ou une TBI hyperfractionnée (10 à 12 fractions sur 4 jours pour un total de 14 à 15 Gy). La TBI est la plus souvent associée à l'administration de cyclophosphamide ou de bulsufan (BU). Un conditionnement MA sans TBI peut également être proposé. Ce conditionnement est favorisé par des facteurs limitants tels que l'âge, la radiothérapie antérieure et les comorbidités. Au final, les conditionnements MA les plus couramment utilisés sont TBI-CY et BU-CY et conduisent à des résultats à long terme similaires chez les patients atteints de LAM. Cependant, une forte dose de TBI entraîne une incidence de la GVHD aiguë plus élevée en raison de la toxicité directe envers des organes et peut-être aussi de la régulation positive indirecte de la réponse des LT du donneur (Morris et al., 2010).

Le conditionnement RIC est administré aux patients âgés ou aux patients avec des comorbidités afin de prévenir la toxicité liée à la chimiothérapie ou aux irradiations d'un conditionnement MA. Le conditionnement RIC consiste en l'administration de la fludarabine (FLU) et de la réduction de dose d'agents alkylants ou TBI. La mise en place du conditionnement RIC à base de la FLU a été très importante pour la LAM, une maladie qui affecte généralement une population plus âgée. Cependant, les risques de rechute sont plus élevés avec un conditionnement RIC que MA et reste la principale cause d'échec du traitement (Al-Ali et al., 2009; Tauro et al., 2005).

### **3. Reconstitution cellulaire post-allogreffes de CSH**

Il existe deux phases de la reconstitution post-greffe de CSH, la phase post-greffe précoce désignant les 3 premiers mois et la phase post-greffe tardive qui désigne la période 6 mois après greffe. Lors de la phase précoce, l'immunité innée (principalement les barrières épithéliales et les phagocytes) et l'immunité adaptative (LT et LB) sont fortement altérées. Durant cette phase, les patients avec une LA sont à haut risque d'infections. Les premières cellules à reconstituer le système hématopoïétique dans les semaines après greffe sont les monocytes, les granulocytes et les cellules NK faisant partie de l'immunité innée. Pendant la phase de reconstitution post-greffe tardive, l'immunité innée est généralement normale et l'immunité adaptative plus lente à se rétablir. Ainsi, le nombre de LB et LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> se normalise au cours des premiers mois après greffe. Cependant, la reconstitution des LT CD4<sup>+</sup> peut rester altérée pendant des années. Cette déficience lymphocytaire contribue à une incidence élevée des infections (Storek et al., 1997; Storek and Storb, 2000), mais aussi des rechutes (Parkman et al., 2006).

Après GCSH-haplo réalisées avec administration de cyclophosphamide post-greffe (PT-Cy) comme prophylaxie de la GVHD, les cellules NK subissent deux vagues d'expansion. Après l'infusion du greffon, les cellules NK périphériques et les cellules T sont détectables à des niveaux très faibles. L'administration de PT-Cy entraîne une délétion des cellules T et NK allo-réactives, et les cellules NK sont à peine détectables dans le sang périphérique (Russo et al., 2018). Par la suite, les cellules NK reconstituées récupèrent progressivement et expriment des niveaux élevés de récepteurs CD56 et

NKG2A. Environ 60 jours après greffe, l'expression des KIR à la surface des cellules NK revient à la normale. L'expression de CD56 et de NKG2A diminue progressivement et devient stable 9 à 12 mois après greffe (Russo et al., 2018). Cependant, il existe un déséquilibre des sous-populations NK jusqu'à 6 mois après greffe. En effet, le nombre de cellules NK CD56<sup>high</sup> CD16<sup>low/-</sup> est supérieur aux nombres de cellules NK CD56<sup>low</sup> CD16<sup>high</sup> (cytotoxiques) (Chklovskaja et al., 2004). Néanmoins, le phénotype des cellules NK change rapidement lorsqu'elles sont stimulées par des cytokines telles que l'IL-2, l'IL-12 et l'IL-15 permettant aux cellules NK de se développer et proliférer comme précédemment indiqué dans le chapitre IV.1.1 (Ferlazzo et al., 2004). Chez les patients sans rechute, la fréquence des cellules NK NKG2A+ KIR2DL2/3/S2- est augmentée à J+60 post-greffe. L'utilisation des marqueurs NKG2A, CD57, NKG2C et KIR2DL3 exprimés sur les cellules NK à J30 post-haplo PTCY nous a permis de définir un répertoire de cellules NK immatures (KIR2DL3-NKG2A+CD57-) associé à moins de rechute chez les patients atteints de LAL alors que les cellules NK matures (CD57+ KIR+) sont plus efficaces chez les patients atteints de LAM (Makanga et al., 2020a). (Makanga et al., 2020a). Après greffes de CSH, la plupart des cellules NK reconstituées expriment un répertoire KIR de type donneur qui peut être différent de celui des cellules NK du patient avant greffe (Abel et al., 2018). Par conséquent, les cellules NK reconstituées exprimant les KIR du donneur peuvent exercer une alloréactivité chez les receveurs ou devenir anergiques en fonction des molécules HLA de classe I allogéniques (Makanga et al., 2020a)

Plusieurs facteurs peuvent affecter la reconstitution des cellules NK post-greffe, tels que le CMV, la proportion de lymphocytes T ainsi que l'administration d'agents immunosuppresseurs. Au cours de la réactivation du CMV, les cellules NK qui expriment NKG2C se développent rapidement et continuent d'augmenter pendant 1 an post-greffe (Della Chiesa et al., 2012). Par ailleurs, près de 60% des cellules NK NKG2C<sup>+</sup> ont atteint une différenciation complète et expriment CD57 après réactivation du CMV. Ces cellules NK de type mémoire peuvent être détectées longtemps après l'infection primaire par le CMV, offrant une protection de longue durée (Foley et al., 2012b; Montaldo et al., 2013). Les patients ayant eu une réactivation du CMV ont un taux de rechute inférieur ou une meilleure survie après greffe qui peut être attribué aux cellules NK de type mémoire (Cardozo et al., 2016; Elmaagacli et al., 2011;

Nakamura et al., 2019; Tordai et al., 2019). En revanche, pour les patients non infectés par le CMV, une proportion plus élevée de cellules NK NKG2A<sup>+</sup> NKG2C<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> dans le sang périphérique indique une maturation lente des cellules NK. Les LT présents dans le greffon peuvent nuire à la récupération des cellules NK et à la reconstitution des KIR (Ciurea et al., 2012; Cooley et al., 2005; Eissens et al., 2010; Pfeiffer et al., 2010). Une explication possible de cette observation est que les LT entrent en compétition avec les cellules NK pour l'IL-15, une cytokine qui régule la survie et le développement des cellules immunitaires (Cooper et al., 2002; Lodolce et al., 1998). Cependant, d'autres études ont montré que les LT du greffon pouvaient contribuer à une meilleure fonction des cellules NK (Foley et al., 2011; Nguyen et al., 2008). Ainsi, il a été rapporté que les cellules NK CD56<sup>bright</sup> présentes dans les ganglions lymphatiques pourraient être stimulées par les LT producteurs d'IL-2, entraînant une maturation des cellules NK avec une sécrétion d'IFN- $\gamma$  plus élevée et de meilleures fonctions cytotoxiques (Fehniger et al., 2003; Ferlazzo et al., 2004).

#### **4. Les réactions allogéniques post-greffes de CSH**

En cas de disparités des antigènes HLA entre le donneur et le receveur (greffes CSH haplo-identique, dUCBT ou 9/10), des réactions immunologiques peuvent se produire : l'effet GvHD (Graft-versus-Host-Disease) et l'effet GvL (Graft-versus-Leukemia) ou GvT (Graft-versus-Tumor). Ces réactions allogéniques post-greffes de CSH sont médiées par les LT et les cellules NK.

La première observation d'un effet GvL remonte à 1956, en utilisant un modèle de greffe de CSH chez des souris où les cellules leucémiques rejetées semblaient être éliminées par la MO infusée lorsque l'irradiation était retardée (Barnes et al., 1956). L'effet GvL est régi par les cellules immunitaires du greffon telles que les lymphocytes T $\alpha\beta$ , les T $\gamma\delta$  et les cellules NK. Ces cellules vont reconnaître et éliminer les cellules tumorales du receveur atteint d'une tumeur maligne. L'effet GvL constitue l'effet thérapeutique recherché pour permettre la rémission complète du patient.

Initialement, la GvHD a été décrite comme aiguë ou chronique en fonction du moment de son apparition post-greffe de CSH soit 100 jours avant ou après. Cependant, d'autres signes et des symptômes cliniques ont dû être pris en compte lors de la classification en tant que GvHD aiguë

ou chronique (Filipovich et al., 2005). La catégorie GVH aiguë est définie en l'absence de signes diagnostiques ou distinctifs de la GVH chronique. Elle comprend la GVHD aiguë classique survenant dans les 100 jours suivant la greffe et la GVHD aiguë persistante survenant au-delà de 100 jours souvent lors de l'arrêt de l'immunosuppression. De la même manière, la GVHD chronique est subdivisée en deux groupes, comprenant la GVHD chronique classique sans caractéristiques d'une GVHD aiguë et le second où la GVHD chronique et la GVHD aiguë apparaissent ensemble. Les symptômes de la GVH chronique peuvent être limités à un seul organe/tissu ou au contraire peuvent être généralisés. Les taux d'incidence rapportés de GVH chronique après allogreffes de CSH vont de 6% à 80% selon l'âge du receveur, le type de donneur, la source de CSH, la manipulation du greffon et l'utilisation d'infusions de lymphocytes de donneurs post-greffe (DLI) (Thomas and Storb, 1970). La prophylaxie principale prescrite pour la GvHDa est la combinaison d'un inhibiteur de la calcineurine (CNI) avec un antimétabolite (Zeiser and Blazar, 2017). Une autre alternative pour prévenir la GvHD est l'élimination des LT du donneur, bien qu'elle soit associée à une plus grande incidence de rechute. La déplétion des LT peut être faite soit *ex vivo* en manipulant le greffon avant greffe, soit *in vivo*, en utilisant des anticorps avant et/ou après greffe.

Suite à une greffe de CSH réalisée pour des patients atteints de LAM, Baron et al. ont constaté que la GvHD aiguë de grade I est associée à une incidence plus faible de rechute et une meilleure survie globale. Cependant, les GvHD aiguës sévères (grades III et IV) sont associées à une survie globale nettement diminuée en raison d'une mortalité sans rechute. De même, l'étendue de la GvHD chronique est corrélée à des taux de rechute plus faibles, mais à une mortalité accrue sans rechute (Baron et al., 2012). En dehors des incompatibilités HLA, d'autres facteurs interfèrent avec la survenue de GVHD, tels que le type de maladie, l'âge du patient, la prophylaxie de la GVHD et la source du greffon (Bachanova et al., 2016; Elmaagacli et al., 2005; Gagne et al., 2009; Pérez-Martínez et al., 2020; Tomblyn et al., 2010; Wu et al., 2010).

## **5. Complications après allogreffes de CSH**

La rechute de la maladie résiduelle est une cause fréquente de survie réduite après greffes de CSH (Gao et al., 2020). L'incidence de rechute varie de 20 à 70 % et dépend de plusieurs facteurs, notamment

l'état de la maladie avant greffe de CSH, des leucémies (LAM ou LAL), de la source de CSH, de l'âge du patient et du donneur et du conditionnement. L'incidence de rechute pour les patients atteints de LAM se situe entre 30 et 40% pour les patients atteints de LAM (Cornelissen and Blaise, 2016) et de 30% pour les patients atteints de LAL (Mohty et al., 2010) dans la première année post-GCSH. Les cellules NK présentes dans le greffon contribuent à la prévention de la rechute puisqu'elles sont fortement impliquées dans l'élimination des cellules leucémiques (Ruggeri et al., 2002; Sivori et al., 2020). De nombreuses études, principalement génétiques et rétrospectives utilisant le modèle d'incompatibilités -KIR ligand dans le sens GvH pour évaluer une potentielle alloréactivité des cellules NK, ont rapporté des résultats contradictoires. Ainsi, Leung et al. ont montré que le nombre d'incompatibilités KIR ligands était corrélé à une protection contre la rechute post-greffe de CSH (Leung et al., 2004). L'effet protecteur des incompatibilités KIR ligand sur l'incidence de rechute a été confirmé (Arima et al., 2018; Chen et al., 2012; Clausen et al., 2007; Hsu et al., 2006; Solomon et al., 2018; Willem et al., 2019b) ou non. (Arima et al., 2020; Clausen et al., 2010; Zhao et al., 2015, 2014). Contrairement aux résultats controversés du modèle KIR ligand, la prise en compte de l'haplotype KIR B ou motif CenB des donneurs de CSH montre plus de résultats concordants en greffes de CSH aussi bien HLA non-identiques et HLA identiques. Cooley et al. ont observé que des patients atteints de LAM greffés avec des donneurs HLA identiques et porteurs de l'haplotype KIR-B avaient une survie sans rechute augmentée de 30 % par rapport à ceux greffés avec des donneurs KIR A/A (Cooley et al., 2009). Par la suite, d'autres études ont confirmé cet effet bénéfique de l'haplotype KIR-B du donneur avec une diminution de la rechute et une amélioration de la survie sans rechute chez les patients atteints d'hémopathies malignes (Chen et al., 2006, 2012; Cooley et al., 2010; Mancusi et al., 2015; Solomon et al., 2018; Verheyden et al., 2005; Weisdorf et al., 2020). Plus particulièrement, certaines études ont montré que cet effet protecteur serait régi par des gènes KIR localisés au niveau du motif CenB comme KIR2DS2 (Bachanova et al., 2016; Cooley et al., 2010; Heatley et al., 2018) (Bachanova et al., 2016; Chen et al., 2012; Heatley et al., 2018; Impola et al., 2014; Solomon et al., 2018), ou au niveau du motif Tel-B comme KIR2DS1 (Mancusi et al., 2015; Neuchel et al., 2017; Schellekens et al., 2008).



Les infections virales représentent une autre complication majeure après greffes de CSH (Gao et al., 2020). Elles surviennent chez 80 à 85% des receveurs de GCSH et sont l'une des principales causes de mortalité sans rechute après une GCSH allogénique (Young et al., 2016). Des facteurs liés au donneur, à l'hôte et à la greffe déterminent le risque d'infections tels que l'âge avancé, l'état de la maladie au moment de la greffe, le type de conditionnement, et le type de greffes de CSH (Eapen et al., 2010). En particulier, Schaffer et al. ont montré que les incompatibilités KIR ligands étaient associées à une augmentation de la mortalité liée à l'infection (Schaffer et al., 2004). Malgré des améliorations dans la surveillance et le traitement préventif avec des agents antiviraux, le CMV reste un contributeur majeur à la morbidité et à la mortalité liée aux infections et mortalité globale post-greffe (Ogonek et al., 2016; van den Brink et al., 2015). L'étude de Zhao et al. a montré que les paires D/R avec une incompatibilité KIR ligand présentaient un taux de réactivation du cytomégalovirus (CMV) et un pourcentage de cellules NK produisant de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) significativement plus élevés par rapport aux paires D/R sans incompatibilité KIR ligands (Zhao et al., 2017). D'autres études ont montré que les gènes KIR-B présent chez les donneurs protégeaient les patients greffés contre les infections au CMV dans un contexte de GCSH non T-déplétées (Chen et al., 2006; Cook et al., 2006; Gallez-Hawkins et al., 2011; Heatley et al., 2018; Tomblyn et al., 2010). Des études ont rapporté que les donneurs exprimant un nombre plus élevé de KIR activateurs étaient associés à un taux de réactivation du CMV inférieur (Wu et al., 2009; Zaia et al., 2009). En particulier, l'activation de KIR2DS2 ou KIR2DS4 pourrait jouer un rôle protecteur majeur contre les infections virales (Gallez-Hawkins et al., 2011; Zaia et al., 2009). Par ailleurs, les patients greffés avec des donneurs de CSH KIR2DS1+ sont associés à un meilleur contrôle infectieux (Heatley et al., 2018; Mancusi et al., 2015). En dehors de la réactivation du CMV, l'incidence des infections bactériennes est également réduite lorsque les patients sont greffés avec des donneurs de génotype KIR-B/x (Tomblyn et al., 2010).

Enfin, après GCSH haplo-PTCY une autre complication est le syndrome de libération de cytokines (SRC). Le SRC est causé par l'activation et la prolifération rapide des LT alloréactifs du donneur et l'élévation de plusieurs cytokines dont l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ . L'incidence due SRC diffère selon la source de CSH (Lee et al., 2014).

## 6. Rôle des cellules NK en greffes de CSH

Suite à une greffe de CSH, les cellules NK sont les premières cellules cytotoxiques à apparaître avant une reconstitution des LT. Les cellules NK vont donc contribuer à la protection contre la rechute et des infections virales tout en facilitant la prise de greffe (Cooley et al., 2018). Plus particulièrement, les cellules NK exprimant des récepteurs KIR qui ont pour ligand certaines molécules HLA de classe I jouent un rôle central. Depuis 2000 à défaut de pouvoir suivre la reconstitution des cellules NK KIR+ post-greffe, 4 modèles d'études ont été mis en place afin de prédire une potentielle alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH sur la base des ligands KIR, des gènes/génotypes KIR et des combinaisons KIR/KIR ligand (KIR-L) (Symons et al., 2010a) (**Figure 19**). L'équipe italienne du Professeur Velardi a été la première à proposer le modèle d'incompatibilités KIR ligand (KIR-L) basé sur les typages HLA de classe I (en particulier HLA-C) des paires D/R (Ruggeri et al., 2002). Ainsi, dans le cadre de GCSH haplo-identiques fortement T-déplétées, les incompatibilités KIR-L dans le sens GvH (ex donneur C1C2/receveur C1C1) sont associées à une diminution du taux de rejet, une absence de rechute ainsi que de GvHD aigüe uniquement chez les patients atteints de LAM (Locatelli et al., 2018; Ruggeri et al., 2002). Ces données mettant en avant l'impact bénéfique d'une alloréactivité des cellules NK du donneur en greffes haploidentiques fortement T déplétées ont parfois été confirmées par d'autres équipes dans d'autres contextes de greffes de CSH HLA non identiques (Bastos-Oreiro et al., 2016; Solomon et al., 2018; Symons et al., 2010a; Wanquet et al., 2018) mais le plus souvent non reproduites. Le second modèle appelé "modèle du ligand manquant", est établi sur la base des compatibilités entre les KIR inhibiteurs présents chez le donneur et les ligands HLA de classe I spécifiques absents chez le receveur. L'étude de Leung et al. suggère que le modèle ligand manquant est associé à une meilleure prédiction du risque de rechute de la leucémie que le modèle KIR-L (Leung et al., 2004). De plus, des études ont montré que dans les GCSH HLA apparentées, l'absence de ligands KIR chez le receveur (c'est-à-dire l'absence de Bw4, C1 ou C2) pour les KIR inhibiteurs du donneur peut être un facteur pronostique bénéfique avec une augmentation la survie globale, de la survie sans maladie, et/ou d'une diminution de l'incidence des rechutes pour les patients atteints de LAM (Hsu et al., 2005; Shilling et al., 2003) ou avoir aucun effet (Björkström et al., 2010). Grâce à une meilleure compréhension des haplotypes KIR, le troisième modèle KIR analyse et compare les génotypes KIR de

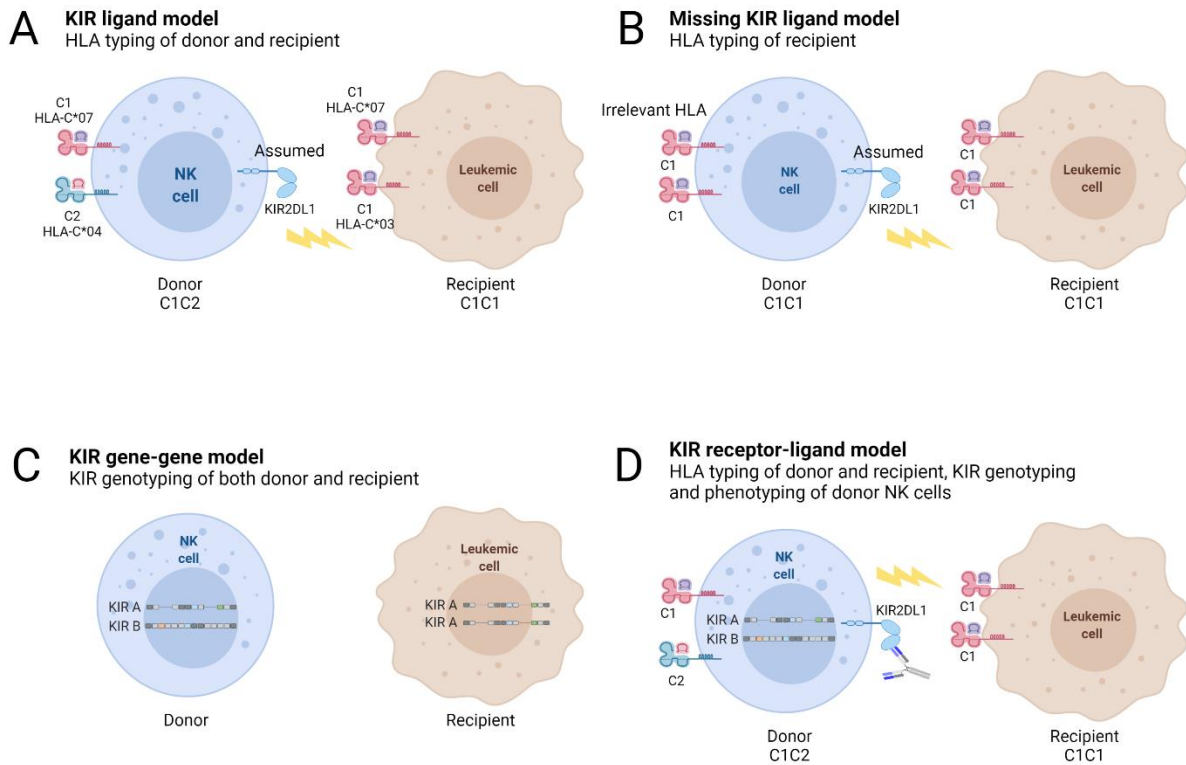
différents donneurs et/ ou des receveurs. Ainsi, dans le cadre de greffes de CSH non apparentées HLA identiques, Cooley et al., ont montré que les patients atteints de LAM greffés avec des donneurs présentant des haplotypes KIR B étaient associés à une meilleure survie sans rechute (Cooley et al., 2009). Plus largement, le score du contenu génétique KIR (KIR B  $\geq$ 2) (Cooley et al., 2010), les génotypes KIR B/x (Weisdorf et al., 2020), et/ou le motif CenB02 KIR (Guethlein et al., 2021) des donneurs de CSH devraient être privilégiés pour les patients atteints de LAM afin de diminuer l'incidence des rechutes. Notamment, une étude prospective et multicentrique a souligné la faisabilité de réaliser un génotypage KIR du donneur sans retarder la greffe (Weisdorf et al., 2019). Cependant, d'autres études ont montré que les donneurs avec un génotype KIR-B/x entraînaient une fréquence plus élevée de GVHD chez les receveurs par rapport à ceux greffés avec des donneurs de génotype KIR A/A, probablement en raison de la production plus puissante d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK alloréactives (Chen et al., 2012; Cooley et al., 2009; Hosokai et al., 2017; Zhao et al., 2014). L'attribution des allèles KIR du donneur prend plus de temps et leur effet sur les résultats de la GCSH se concentre principalement sur des gènes KIR limités avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK KIR+, comme cela a été rapporté pour KIR2DL1 (Bari et al., 2009). Pour finir le quatrième modèle « KIR/KIR ligand » qui vérifie la présence et l'expression des KIR chez le donneur et la présence ou absence des ligands HLA chez le receveur. Notamment, Boudreau et al., montrent un effet bénéfique sur la rechute pour des donneurs avec des sous-types spécifiques KIR3DL1-HLA-B associés à une inhibition faible (KIR3DL1-high et HLA-Bw4-80T ; KIR3DL1-low et HLA-Bw4-80I) ou à un manque d'inhibition (KIR3DL1-none et HLA-Bw4) des cellules NK dans un contexte de patients atteints de LAM avec une GCSH non apparentées HLA 10/10 et 9/10 (Boudreau et al., 2017). A l'inverse, la combinaison de donneurs possédant des allèles KIR3DL1 exprimé avec des receveurs possédant l'allèles HLA-A\*24 est associée à un risque plus élevé de rechute de LAM après une GCSH allogénique (van der Ploeg et al., 2020). Schetelig et al. ont rapporté qu'il n'y avait aucune corrélation entre les combinaisons KIR3DL1/HLA-B et la rechute ou la SG dans les GCSH non apparentées incluant également des paires HLA 10/10 et 9/10 (Schetelig et al., 2020). Les discordances observées de l'effet de ces modèles génétiques KIR/KIR ligands sur le devenir des greffes de CSH peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs inhérents aux greffes comme i) le type de greffon (manipulé vs non manipulé), ii) le

régime de conditionnement (myéloablatif vs réduit), iii) la source (cellules souches périphérique vs MO), le nombre de CSH utilisées (« mégadoses » en haplo-HSCT), iv) le type de prophylaxie de la GvHD, v) les pathologies (LAL vs LAM) et vi) l'état clinique du patient au moment de l'allogreffe (maladie précoce vs avancée). En dehors des paramètres liés aux greffes, certains modèles génétiques KIR/KIR ligands supposent la présence d'un KIR inhibiteur donné chez le donneur sans analyse de son expression au niveau des cellules NK, de son polymorphisme allélique KIR et/ou celui lié aux ligands HLA de classe I. Ces modèles ne permettent pas à l'heure actuelle de prédire la fréquence des sous-populations NK KIR<sup>+</sup> ni la structuration large du répertoire des cellules NK en post-greffe de CSH.

En dehors des KIR inhibiteurs, il a été démontré que les KIR activateurs jouaient un rôle important dans la médiation de l'alloréactivité NK (Chewning et al., 2007; Pende et al., 2009). En effet, Pende et al., ont montré que l'activation des cellules NK KIR2DS1<sup>+</sup> de donneurs C1<sup>+</sup> peut surmonter l'inhibition médiée par les récepteurs KIR2DL2/3 et CD94/NKG2A entraînant une lyse efficace des cellules leucémiques C2<sup>+</sup>. En plus de KIR2DS1, nous avons rapporté un impact bénéfique des donneurs KIR3DS1<sup>+</sup> chez les receveurs Bw4<sup>+</sup> atteints de maladies myéloïdes sur l'incidence des rechutes après GCSH non apparentées (Gagne et al., 2009). Venström et al. a également confirmé l'impact bénéfique des donneurs KIR3DS1<sup>+</sup> en diminuant la mortalité liée au traitement et l'incidence de GvHD aigue, sans impact sur les rechutes (Venstrom et al., 2010).

Au cours des cinq dernières années, la GCSH haplo-PTCy a offert un nouveau moyen d'identifier les marqueurs KIR et/ou HLA de classe I qui permettent d'améliorer l'effet GvL produit par les cellules NK (Baumeister et al., 2020; Dubois et al., 2020). Dans ce contexte, les donneurs et les receveurs ne partagent qu'un seul haplotype HLA ; par conséquent, les mésappariements HLA de classe I pourraient représenter des mésappariements KIR-L. Les donneurs et les receveurs pourraient également avoir des haplotypes et des gènes KIR différents. En ce qui concerne les mésappariements KIR-L, des études ont rapporté un effet bénéfique sur la survie globale et les rechutes après une GCSH haplo-PTCy chez des patients ayant reçu un conditionnement MAC ou RIC (Bastos-Oreiro et al., 2016; Solomon et al., 2018; Wanquet et al., 2018). Plus particulièrement, l'étude de Bastos-Oreiro et al. (Bastos-Oreiro et al., 2016) ont rapporté l'effet bénéfique d'au moins un mismatch inhibiteur du gène KIR sur l'amélioration de la

survie sans événement et la diminution des rechutes après une GCSH haplo-PTCy. En revanche, chez les patients atteints de LAM greffés avec des PBSC, Shimoni et al. (Shimoni et al., 2019) ont rapporté un effet délétère des mésappariements KIR-L avec une augmentation des rechutes et une diminution de la SG, après GCSH haplo-PTCy. En ce qui concerne les mésappariements de gènes KIR inhibiteurs, Symons et al (Symons et al., 2010a) ont signalé un effet bénéfique sur l'amélioration de la SG et la diminution de la mortalité par rechute et sans rechute après une GCSH haplo-PTCy chez des patients atteints de maladies lymphoïdes et myéloïdes. Dans une récente étude, nous avons rapporté un effet bénéfique des mésappariements KIR2D/HLA-C dans le sens GvH, en diminuant l'incidence des rechutes tout en augmentant la SG, l'aGvHD et la DFS après une GCSH haplo-PTCy (Willem et al., 2019b). Concernant les études basées sur les génotypes KIR, Symons et al. (Symons et al., 2010a) ont montré que les receveurs avec un génotype KIR AA associé au génotype KIR B+ du donneur étaient associés à moins de rechutes. Par ailleurs, l'étude de Solomon et al. (Solomon et al., 2018) a également rapporté un effet bénéfique sur l'incidence des rechutes du génotype KIR B+, et plus particulièrement avec la présence du gène KIR2DS2 chez le donneur. Pour finir, Bastos-Oreiro et al. (Bastos-Oreiro et al., 2016) ont rapporté qu'il n'y avait pas d'effet protecteur du génotype KIR B+ du donneur sur l'incidence des rechutes après une haplo-PTCy chez un nombre limité de patients avec des régimes de conditionnement mixtes. L'impact des polymorphismes des allèles KIR sur les résultats de l'haplo-PTCy n'a pas été étudié jusqu'à présent.



**Figure 19 : Modèles d'études KIR/HLA pour la prédiction d'une alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH**

Quatre modèles ont été mis en place afin de prédire une potentielle alloréactivité des cellules NK en greffes de CSH sur la base des ligands KIR (HLA de classe I), des gènes/génotypes KIR et des combinaisons KIR/KIR ligand (KIR-L). La connaissance des typages HLA classe I des paires donneur/receveur permet d'identifier les incompatibilités HLA de classe I en termes de ligands KIR dans le sens du greffon contre l'hôte (GvH) dans les GCSH HLA non identiques telles que celles définies dans le modèle de ligands KIR (A) ou dans le modèle ligand manquant chez les receveurs (B). Dans ces 2 modèles, les gènes KIR présents et leur expression ne sont pas évalués. Le génotypage KIR des donneurs et/ou des receveurs permet de déterminer les gènes KIR inhibiteurs et/ou activateurs qui ont un impact sur le résultat des GCSH, tels que définis par le modèle gène/gène KIR (C). Le génotypage des gènes HLA de classe I dans les paires donneur/receveur et des gènes KIR chez les donneurs permet l'identification à la fois des cellules NK KIR+ éduquées et des ligands KIR manquants chez les receveurs (D). Dans ce modèle récepteur-ligand KIR, l'expression des KIR peut être évaluée à l'aide d'anticorps monoclonaux (mAb) anti-KIR appropriés ou peut être déduite des allèles KIR présents chez le donneur (D). Inspirée de (Symons et al., 2010a).

## **VI) Immunothérapies dans le contexte des leucémies aiguës**

Chez les patients leucémiques, les cellules NK ont généralement des fonctions et un répertoire altéré. Ainsi, les immunothérapies basées sur les cellules NK visent à augmenter le potentiel anti-leucémique chez les patients en utilisant l'ajout de cytokines spécifiques, de mAbs et/ou le transfert adoptif de cellules NK non modifiées ou modifiées.

### **1. Administration de cytokines pour renforcer l'alloréactivité des cellules NK**

Une administration de cytokines peut être réalisée après greffe de CSH permettant d'augmenter la fonction anti-leucémique des cellules NK et prévenir en conséquence la rechute. Parmi les cytokines, l'administration de l'IL-2 associée à l'IL-15 est utilisée, ces cytokines favorisent la survie, la prolifération, la différenciation et l'activation des cellules NK. En particulier, une forme mutante de l'IL-2 appelée superkine IL-2. Cette superkine favorise la prolifération et l'activation des cellules NK ainsi que des CTL (Levin et al., 2012). Une autre cytokine molécule d'administrée, est l'ALT-803, un super-agoniste de l'IL-15 a été conçu pour augmenter la demi-vie de l'IL-15 et mimer la trans-présentation *in vivo*. L'IL-15 de par sa trans-présentation par le récepteur IL-2/IL-15R induit l'expansion des cellules NK et des lymphocytes T CD8+. Récemment, une étude sur 33 patients en rechute a montré un effet bénéfique clinique chez 19 de ces patients après administration de l'ALT-803 (Romee et al., 2018). Pour finir, un essai clinique est en cours pour vérifier les effets de l'ALT-803 seule ou en tant qu'adjuvant du transfert adoptif des cellules NK (Bailey et al., 2017).

### **2. Exploitation de l'ADCC avec les anticorps monoclonaux, les BiKE et les TriKE**

Outre les cytokines, les AcM spécifiques des antigènes tumoraux peuvent être utilisés pour améliorer la fonction ADCC des cellules NK par la liaison du fragment Fc des IgG avec le récepteur CD16. En particulier, l'AcM CD133 optimisé a montré une meilleure affinité avec les cellules NK associée à une forte dégranulation des cellules NK contre les LAM (Koerner et al., 2017). CD133 est un marqueur utilisé pour l'isolement des populations de cellules souches cancéreuses de différentes tumeurs (Kim et al., 2017). Un autre AcM utilisé est l'anticorps anti-CD33 humanisé (BI836858), qui cible

l'antigène myéloïde CD33<sup>+</sup>. Cet Ac présente une liaison avec le CD16 élevée et une diminution de la cinétique d'internalisation comparativement à l'AcM anti-C33 optimisé (Vasu et al., 2016).

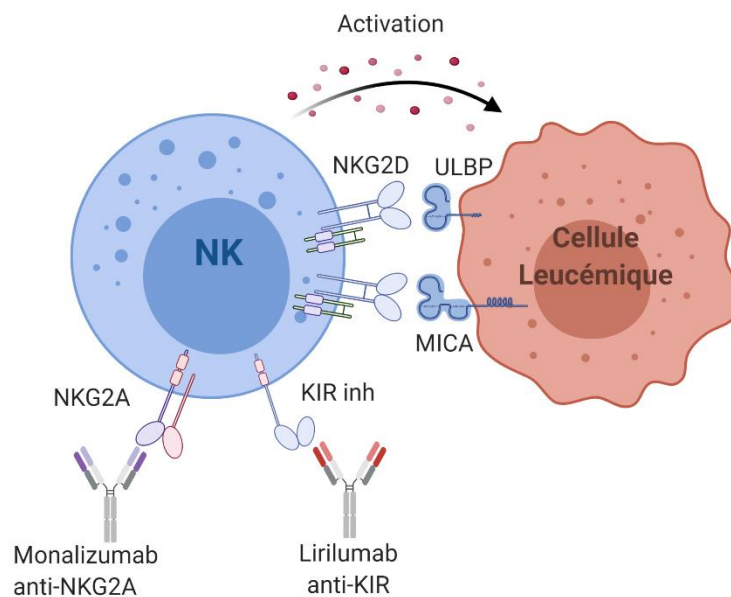
Parmi les AcM, les BiKEs et les TriKEs (trispécifique NK cell engage) sont utilisés pour moduler l'activité des cellules NK. Ce sont des protéines génétiquement modifiées pour contenir des fragments variables à chaîne unique dirigée simultanément contre deux ou trois antigènes différents. L'un est l'antigène cible exprimé à la surface des cellules tumorales et l'autre est un récepteur activateur exprimé à la surface des cellules NK tel que le récepteur CD16. En particulier, il a été montré que le BiKE CD16xCD33 cible l'antigène myéloïde CD33<sup>+</sup> et déclenche *in vitro* l'activité lytique des cellules NK contre les cellules de LAM (Koerner et al., 2017; Wiernik et al., 2013). D'autres Bikes ont été développés tel que CD16xCD133 (Pörtner et al., 2012) et CD16 et CD19 qui déclenchent directement l'activation des cellules NK contre les cellules B (Chen et al., 2016). Les TriKes se lient à un récepteur activateur exprimé sur les cellules NK et à deux Ag exprimés sur les cellules tumorales pouvant induire une forte synapse immunologique (Giuliani and Poggi, 2020; Gleason et al., 2012; Glorius et al., 2013). Les Trikes CD16xCD19xCD22 et CD16xCD20xCD20 déclenchent l'activation de l'ADCC des cellules NK contre des leucémies à LB (Gleason et al., 2012; Glorius et al., 2013). De surcroît, le TriKE CD16xIL-15xCD33 (Vallera et al., 2016), composé d'un scFv anti-CD16, d'un linker IL-15 modifié et d'un scFv anti-CD33 peut stimuler l'activation des cellules NK, l'ADCC et la production des cytokines conduisant à l'activation de la voie perforine/granzyme dirigée contre les LAL et les LAM (Wiernik et al., 2013).

### **3. Ciblage des points de contrôle inhibiteurs pour améliorer l'effet GvL**

Les immunothérapies basées sur les cellules NK utilisant des AcM peuvent également cibler des points de contrôle immunitaire pour bloquer l'inhibition des cellules NK. Plusieurs AcM existants ciblent des récepteurs inhibiteurs tels que les KIR (Kohrt et al., 2014; Romagné et al., 2009) et le NKG2A (Borst et al., 2020; McWilliams et al., 2016; Ruggeri et al., 2016; van Hall et al., 2019). Parmi ces AcM, l'AcM1-7F9 (IPH2101), un anticorps antipan-KIR est utilisé. Il interagit avec les récepteurs KIR2DL exprimés par les cellules NK augmentant fortement la cytotoxicité des cellules NK contre les



cellules tumorales chez des patients atteints de LAM, de lymphomes et de myélomes multiples (MM) (Benson et al., 2015, 2012; Carlsten et al., 2016; Romagné et al., 2009). Un autre anticorps monoclonal anti-KIR utilisé est le Lirilumab qui reconnaît le KIR2DL1 et permet également une augmentation des fonctions de cytotoxicité des cellules NK contre les cellules tumorales (Kohrt et al., 2014). Le Monalizumab, spécifique du NKG2A, permet de bloquer l'interaction entre le NKG2A et son ligand HLA-E permettant d'augmenter le signal activateur et donc d'augmenter les fonctions anti-tumorales des cellules NK (Ruggeri et al., 2016). De plus, les anticorps monoclonaux reconnaissant le récepteur PD-1 sont intéressants et peuvent être utilisés pour améliorer les capacités antitumorales des cellules. PD-1 est retrouvé sur les cellules NK CD56<sup>dim</sup> présentant un phénotype NKG2A<sup>-</sup> KIR<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>. Cette population de cellules NK PD1<sup>+</sup> possède une activité fonctionnelle réduite et pourrait avoir une expansion préférentielle dans les environnements tumoraux. Par conséquent, plusieurs Ac anti-PD1 ont été développés tels que le pidilizumab, le lambrolizumab et le nivolumab (Giuliani et al., 2017).



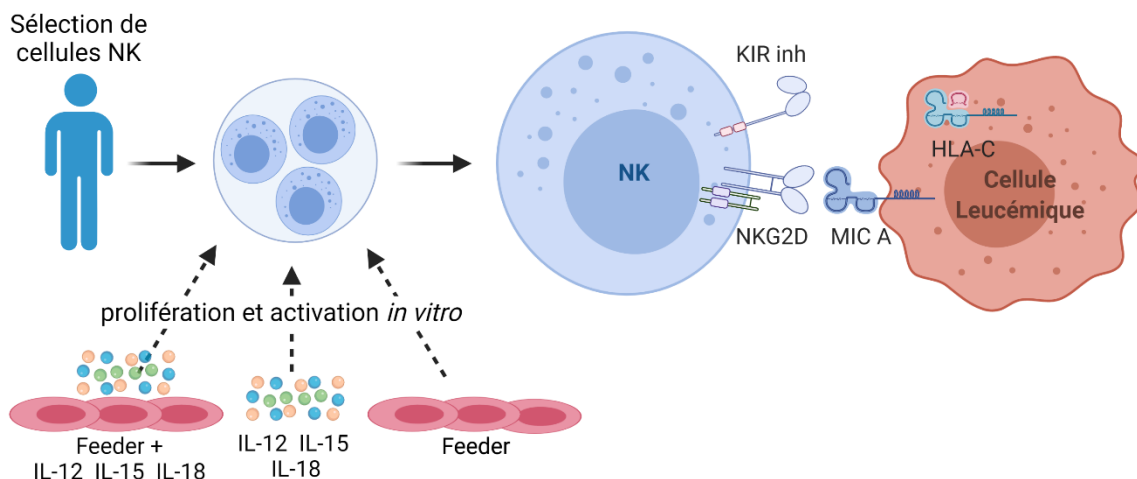
**Figure 20 : Ciblage des points de contrôle inhibiteurs des cellules NK**

Les Ac monoclonaux sont utilisés pour cibler des points de contrôle afin de bloquer l'inhibition des cellules NK. Plusieurs AcM existent et ciblent les récepteurs inhibiteurs tels que les KIR et le NKG2A. Sur la figure, l'AcM Lirilumab (anti-KIR) et Monalizumab (anti-NKG2A) vont bloquer les récepteurs inhibiteurs, empêchant le signal inhibiteur. Le blocage des récepteurs inhibiteurs permet au récepteur activateur de reconnaître les ligands de stress (ULBP et MICA) exprimés par les cellules leucémiques, et de déclencher la lyse cellulaire par les cellules NK.

#### 4. Transfert adoptif de cellules NK alloréactives

La transfusion de cellules NK allogéniques activées *ex vivo* représente un réel avantage contre les cellules leucémiques, puisque contrairement aux LT, les cellules NK allogéniques ne sont pas restreintes par le système HLA. Un autre avantage de cette immunothérapie est que la source des cellules NK est multiple. En effet, les cellules NK peuvent provenir du sang périphérique, du sang de cordon (UCB), de cellules souches embryonnaires, de cellules souches pluripotentes induites ou de lignées.

Le transfert adoptif des cellules NK consiste à administrer des cellules NK autologues ou allogéniques en prophylaxie ou en cas de rechute après greffe de CSH (Cooley et al., 2018). Les cellules NK représentent environ 10% des cellules mononuclées du sang périphérique et il peut être difficile d'obtenir la quantité nécessaire de cellules NK au traitement, mais une alternative a été trouvée pour pallier à cette difficulté. Une expansion des cellules NK *in vitro* peut être réalisée avant l'administration. Actuellement, plusieurs protocoles permettent cette expansion *in vitro* basée sur différentes cytokines et l'utilisation de cellules nourricière. La plupart des protocoles utilisent un cocktail de cytokines comprenant les interleukines l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-18 et l'IL-21 qui vont être nécessaires pour l'activation et l'expansion des cellules NK (Bachiller et al., 2020).



**Figure 21 : Transfert adoptif de cellules NK alloréactives**

Le transfert adoptif des cellules NK consiste à administrer des cellules NK autologues ou allogéniques. Une expansion des cellules NK *in vitro* est réalisée avant l'administration. Plusieurs protocoles sont utilisés avec notamment l'utilisation d'un cocktail de cytokines (IL-2, IL-15 et IL-18) et/ou de cellules nourricières

## **5. Transfusion des cellules CAR-NK**

La transfusion de cellules NK modifiées génétiquement pour exprimer des récepteurs d'antigène chimérique (CAR-NK) représente une immunothérapie innovante et prometteuse contre les hémopathies malignes. Les CAR-NK sont composés d'un domaine de signalisation extracellulaire capable de reconnaître un antigène tumoral, d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire qui active des voies permettant d'améliorer la lyse des cellules cibles. Les récentes générations de CAR peuvent contenir plusieurs domaines de co-stimulation intracellulaires composés de CD3 $\zeta$  et CD28 capables d'induire une activation persistante des lymphocytes NK. Les cellules NK CAR éliminent les tumeurs non seulement grâce à la capacité des CAR à reconnaître spécifiquement les tumeurs exprimant des antigènes, mais aussi grâce aux récepteurs des cellules NK eux-mêmes (Wang et al., 2020).

Les essais précliniques des cellules NK-CAR ont démontré des avantages cliniques chez les patients atteints de LAM après greffe de CSH. Actuellement, les cellules NK92 et les cellules NK primaires sont utilisées pour produire des CAR-NK utilisées dans les cancers hématologiques. Les CAR-NK développés ciblent principalement les marqueurs tumoraux des cellules B CD19+ ou CD20+ pour les LAL (Liu et al., 2020) et des cellules myéloïdes CD33+ pour les LAM (Tang et al., 2018). Cependant, des études approfondies doivent être encore réalisées pour résoudre certains problèmes tels que le taux de survie et la cytotoxicité des cellules NK après décongélation. De nouvelles stratégies sont développées pour augmenter à la fois la sécurité et l'efficacité des immunothérapies par des cellules NK CAR, incluant notamment l'intégration de gènes suicides dans les constructions CAR.

# OBJECTIFS

Le laboratoire de recherche de l'EFS Centre-Pays de la Loire site de Nantes est rattaché à l'équipe 1 INSERM 1232 du Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA). Le CRCINA est réparti en 17 équipes de recherche localisées sur 5 sites. Ces équipes ont pour missions d'étudier les processus biologiques liés à la complexité moléculaire des cellules cancéreuses, à la diversité tumorale et à l'études des effets des différents traitements. Le CRCINA est divisé en trois départements principaux : le département INCIT (Immunologie et Immunothérapie), le département ONCO et le département NOhMAD. Le département INCIT regroupe 8 équipes dont l'équipe 1. Les travaux du département INCIT visent à étudier les aspects fondamentaux de l'immunité cellulaire, sur le versant inné et/ou le versant adaptatif, ainsi que les altérations de ces réponses dans des pathologies sévères, telles que les tumeurs solides (mélanome, cancer colorectal, mésothéliome et cancer de l'ovaire) et hématologiques (leucémies et lymphomes B). Au-delà de la recherche fondamentale, ces projets visent à proposer des stratégies immunothérapeutiques innovantes. Les recherches de l'équipe 1 sont dévolues à l'immunobiologie des lymphocytes humains T non conventionnels  $\gamma\delta$ ,  $T\alpha\beta$ , NK, la biologie de l'IL15 et leurs applications en immunothérapies. En lien avec les missions de l'EFS en termes de recherche, le laboratoire de recherche EFS de Nantes étudie l'immunobiologie des cellules NK dans le contexte des greffes de CSH allogéniques pour le traitement des leucémies aiguës chez l'adulte. Le laboratoire étudie en particulier le polymorphisme des gènes KIR et HLA de classe I reposant à la fois sur des approches génétiques et cellulaires de façon à déterminer la contribution de ces combinaisons KIR/HLA dans 1) la constitution du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>, 2) la réponse NK anti-leucémique et 3) la reconstitution des cellules NK post-greffe de CSH.

Les travaux du laboratoire ont rapporté la diversité des gènes KIR dans différentes populations, l'impact de la compatibilité des gènes HLA (Gagne et al., 2015), des gènes KIR (Bignon and Gagne, 2005; Gagne et al., 2007, 2002) sur le devenir des greffes de CSH (MO et CSP) non-apparentées et le rôle des combinaisons KIR/HLA et des cellules NK en double-greffes de sang de cordon (Pauline Rettman et al., 2016; P. Rettman et al., 2016; Rettman et al., 2017, 2015). Sur un plan plus fondamental, le laboratoire a rapporté l'impact du polymorphisme allélique KIR3DL1 sur le répertoire NK (Gagne et al., 2013). En parallèle, grâce à l'utilisation d'anticorps anti-KIR spécifiques développés au laboratoire

permettant de discriminer les récepteurs KIR inhibiteurs de leurs homologues activateurs (David et al., 2009), les travaux du laboratoire ont permis de mieux comprendre l'immunobiologie des différentes sous-populations NK KIR<sup>+</sup> (Morvan et al., 2009, 2008). En particulier, les données du laboratoire ont démontré que le récepteur KIR2DL3 présente un large spectre de reconnaissance des molécules HLA de classe I contrairement à une spécificité de ligand stricte pour le récepteur KIR2DL1 (David et al., 2013). En parallèle, le laboratoire a développé une technologie de séquençage-nouvelle-génération (NGS) appliqué aux gènes KIR (Maniangou et al., 2018) pour approfondir le polymorphisme allélique KIR de l'ensemble des gènes KIR. Depuis 2016, en dehors d'un axe fondamental, les travaux du laboratoire se concentrent sur l'étude de la reconstitution des cellules NK post-greffes haplo-PTCy (Retière et al., 2018) et la caractérisation fine des sous-populations NK anti-leucémiques. Ainsi, les travaux du laboratoire ont récemment rapporté le rôle bénéfique des incompatibilités KIR/HLA sur la rechute post-greffe PTCy (Willem et al., 2019a) et une hétérogénéité inter/intra-individuelle des réponses NK anti-leucémiques (Makanga et al., 2020b).

Le contenu en gènes KIR, l'environnement HLA de classe I et certaines infections virales telles que celles liées au CMV impactent la structuration du répertoire NK au niveau quantitatif (fréquence des sous-populations NK) et qualitatif (phénotype des sous-populations NK). Les récepteurs KIR et les molécules HLA de classe I constituent la paire récepteur/ligand la plus polymorphe et polygénique chez l'homme, leurs interactions structurent le répertoire NK et modulent les fonctions des cellules NK. Cependant, le polymorphisme génétique et allélique des marqueurs KIR et HLA complexifient fortement les règles de structuration du répertoire NK. Nous émettons l'hypothèse qu'à la fois les produits d'allèles KIR et le niveau d'expression des molécules HLA de classe I exprimées à la surface des cellules NK modulent le développement et la structuration du répertoire fonctionnel des cellules NK KIR<sup>+</sup>. De ce fait, plusieurs questions restent en suspens comme : quelle est l'étendue de la diversité du polymorphisme allélique KIR dans notre population ? Quel est l'impact de ce polymorphisme KIR sur le phénotype et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup> ? Quel est l'impact du polymorphisme allélique HLA de classe I sur l'expression des molécules HLA-C ? Quel est l'impact du niveau d'expression des molécules HLA-C sur l'éducation et la fonction des cellules NK KIR<sup>+</sup> ?

Les objectifs de la thèse ont été d'évaluer 1) l'impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK, 2) l'impact du polymorphisme allélique des gènes HLA-C sur le niveau d'expression des molécules HLA-Cw et sur la structuration phénotypique/fonctionnelle des cellules NK KIR+, 3) l'impact du polymorphisme KIR/HLA sur le devenir des greffes de CSH haplo-PTCy. Pour répondre au 1<sup>er</sup> objectif, nous avons évalué à partir d'une cohorte de donneurs de sang, l'impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur le répertoire des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> (**Article n°1**). Pour répondre au 2<sup>ème</sup> objectif, nous avons mis en place en lien avec différents services de l'EFS CPDL, une cohorte de donneurs de sang HLA-C homozygotes afin d'évaluer l'impact du polymorphisme HLA-C sur le répertoire des cellules NK (**Article n°2**). Pour répondre au 3<sup>ème</sup> objectif, en collaboration avec le service d'Hématologie du CHU de Nantes, nous avons évalué rétrospectivement l'impact du polymorphisme KIR/HLA sur la rechute post-greffes de CSH haplo-PTCy (**Article n° 1**) et sur la réponse NK anti-leucémique (**Articles en annexe**). Enfin, nous avons pu confronter nos résultats aux données de la littérature afin d'établir le lien entre les études fondamentales portant sur la contribution du polymorphisme KIR/HLA sur le répertoire NK et les études cliniques évaluant le rôle des cellules NK post-greffes de CSH haplo-PTCY ou plus largement dans les immunothérapies (**Article n°3**).

# RÉSULTATS



**ARTICLE N°1:** Centromeric KIR AA individuals harbor NK cell features that limit myeloid leukemia relapse after haplo-identical hematopoietic stem cell transplantation.

Léa Dubreuil, Bercelin Maniangou, Patrice Chevallier, Agnès Quéméner, Nolwenn Legrand, Marie C. Béné, Catherine Willem, Gaëlle David, Mehdi Alizadeh, Dhon Roméo Makanga, Anne Cesbron, Ketevan Gendzekhadze, Katia Gagne and Christelle Retière

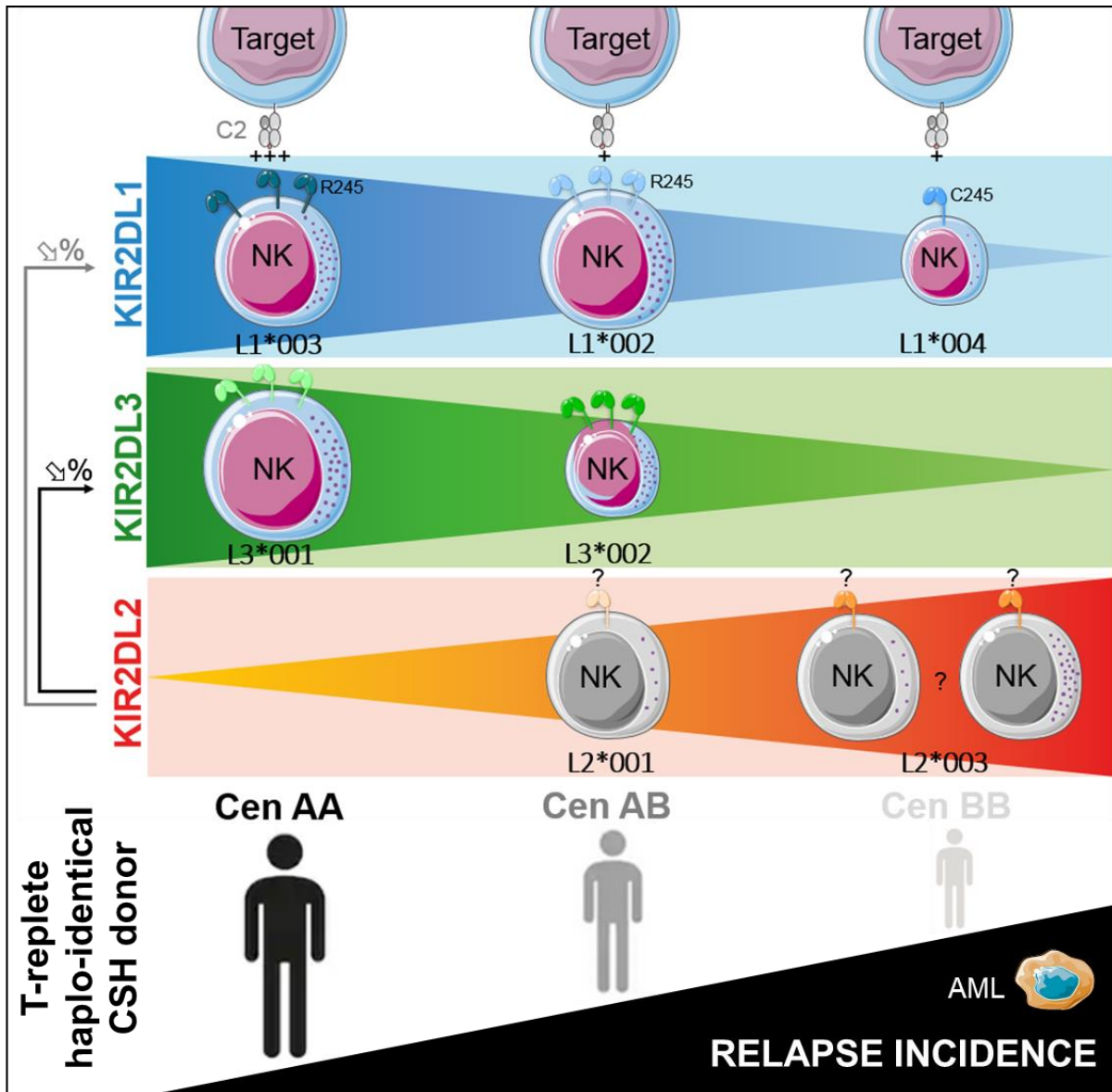
*Cancers*, 2020, 12(12), 3595

La structuration et la fonction du répertoire des cellules NK dépendent de l'expression clonale de différentes combinaisons KIR définies par le nombre et la nature des gènes et des allèles KIR, de l'environnement HLA de classe I et de l'histoire immunologique, comme par exemple l'infection par le CMV (Béziat et al., 2017; Djaoud and Parham, 2020). Les gènes KIR présentent une grande diversité génotypique et allélique avec actuellement 660 génotypes KIR et 1110 allèles KIR décrit dans le monde (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). Bien que certaines études aient souligné l'effet du polymorphisme allélique de KIR sur le phénotype et la fonction des cellules NK, comme cela a été rapporté pour KIR3DL1 (Gagne et al., 2013; Gardiner et al., 2001) et pour KIR2DL1 (Bari et al., 2009; Dunphy et al., 2015; Le Luduec et al., 2019), l'absence de méthodes à haute résolution a limité les investigations sur le répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>. Outre le polymorphisme allélique de KIR, les donneurs de cellules souches hématopoïétiques présentant un motif génétique KIR B sont préférentiellement choisis pour réduire l'incidence des rechutes après une greffe de cellules souches hématopoïétiques HLA identiques non apparentés (Cooley et al., 2010; Weisdorf et al., 2020), ce qui confirme le rôle du KIR activateur ou du KIR2DL2. Cette protection contre les rechutes chez les patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LMA) est observée après des régimes de conditionnement myéloablatif (MAC) et de conditionnement d'intensité réduite (RIC) (Cooley et al., 2010; Weisdorf et al., 2020). Dans le contexte de la HSCT haplo-identique HLA à T-replet utilisant le cyclophosphamide post-transplantation (haplo-PTCY), certaines études ont rapporté l'impact des génotypes KIR du donneur et/ou des mésappariements KIR/HLA sur le résultat du patient après haplo-PTCY (Bastos-Oreiro et al., 2016; Shimoni et al., 2019; Solomon et al., 2018; Symons et al., 2010a; Wanquet et al., 2018; Willem et al., 2019b). En particulier, nous avons montré que les incompatibilités KIR2DL/HLA sont bénéfiques pour améliorer le résultat des patients après une haplo-PTCY (Willem et al., 2019b). Dans le cas d'une haplo-PTCY pour laquelle de multiples options de donneurs de CSH sont possibles, la question se pose de savoir si des marqueurs génétiques comme KIR aident à sélectionner le meilleur pour améliorer une reconstitution immunitaire efficace associée à un effet GvL bénéfique.

Pour répondre à cette question, nous avons étudié en profondeur l'influence du polymorphisme allélique de KIR2DL1/2/3 sur la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire des cellules

NK de 108 individus sains en combinant le typage haute résolution des allèles KIR par séquençage de nouvelle génération (NGS) (Maniangou et al., 2018), la cytométrie en flux haute résolution utilisant des AcM spécifiques de KIR (David et al., 2009) et la modélisation in silico KIR/HLA-C. En parallèle, nos résultats in vitro ont été comparés aux observations ex vivo chez 81 patients HSCT haplo-identiques T-replets traités par PTCY afin d'évaluer la dimension prédictive de KIR pour améliorer la sélection des donneurs de CSH.

L'allotype KIR2DL1\*003 est associé au motif centromérique (cen) AA et confère la plus grande fréquence de cellules NK, le plus haut niveau d'expression et la plus forte interaction KIR/HLA-C par rapport aux allotypes KIR2DL1\*002 et KIR2DL1\*004 respectivement associés aux motifs cenAB et BB. Les allotypes KIR2DL2\*001 et \*003 affectent négativement la fréquence des cellules NK KIR2DL1+ et KIR2DL3+. Dans l'ensemble, nos données suggèrent que les individus cenAA présentent des allèles KIR2DL plus efficaces (L1\*003 et L3\*001) pour monter une fréquence constante de cellules NK KIR2DL+ et pour conférer une réactivité efficace aux cellules NK. La transposition de nos observations in vitro dans un contexte de HSCT haplo-identique T-replet nous a conduit à observer que les greffes de CSH cenAA limitent significativement l'incidence de rechute chez les patients atteints de maladies myéloïdes après HSCT haplo-identique T-replet. Les cellules NK étant cruciales dans la reconstitution de la HSCT, on pourrait s'attendre à ce que la prise en compte du polymorphisme allélique de KIR2DL1/2/3 permette d'affiner les scores utilisés pour la sélection des donneurs de CSH.







**Figure 22 : Impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur le répertoire et la fonction des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>**

Dans l'ensemble, nos données suggèrent que les individus avec le motif KIR CenAA présentent des allèles KIR2DL plus efficaces associés à une fréquence plus élevée de cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> conférant un meilleur potentiel de dégranulation des cellules NK. La transposition de nos données obtenues *in vitro* dans le contexte des GSCH haplo-identiques non-T déplétées nous a conduit à observer que les donneurs de CSH avec un motif KIR CenAA limitent significativement l'incidence de rechute chez les patients atteints de maladies myéloïdes après GSCH haplo-identiques non-T déplétées. La taille des cellules est proportionnelle à la fréquence des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup> et la quantité des granules cytotoxiques est proportionnelle au potentiel de dégranulation de chaque sous-population NK correspondante.

Article

# Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Léa Dubreuil<sup>1,2,3</sup>, Bercein Maniangou<sup>1,2,3</sup> , Patrice Chevallier<sup>2,3,4</sup>, Agnès Quémener<sup>2,3</sup> , Nolwenn Legrand<sup>1,2,3</sup>, Marie C. Béné<sup>2,3,4,5</sup> , Catherine Willem<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle David<sup>1,2,3</sup>, Mehdi Alizadeh<sup>6</sup>, Dhon Roméo Makanga<sup>1,2,3</sup>, Anne Cesbron<sup>1,7</sup>, Ketevan Gendzekhadze<sup>8</sup>, Katia Gagne<sup>1,2,3,7,\*,†</sup> and Christelle Retière<sup>1,2,3,\*,†</sup> 

- <sup>1</sup> Etablissement Français du Sang, F-44011 Nantes, France; lea.dubreuil@efs.sante.fr (L.D.); bercein.maniangouzonzeke@chu-nantes.fr (B.M.); nolwenn.legrand@efs.sante.fr (N.L.); catherine.willem@efs.sante.fr (C.W.); gaelle.david@efs.sante.fr (G.D.); dhon.makanga@efs.sante.fr (D.R.M.); anne.cesbron@efs.sante.fr (A.C.)
- <sup>2</sup> INSERM U1232 CNRS, CRCINA, Université de Nantes, F-44000 Nantes, France; patrice.chevallier@chu-nantes.fr (P.C.); Agnes.Quemener@univ-nantes.fr (A.Q.); mariechristine.bene@chu-nantes.fr (M.C.B.)
- <sup>3</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, F-44000 Nantes, France
- <sup>4</sup> Hematology Clinic, CHU, F-44000 Nantes, France
- <sup>5</sup> Hematology Biology, Nantes University Hospital, F-44000 Nantes, France
- <sup>6</sup> Etablissement Français du Sang, F-35016 Rennes, France; mehdi.alizadeh@efs.sante.fr
- <sup>7</sup> LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France
- <sup>8</sup> Department of Hematology and HCT, HLA laboratory, City of Hope Medical Center, Duarte, CA 91010, USA; kgendzek@coh.org
- \* Correspondence: katia.gagne@efs.sante.fr (K.G.); christelle.retiere@efs.sante.fr (C.R.)
- † The last two authors contributed equally to this work.

Received: 22 October 2020; Accepted: 27 November 2020; Published: 1 December 2020



**Simple Summary:** We have recently shown a broad disparity of Natural Killer (NK) cell responses against leukemia, highlighting good and bad responders resting on the Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and HLA genetics. In this study, we deeply investigated KIR2DL NK cell repertoire in combining high-resolution KIR allele typing and multicolor flow cytometry from a cohort of 108 blood donors. Our data suggest that centromeric (cen) AA individuals display more efficient KIR2DL alleles (L1\*003 and L3\*001) to mount a consistent frequency of KIR2DL+ NK cells and to confer an effective NK cell responsiveness. The transposition of our in vitro observations in T-replete haplo-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) context led us to observe that cenAA HSC grafts limit significantly the incidence of relapse in patients with myeloid diseases after T-replete haplo-identical HSCT. As NK cells are crucial in HSCT reconstitution, one could expect that the consideration of KIR2DL1/2/3 allelic polymorphism could help to refine scores used for HSC donor selection.

**Abstract:** We have recently shown a broad disparity of Natural Killer (NK) cell responses against leukemia highlighting good and bad responders resting on the Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) and HLA genetics. In this study, we deeply studied KIR2D allele expression, HLA-C recognition and functional effect on NK cells in 108 blood donors in combining high-resolution KIR allele typing and multicolor flow cytometry. The KIR2DL1\*003 allotype is associated with centromeric (cen) AA motif and confers the highest NK cell frequency, expression level and strength of KIR/HLA-C interactions compared to the KIR2DL1\*002 and KIR2DL1\*004 allotypes respectively

associated with cenAB and BB motifs. KIR2DL2\*001 and \*003 allotypes negatively affect the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells. Altogether, our data suggest that cenAA individuals display more efficient KIR2DL alleles (L1\*003 and L3\*001) to mount a consistent frequency of KIR2DL<sup>+</sup> NK cells and to confer an effective NK cell responsiveness. The transposition of our in vitro observations in the T-replete haplo-identical HSCT context led us to observe that cenAA HSC grafts limit significantly the incidence of relapse in patients with myeloid diseases after T-replete haplo-identical HSCT. As NK cells are crucial in HSCT reconstitution, one could expect that the consideration of KIR2DL1/2/3 allelic polymorphism could help to refine scores used for HSC donor selection.

**Keywords:** KIR; NK cells; haplo-identical HSCT; polymorphism; HLA; leukemia

---

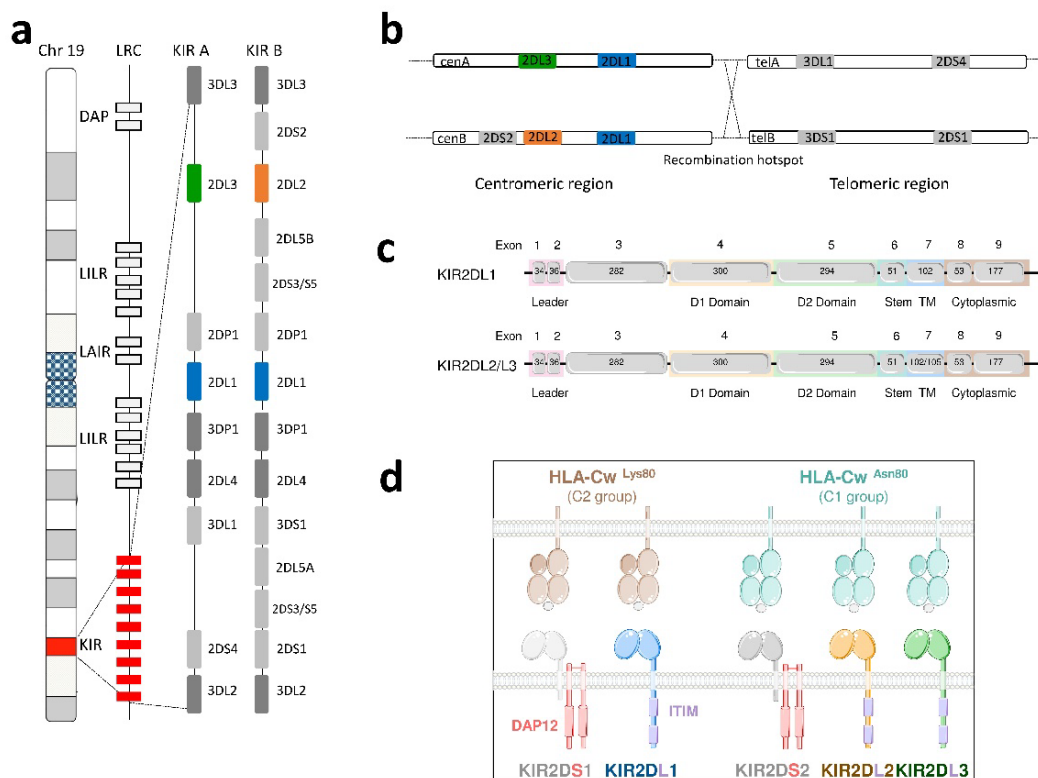
## 1. Introduction

Natural Killer (NK) cells are granular lymphocytes and form part of the innate immune system. They sense the absence of or decreased HLA class I expression on tumoral or virally infected cells and allogenic cells. They are particularly important in Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT), being the first cytotoxic lymphocytes to appear during immune reconstitution before T cell recovery [1], and they are engaged in the beneficial Graft-versus Leukemia (GvL) effect [2,3]. This missing-self recognition by NK cells [4] is mediated through different receptors specific for HLA class I molecules [5]. Among these receptors, Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) play a major role in the functional education of NK cells [6] and the modulation of NK cell functions [7,8]. The absence of inhibitory KIR engagement with its cognate ligand results in triggering KIR<sup>+</sup> NK cell functions.

The structure and the function of the NK cell repertoire depends on the clonal expression of different KIR combinations defined by the number and the nature of KIR genes and alleles, the HLA class I environment and the immunological history, notably cytomegalovirus (CMV) infection [8,9].

In humans, 15 KIR genes, located on the chromosome 19q13.4, have been identified (Figure 1a) [9]. The number and the nature of KIR genes differ according to individuals allowing the discrimination of two defined KIR haplotypes [10]. The A KIR haplotype is defined by a fixed set of nine KIR genes, including KIR2DS4 as the only activating KIR gene. In contrast, B haplotypes are more diverse, with a variable number of KIR genes, and are characterized by the presence of more than one activating KIR gene and the absence of the KIR2DS4 gene (Figure 1a) [10].

The arrangement of KIR genes and the high sequence similarity facilitate gene gain and loss. Thus, all KIR loci are subject to copy number variation (CNV), particularly in B haplotypes [11]. For instance, the KIR2DL1 gene, present on both A and B haplotypes (Figure 1a), is mainly observed in the form of one copy per haplotype and less than 20% of KIR haplotypes do not display the KIR2DL1 gene [11]. Based on the combination of A and B KIR haplotypes, 660 KIR genotypes were described worldwide (<http://www.allelefreqencies.net/>). Depending on KIR gene content, centromeric and telomeric KIR motifs were also defined (Figure 1b) [12]. KIR gene length and exon/intron organization vary as illustrated for KIR2DL1/2/3 genes (Figure 1c). Inhibitory KIRs display immuno-receptor tyrosine-based motifs (ITIM) in their cytoplasmic tails (Figure 1d). In contrast, activating KIRs are coupled to adaptor DAP12 protein that contains immunoreceptor tyrosine-based activating motifs (ITAMs). In particular, KIR2DL1 recognizes exclusively HLA-Cw molecules belonging to the group C2 epitope (Lys80) [13] whereas KIR2DL2/3 recognizes HLA-Cw molecules belonging to the C1 group epitope (Asn80) and some HLA-Cw molecules of C2 group (Figure 1d) [14,15].



**Figure 1.** Localization, organization of Killer cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) genes and HLA-C specificity of KIR2DL interactions. KIR genes are located on chromosome 19 in the Leucocyte Region Complex (LRC), which also contains genes encoding DAP adaptor protein and other Natural Killer (NK) cell receptors. The A KIR haplotype is defined by a fixed set of nine genes with only 2DS4 as activating genes, whereas B haplotypes are more diverse and characterized by the presence of more than one activating KIR gene and the absence of 2DS4 (a). Different KIR centromeric (cen) and telomeric (tel) KIR motifs are defined depending on the presence or absence of KIR2DL3/L2/S2 and KIR2DS1/S4/3DL1/S1 genes respectively (b). KIR2DL1/L2/L3 genes have eight exons, as well as a pseudoexon 3 coding for two Ig-like domains and a long intracytoplasmic tail (c). KIR2DL1/L2/L3/S1/S2 receptors interact with specific HLA-C molecules divided into C1 or C2 group (d).

KIR genes exhibit an allelic diversity, with 1110 KIR alleles currently referenced (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>). Of note, this allelic polymorphism is more important for the inhibitory rather than for the activating KIR genes. Although some studies have underlined the effect of KIR allelic polymorphism on the phenotype and the function of NK cells as reported for KIR3DL1 [16,17] and for KIR2DL1 [18–20], the absence of high-resolution methods limited investigations on KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire. Clinical consequences of KIR allelic polymorphism on KIR diseases were identified for a few KIR genes such as KIR2DL1 for preeclampsia [21], and KIR2DL1 [22], KIR3DL1 [23] for HSCT outcome. Besides KIR allelic polymorphism, HSC donors with a B KIR gene motif are preferentially chosen to decrease relapse incidence after unrelated HLA identical HSCT [12,24], supporting a role of activating KIR or KIR2DL2. This protection against relapse in patients with acute myeloid leukemia (AML) is observed after myeloablative (MAC) and reduced intensity conditioning (RIC) regimens [12,24]. In the context of T-replete HLA haplo-identical HSCT using post-transplant cyclophosphamide (haplo-PTCY), some studies have reported the impact of donor KIR genotypes and/or KIR/HLA mismatches on patient outcome after haplo-PTCY [25–30]. In particular, we have shown that KIR2DL/HLA incompatibilities are beneficial to improve patient's outcome after haplo-PTCY [30]. In haplo-PTCY for which multiple options of HSC donors are feasible, the question arises of whether genetic markers as KIR help to select the best one to improve efficient immune reconstitution commingled with beneficial GvL effect. To address this question, we deeply investigated the influence of KIR2DL1/2/3 allelic polymorphism on

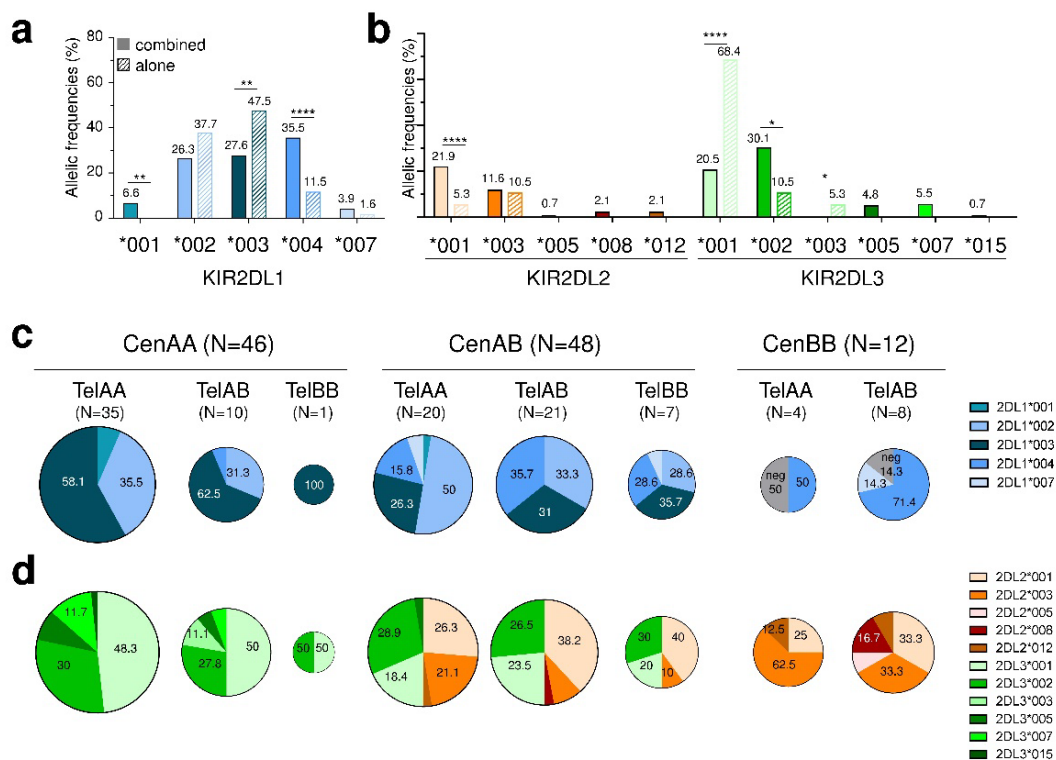


the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire from 108 healthy individuals in combining high-resolution KIR allele typing by Next-Generation Sequencing (NGS) [31], high-resolution flow cytometry using KIR specific mAbs [32] and in silico KIR/HLA-C modelling. In parallel, our in vitro results were compared to ex vivo observations in 81 T-replete haplo-identical HSCT patients treated with PTCY in order to evaluate the predictive dimension of KIR to improve HSC donor selection.

## 2. Results

### 2.1. Predominant KIR2DL1\*003 and KIR2DL3\*001 Alleles Are Frequently Identified as Unique Allele and Are Associated with Centromeric AA Motifs

In this study, we focused our investigations on KIR2DL1/2/3 allelic diversity as their gene frequencies are close to 100%, as well as because they are the most engaged inhibitory receptors with HLA-C ligands. On 97 KIR2DL1<sup>+</sup> genotyped healthy individuals, 5 KIR2DL1 alleles were identified. The most frequent KIR2DL1 allele was KIR2DL1\*003 (39.7%), followed by \*002 (33.3%), \*004 (20.7%), \*001 (2.5%) and \*007 (2.5%). Interestingly, KIR2DL1\*001 and \*004 were more frequently associated with another KIR2DL1 allele than found alone (Figure 2a). In contrast, KIR2DL1\*003 was predominantly found as unique (Figure 2a).



**Figure 2.** Predominant KIR2DL1\*003 and KIR2DL3\*003 alleles are frequently identified as unique allele and are associated with specific centromeric motifs. (a) KIR2DL1 allelic frequencies (%) established in blood donors either found alone (clear bars,  $n = 59$ ) or combined with another KIR2DL1 allele (filled bars,  $n = 38$ ). (b) KIR2DL2/3 allelic frequencies (%) established in blood donors either found alone (clear bars,  $n = 19$ ) or combined with another KIR2DL2/3 allele (filled bars,  $n = 73$ ). (c) KIR2DL1 and (d) KIR2DL2/3 allele frequencies (%) established in blood donors classified according to their centromeric (cenAA, AB, BB) and telomeric (telAA, AB, BB) motifs. The size of each pie chart varies according to sample size. Only KIR2DL1/2/3 allele frequencies higher than 10% are indicated on pie charts. KIR2DL1/2/3 alleles were assigned by Next-Generation-Sequencing technology using Profiler software as described in the Materials and Methods section. Specific colors were used to discriminate each KIR2DL1/2/3 allele. Statistical differences were analyzed using  $\chi^2$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .



Besides KIR2DL1, the allelic polymorphism of both KIR2DL2 and 2DL3, being alleles of the same gene, was investigated from the same individuals. On 92 KIR2DL2/3<sup>+</sup> genotyped individuals, 11 KIR2DL2/3 alleles were identified, L3\*001 (30.4%), L3\*002 (26.1%), L2\*001 (18.5%) and L2\*003 (11.4%) being the most frequent ones. KIR2DL2\*001 and L3\*002 were overrepresented combined with another KIR2DL2/3 allele rather than alone (Figure 2b). In contrast, KIR2DL3\*001, and to a lesser extent L3\*003, were predominant as unique KIR2DL3 allele (Figure 2b). In contrast to KIR2DL1/2/3 genes, activating KIR2DS1 and KIR2DS2 genes whose frequencies were 37.0% and 55.6%, respectively, showed only one predominant allele (S1\*002, 93.6% and S2\*001, 97%).

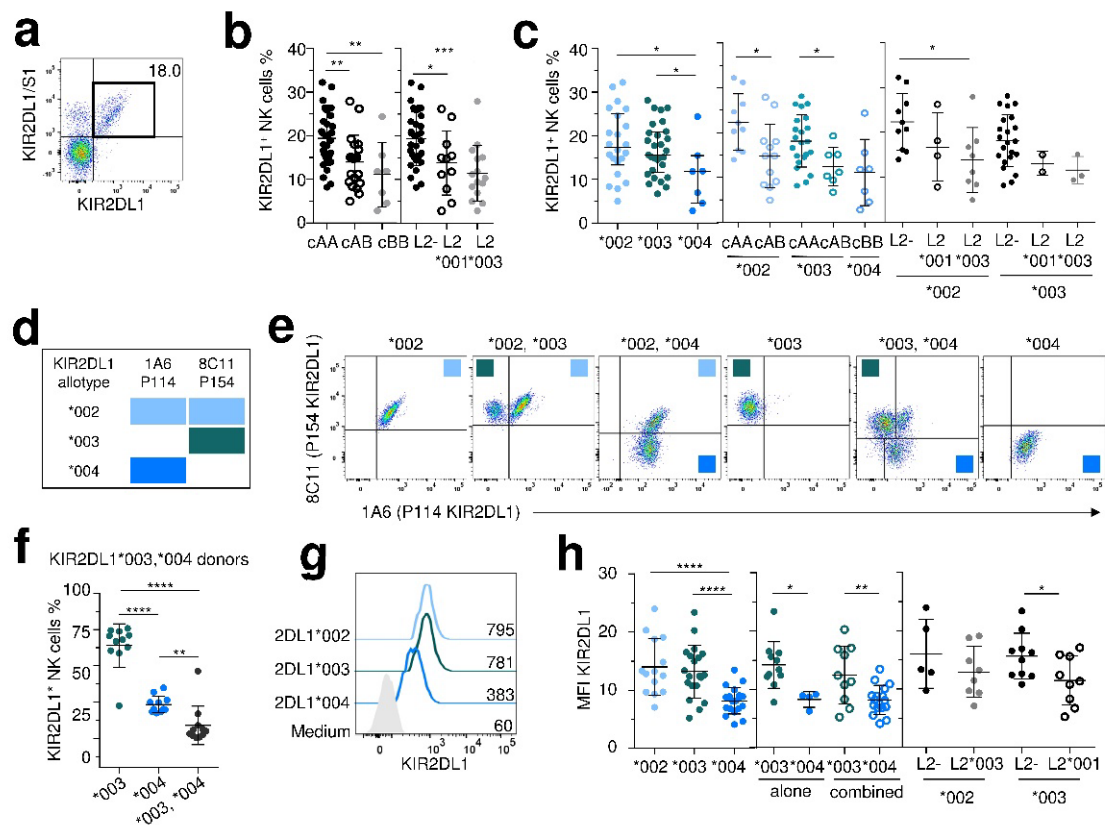
Since KIR2DL1/2/3/S1/S2 genes belong to different KIR haplotypes with distinctive centromeric (cen) and telomeric (tel) motifs, we further evaluated KIR2D allele frequencies in regards to cen and tel motifs. KIR2DL1\*003 was predominant in cenAA individuals with increasing incidence when associated with telB+ (AB/BB) compared to telAA motifs (Figure 2c). In contrast, KIR2DL1\*002 was predominant in cenAB individuals, with decreasing frequency with telB+ compared to telAA motifs (Figure 2c). KIR2DL1\*004 or the absence of KIR2DL1 characterized cenBB individuals (Figure 2c). KIR2DL3\*001 was predominant in cenAA individuals (Figure 2d). KIR2DL3\*001, L3\*002, L2\*001 and L2\*003 were similarly represented in cenAB individuals, with increasing incidence of L2\*001 and decreased incidence of L2\*003 in telB+ compared to telAA motifs (Figure 2d). The predominance of KIR2DL2\*003 characterizes cenBB donors (Figure 2d).

KIR2DL1/2/3/S1/S2 allele typing led us to determine 59 allele combinations, some of them being found in several individuals ( $n = 18$ ) and others unique ( $n = 41$ ) (Table S1). The most frequent KIR2D allele combination found in 9 cenAA individuals displayed a linkage disequilibrium (LD) between L1\*003 and L3\*001, preferentially in a C1<sup>+</sup> environment (Table S1). The second one found in 6 cenAB individuals also showed this LD and more specifically the L1\*004-L2\*001 combination, in a preferential C2<sup>+</sup> environment (Table S1). The L1\*002-L3\*002 combination was observed in both cenAA and AB individuals with different KIR2D associations (Table S1).

## 2.2. Predominant KIR2DL2 Alleles Associated with Centromeric B+ Motifs Negatively Affect Both the Frequency and the Expression Level of KIR2DL1 Allotypes

Due to the limited KIR2DS allelic polymorphism, we furthered our investigations on inhibitory KIR2DL1/2/3 expression. KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequency was determined using the combination of KIR2DL1 and 2DL1/S1 specific mAbs, as illustrated in Figure 3a for one representative KIR2DL1/S1<sup>+</sup> individual. KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequency was lower in cenAB/BB (cenB+) compared to cenAA individuals (Figure 3b). As the KIR2DL2 gene may supersede KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell functions [33], we evaluated its influence. Both L2\*001 and L2\*003 alleles negatively affected KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequency (Figure 2b). The frequency of KIR2DL1\*004<sup>+</sup> NK cells was lower compared to L1\*002<sup>+</sup> NK cells or L1\*003<sup>+</sup> NK cells (Figure 3c). A decrease of both KIR2DL1\*002<sup>+</sup> and L1\*003<sup>+</sup> NK cell frequencies was observed in cenB<sup>+</sup> vs. cenAA individuals due to the presence of KIR2DL2 (Figure 3c). In particular, the frequency of KIR2DL1\*002<sup>+</sup> NK cells was lower in L2\*003<sup>+</sup> compared to L2<sup>-</sup> individuals (Figure 3c).

To determine the KIR2DL1 expression level for main KIR2DL1 allotypes, we used a combination of 8C11 and 1A6 mAbs [32]. The 8C11 recognizes KIR2DL1 allotypes with P154 amino acid (L1\*002 and L1\*003) and 1A6 recognizes KIR2DL1 allotypes with P114 amino acid (L1\*002 and L1\*004) (Figure 3d). Thus, in gating on KIR2DL1<sup>+</sup>/2/3/S1/2<sup>-</sup> NK cells, we were able to further discriminate NK cell subsets expressing L1\*002 (8C11<sup>+</sup> 1A6<sup>+</sup>), L1\*003 (8C11<sup>+</sup> 1A6<sup>-</sup>) or L1\*004 (8C11<sup>-</sup> 1A6<sup>+</sup>) allotype (Figure 3e). Of note, we did not assess the expression of the KIR2DL1\*002 allotype for L1\*002, \*003<sup>+</sup> and L1\*002, \*004<sup>+</sup> individuals as potential co-expression of both allotypes can be observed. From 11 KIR2DL1\*003, \*004 donors, we confirmed that the co-expression of both KIR2DL1 allotypes is limited and that KIR2DL1\*003<sup>+</sup> NK cells are the most representative subset (Figure 3f). The MFI of KIR2DL1\*004 was lower compared to those of L1\*002 and L1\*003 allotypes (Figure 3g,h). Interestingly, KIR2DL2\*001 negatively affected on the level expression of the KIR2DL1\*003 allotype (Figure 3h).

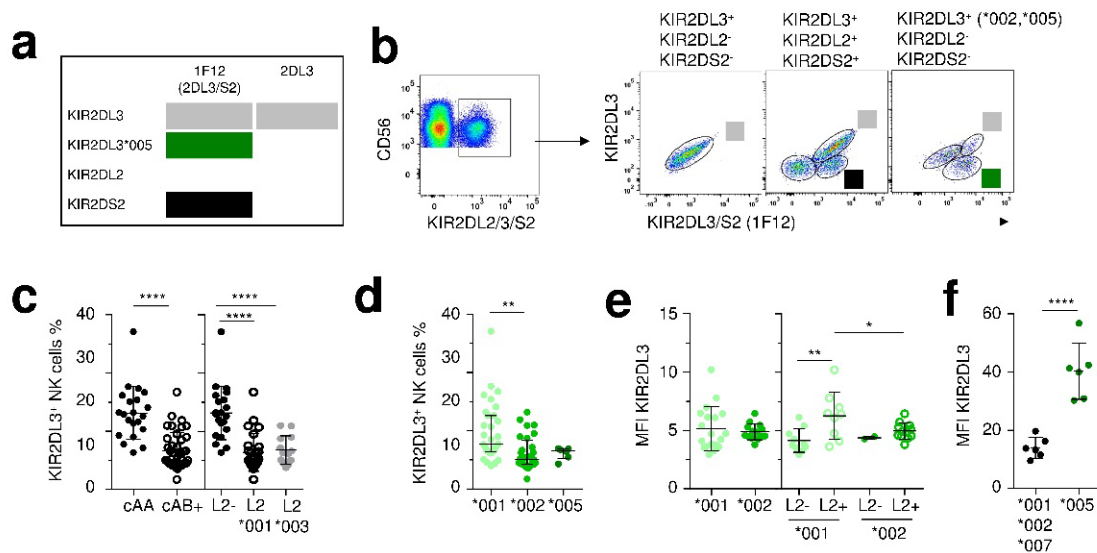


**Figure 3.** Predominant KIR2DL2 alleles associated with centromeric B+ motifs negatively affect both the frequency and the expression level of KIR2DL1 allotypes. (a) Density plot illustrating the cell targeting strategy used to target KIR2DL1 allotypes on NK (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) cells by combining anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and a specific anti-KIR2DL1 mAbs. (b) Scatter plots showing the frequencies of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells in individuals with centromeric (c) cAA (*n* = 32), cAB (*n* = 19), cBB (*n* = 7) motifs, and in 2DL2<sup>-</sup> (*n* = 32), L2\*001<sup>+</sup> (*n* = 11) and L2\*003<sup>+</sup> (*n* = 15). (c) Scatter plots showing the frequencies of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells in individuals with only one 2DL2 allele (L1\*002<sup>+</sup>, *n* = 22, L1\*003<sup>+</sup>, *n* = 29 and L1\*004<sup>+</sup>, *n* = 7), in cAA (L1\*002, *n* = 10, L1\*003, *n* = 22), cAB<sup>+</sup> (L1\*002, *n* = 12, L1\*003, *n* = 7) and cBB (L1\*004, *n* = 7), in L1\*002<sup>+</sup>/L2<sup>-</sup> (*n* = 10), L1\*002/L2\*001<sup>+</sup> (*n* = 4), L1\*002/L2\*003<sup>+</sup> (*n* = 8), L1\*003<sup>+</sup>/L2<sup>-</sup> (*n* = 22), L1\*003/L2\*001<sup>+</sup> (*n* = 2) and L1\*003/L2\*003<sup>+</sup> (*n* = 3) individuals. (d) Site recognition of specific anti-KIR2DL1 1A6 and 8C11 mAbs and corresponding binding to main KIR2DL1 allotypes. (e) Density plots illustrating the overall strategy used to target KIR2DL1 allotypes on NK cells in 6 representative individuals using 1A6 and 8C11 mAbs combination. (e) Squares with the blue-scale gradient used in (d) lead to identify NK cell subset expressing each KIR2DL1 allotype. (f) Scatter plots showing the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells in 11 L1\*003, L1\*004 individuals. (g) MFI of KIR2DL1 on NK cells depending on KIR2DL1 allotype. (h) Relative MFI of KIR2DL1 represents the ratio of the MFI of KIR2DL1 on the MFI of the isotype control for each KIR2DL1 allotype (L1\*002<sup>+</sup>, *n* = 14, L1\*003<sup>+</sup>, *n* = 20 and L1\*004<sup>+</sup>, *n* = 20), as unique KIR2DL1 allele (alone, L1\*003, *n* = 11, L1\*004, *n* = 4) or combined with another KIR2DL1 allele (combined, L1\*003, *n* = 10, L1\*004, *n* = 16), and in L2<sup>-</sup> (L1\*002<sup>+</sup>, *n* = 5, L1\*003, *n* = 10), L2\*003<sup>+</sup> (*n* = 8) or L2\*001<sup>+</sup> (*n* = 9) individuals. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\* *p* < 0.001, \*\*\*\* *p* < 0.0001.

**2.3. The KIR2DL2 Gene Specific of Centromeric B+ Motifs Positively Affects the Expression Level of the Dominant KIR2DL3\*001 Allotype**

To investigate the expression of KIR2DL3 allotypes, we used a combination of mAbs leading to firstly discriminate 2DL2 and 2DL3 and secondly to identify the KIR2DL3\*005 allotype (Figure 4a). Thus, in gating on KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells, different subsets are identified following KIR gene content (Figure 4b). In KIR2DL3<sup>+</sup>/2<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup> individuals, only KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells are observed. In KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup>

individuals, 3 populations are observed:  $L3^+/L2^{+/-}/S2^{+/-}$ ,  $L3^-/L2^+/S2^-$  and  $L3^-/L2^{+/-}/S2^+$ . Finally, as the KIR2DL3\*005 allotype was not recognized by the anti-KIR2DL3 specific mAb, it is possible to discriminate this allotype (Figure 4b). CenB<sup>+</sup> motifs linked to the presence of L2\*001 or L2\*003 alleles constrained KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequency (Figure 4c). The frequency of KIR2DL3\*001<sup>+</sup> NK cells was higher compared to KIR2DL3\*002<sup>+</sup> NK cells (Figure 4d), but their expression levels were similar (Figure 4e). However, the expression level of the KIR2DL3\*001 allotype was higher in the presence of KIR2DL2 (Figure 4e). The expression level of KIR2DL3\*005 was higher compared to L3\*001, \*002 and \*007 allotypes (Figure 4f).

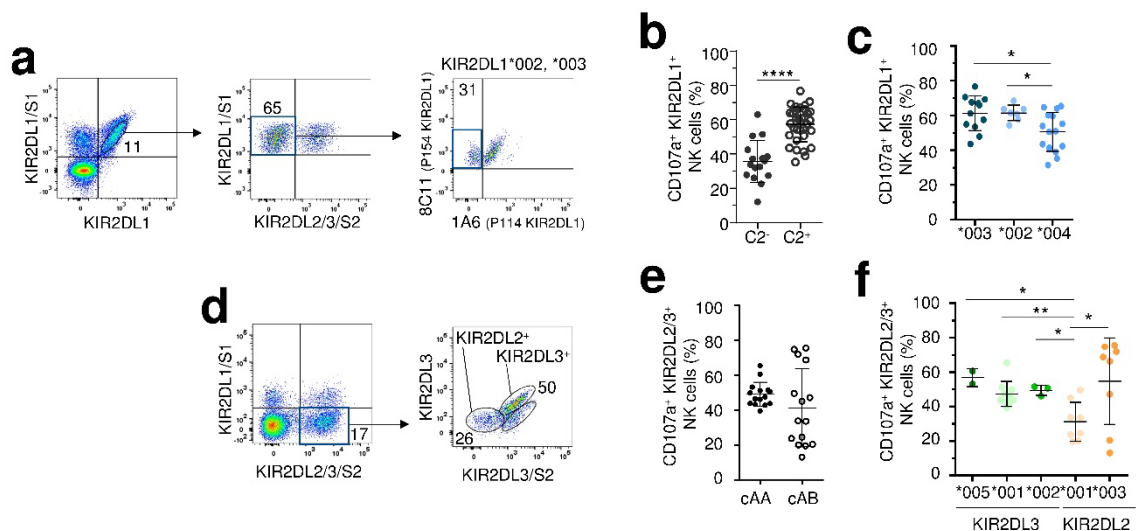


**Figure 4.** The KIR2DL2 gene specific of centromeric B<sup>+</sup> motifs positively affects the expression level of the dominant KIR2DL3\*001 allotype. (a) KIR2DL2/3/S2 recognition of anti-KIR2DL3 mAbs and an anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAbs. (b) Density plots illustrating the overall strategy used to target KIR2DL3 allotypes on NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) cells in three representative individuals ( $L3^+/L2^+/S2^+$ ,  $L3^+/L2^-/S2^-$  and heterozygous  $L3^*005$ ,  $L3^*002/L2^-/S2^-$ ) by combining anti-KIR2DL2/3/S2 (GL183), anti-KIR2DL3 and anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAbs. KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells are indicated by a light grey square, KIR2DS2<sup>+</sup> NK cells are indicated by a black square and KIR2DL3\*005<sup>+</sup> NK cells are indicated by a dark green square. (c) Scatter plots showing the frequencies of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells in cenAA (filled circles,  $n = 21$ ) vs. cenAB ( $n = 41$ ) individuals and in KIR2DL2<sup>-</sup> (filled black circles,  $n = 21$ ) vs. L2\*001<sup>+</sup> (clear circles,  $n = 26$ ) or L2\*003<sup>+</sup> (filled grey circle,  $n = 13$ ) individuals. (d) Frequencies of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells following KIR2DL3 allotypes ( $L3^*001$ ,  $n = 31$ ,  $L3^*002$ ,  $n = 28$ , and  $L3^*005$ ,  $n = 6$ ). (e) Relative MFI of KIR2DL3 represents the ratio of the MFI of KIR2DL3 on the MFI of the isotype control for each KIR2DL3 allotype ( $L3^*001^+$ ,  $n = 19$ , and  $L3^*002^+$ ,  $n = 14$ ), in either L2<sup>-</sup> (filled circle,  $L3^*001$ ,  $n = 10$ ,  $L3^*002$ ,  $n = 2$ ), or L2<sup>+</sup> (clear circle,  $L3^*001$ ,  $n = 9$ ,  $L3^*002$ ,  $n = 12$ ) individuals. (f) Relative MFI of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells for 6 individuals expressing KIR2DL3\*005 allotype in combination with  $L3^*001$ , \*002 or \*007 allotypes. The MFI was assessed for KIR2DL3\*005 allotype or other KIR2DL3 allotype ( $L3^*001$ , \*002 or \*007) with anti-KIR2DL3/S2 (1F12) mAb. Statistical differences between different groups were analyzed using unpaired *t*-tests or one-way ANOVA followed by turkey's multiple comparison test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

#### 2.4. CenAA KIR2DL Allotypes Are Associated with an Efficient NK Cell Responsiveness

The degranulation of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells was assessed ex vivo against the standard HLA class I negative 721.221 B-EBV cell line (221). For that purpose, the KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) cell subpopulation was first gated then KIR2DL2/3/S2 expression was excluded (Figure 5a). Using the combination of both KIR2DL1 specific 8C11 and 1A6 mAbs [32], NK cell subsets expressing 2DL1\*002 (8C11<sup>+</sup> 1A6<sup>+</sup>), L1\*003 (8C11<sup>+</sup> 1A6<sup>-</sup>) and L1\*004 (8C11<sup>-</sup> 1A6<sup>+</sup>) allotypes were discriminated (Figure 5a). As expected for licensed NK cells, the degranulation of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells was higher for C2<sup>+</sup> than

for C2<sup>-</sup> individuals (Figure 5b). Both KIR2DL1\*002<sup>+</sup> NK cells and L1\*003<sup>+</sup> NK cells have a stronger degranulation compared to L1\*004<sup>+</sup> NK cells in C2<sup>+</sup> donors (Figure 5c).



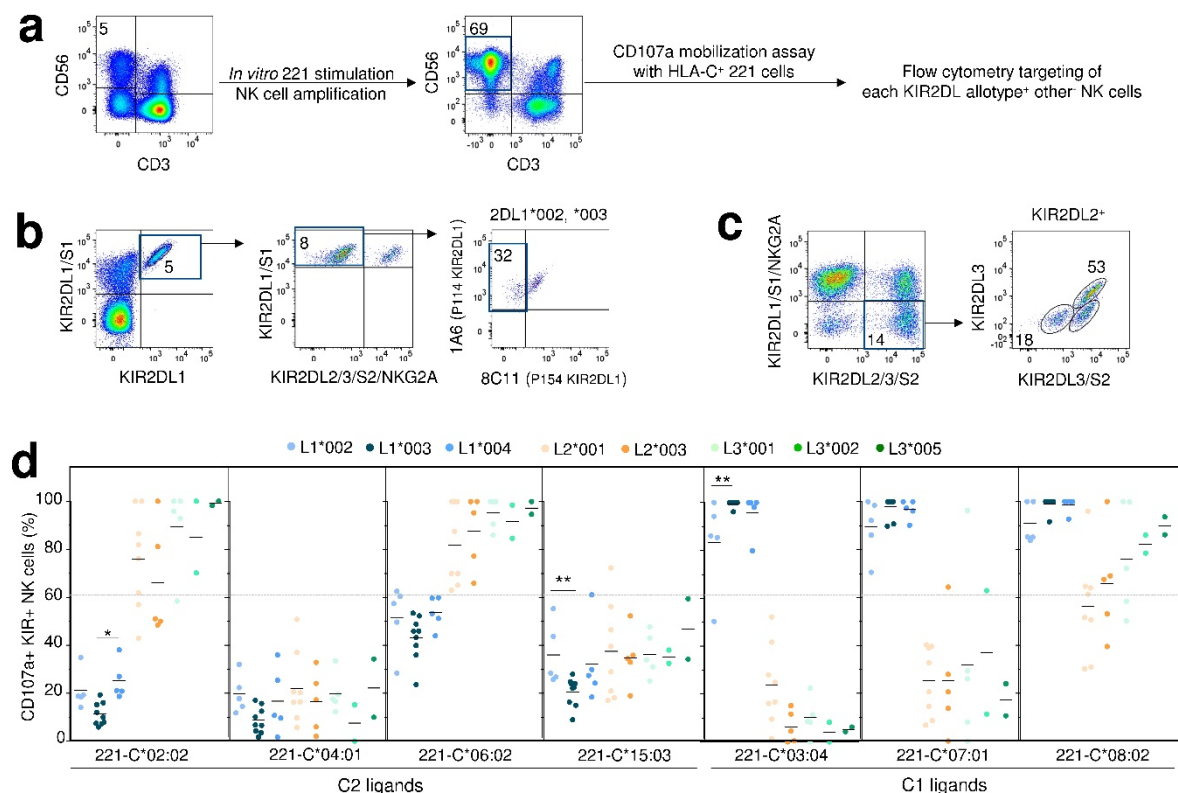
**Figure 5.** CenAA KIR2DL allotypes are associated with an efficient NK cell responsiveness. (a) Density plots illustrating the targeting strategy of KIR2DL1<sup>+</sup>/2/3/S1/S2<sup>-</sup> NK cells. A first combination of anti-KIR2DL1 and anti-KIR2DL1/S1 (EB6) leads to target KIR2DL1<sup>+</sup> KIR2DS1<sup>-</sup> NK cells. A second combination leads to eliminate KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells using the anti-KIR2DL2/3/S2 (GL183) mAb. Finally, each KIR2DL1 allotype was targeted using the combination of anti-KIR2DL1/2/3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL2/3/S1/S2 (1A6) mAbs. Scatter plots showing ex vivo potential of KIR2DL1<sup>+</sup>/2/3/S1/S2<sup>-</sup> NK cell degranulation (CD107a<sup>+</sup>) against the HLA class I negative 721.221 B-EBV cell line (E/T ratio, 10:1) in (b) C2<sup>-</sup> (filled circles, *n* = 16) vs. C2<sup>+</sup> (clear circles, *n* = 33) and (c) in C2<sup>+</sup> individuals depending on allotypes (L1\*003, *n* = 12, L1\*002, *n* = 7 and L1\*004, *n* = 15). (d) Density plots illustrating the targeting strategy of KIR2DL2/3<sup>+</sup> KIR2DL1/S1/2<sup>-</sup> NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) cells. A first combination of KIR2DL2/3/S2 (GL183) and KIR2DL1/S1 (EB6) specific mAbs leads to target KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> KIR2DL1/S1<sup>-</sup> NK cells. A second combination using anti-KIR2DL3 and anti-KIR2DL3/S2 (1F12) leads to target KIR2DL2<sup>+</sup> KIR2DL3<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell subsets. Scatter plots showing ex vivo potential of KIR2DL2/3<sup>+</sup> KIR2DL1/S1/2<sup>-</sup> NK cell degranulation (CD107a<sup>+</sup>) against the HLA class I negative 721.221 B-EBV cell line (E/T ratio, 10:1) in (e) C1<sup>+</sup> individuals with cenAA (filled black circles, *n* = 15) or cenAB (clear circles, *n* = 15) motifs and (f) depending on allotypes (L2\*001, *n* = 8, L2\*003, *n* = 8, L3\*001, *n* = 10, L3\*002, *n* = 3 and L3\*005, *n* = 2). Statistical differences were analyzed using unpaired *t*-test or one-way ANOVA followed by Turkey's multiple comparison test. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01, \*\*\*\* *p* ≤ 0.0001.

In parallel, we evaluated the ex vivo degranulation of KIR2DL2<sup>+</sup> and L3<sup>+</sup> NK cells assessed against the 221-cell line. KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup>/L1/S1<sup>-</sup> NK cell subset was targeted using the previous combination of anti-KIR2DL3/S2 [32] and anti-KIR2DL3 mAbs to isolate the KIR2DL2<sup>+</sup> NK cell subset from individuals harboring a unique KIR2DL2 allotype or KIR2DL2/3 allele combination (Figure 5d). We did not observe a difference of educated KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation between cenAA and AB individuals being respectively L3<sup>+</sup>/L2<sup>-</sup> and L3<sup>+</sup>/L2<sup>+</sup> (Figure 5e). However, while KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation was homogeneous in cenAA individuals, the quartiles of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cells were very outlying in cenAB individuals suggesting that other parameters may modulate this response. KIR2DL2\*001<sup>+</sup> NK cells observed mainly in cenAB individuals showed the lowest degranulation potential compared to L3\*001<sup>+</sup>, L3\*002<sup>+</sup> and L3\*005<sup>+</sup> NK cells in C1<sup>+</sup> individuals (Figure 5f). No difference can be highlighted between KIR2DL3 allotypes due to the limited size number of L3\*005 and L3\*002 individuals. Of note, KIR2DL2\*003<sup>+</sup> NK cell degranulation frequencies associated with cenBB motifs were higher even though disparate.



2.5. Broad Disparity of HLA-C Recognition between Studied KIR2DL Allotypes

KIR and HLA class I allelic polymorphism may directly affect molecular interactions between KIR and their corresponding ligands modulating the inhibition of NK cell degranulation. To test this hypothesis, we further investigated whether KIR2DL1/2/3 and/or HLA-C allele specificities modulate the inhibition of KIR2DL<sup>+</sup> NK cell degranulation. Peripheral blood mononuclear cells were stimulated to amplify the NK cell compartment in vitro (Figure 6a). After 2 weeks culture, NK cell degranulation was evaluated against a panel of HLA-C transfected 221 cell lines. KIR2DL1<sup>+2-3</sup>/S1<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>/NKG2A<sup>-</sup> (L1<sup>+</sup> others<sup>-</sup>) were targeted and the 1A6/8C11 mAbs combination led us to discriminate different NK cell subsets expressing L1\*002, \*003 or \*004 allotype in C2<sup>+</sup> individuals (Figure 6b). In parallel, KIR2DL2/3<sup>+1</sup>/S1<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>/NKG2A<sup>-</sup> (L3<sup>+</sup> others<sup>-</sup>) NK cell subsets were targeted and the KIR2DL3/S2 (1F12)/2DL3 mAbs combination led us to discriminate L3<sup>+</sup> and L2<sup>+</sup> NK cell subsets (Figure 6c).



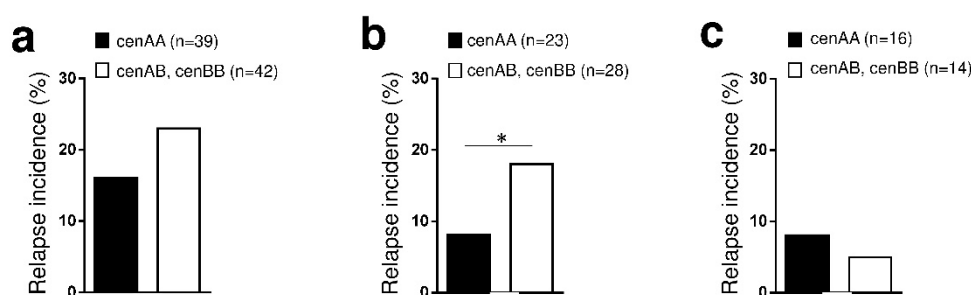
**Figure 6.** Broad disparity of HLA-C recognition between studied KIR2DL allotypes. (a) Strategy to analyze the degranulation potential of pre-stimulated KIR2D<sup>+</sup> NK cells, against a panel of HLA-Cw transfected 721.221 cell lines. Density plots illustrating the amplification of NK cells (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) after 221 stimulation. The KIR2DL<sup>+</sup> NK cell degranulation was assessed against 221 target cell (negative control) and different HLA-Cw transfected 221 target cells. (b) Density plots illustrating the strategy to target KIR2DL1<sup>+2-3</sup>/S1<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>/NKG2A<sup>-</sup> (KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup>) NK cells and focus on each KIR2DL1 allotype using the combination of anti-KIR2DL1/2/3/S2 (8C11) and anti-KIR2DL2/3/S1/S2 (1A6) mAbs. (c) Density plots illustrating the strategy to target KIR2DL2<sup>+</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells from KIR2DL2/3<sup>+1</sup>/L1<sup>-</sup>/S1<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>/NKG2A<sup>-</sup> (KIR2DL3<sup>+</sup> others<sup>-</sup>) using the combination of anti-KIR2DL3/S2 (1F12) and anti-KIR2DL3 mAbs. (d) Scatter plots showing the degranulation potential (CD107a<sup>+</sup>) of KIR2DL1+ other<sup>-</sup> (blue circles) KIR2DL2<sup>+</sup> other<sup>-</sup> (orange circles) and KIR2DL3+ other<sup>-</sup> (green circles) for each allotype (L1\*002 n = 5, L1\*003 n = 9, L1\*004 n = 5, L2\*001 n = 8, L2\*003 n = 5, L3\*001 n = 5, L3\*002 n = 2 and L3\*005 n = 2). The mean ± SD is indicated. Statistical differences were analyzed using unpaired *t*-test or one-way ANOVA followed by Turkey’s multiple comparison test. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01.

We assessed the inhibition of KIR2DL<sup>+</sup> NK cell degranulation against a panel of 3 C1 and four C2 transfected 221 cell lines focusing on main KIR2DL1/2/3 allotypes. The C2 specificity of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells was confirmed with nonetheless a hierarchy of recognition toward different HLA-C molecules belonging to the C2 group (data not shown [34]). In contrast, 2DL2 and 2DL3 did not exclusively recognize C1 ligands since a strong inhibition of 2DL2<sup>+</sup> and 2DL3<sup>+</sup> NK was observed with the 221-HLA-C\*04:01 cell line, being C2<sup>+</sup> target (data not shown [34]) as we previously reported [15].

The highest inhibition level of NK cell degranulation was observed for the L1\*003 allotype for all C2<sup>+</sup> targets and more specifically against the 221-C\*02:02 between L1\*002<sup>+</sup> and L1\*003<sup>+</sup> NK cells and the 221-C\*15:03 target between L1\*003<sup>+</sup> and L1\*004<sup>+</sup> NK cells (Figure 6d). Using an in-silico modelling of KIR2DL1 allotypes (Appendix A), we observed that the 5 polymorphic residues in the extracellular D1 and D2 domains (Figure S1a) does not generate any major conformational modifications (Figure S1b). Thus, these polymorphic positions cannot explain that the KIR2DL1\*003 allotype exhibits a trend of a higher inhibition level of NK cell degranulation against the 221-HLA-C\*04:01 cell line compared to its counterparts (Figure 6d). Considering KIR2DL2/3 allelic polymorphism, heterogeneous levels of inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation depending on KIR2DL2/3 allotypes was observed mainly against less stringent ligand as HLA-C\*08:02 (C1) and -C\*02:02, -C\*06:02 (C2) showing a better inhibition even not significant of KIR2DL2 than KIR2DL3 allotypes (Figure 6d).

## 2.6. Beneficial Impact of cenAA HSC Donors on Relapse Incidence after T-Replete Haplo-Identical HSCT in Myeloid Diseases

Our previous observations support that cenAA L1\*003 and L3\*001 allotypes are associated with a higher frequency of KIR2DL<sup>+</sup> NK cells and better responsiveness. We further determine the centromeric KIR gene motifs of HSC donors. On 81 included haplo-PTCY patients, 39 cenAA and 42 cenAB.BB (cenB<sup>+</sup>) donors were identified (Table S2). Haplo-PTCY performed from cenAA or cenB<sup>+</sup> donors were identical for the clinical characteristics including diseases, status at treatment, disease risk index and conditioning (Table S2). The relapse incidence between haplo-PTCY performed from cenAA vs. cenB<sup>+</sup> donors did not differ when all patients were included (Figure 7a). However, relapse incidence was decreased with cenAA donors were compared to cenB<sup>+</sup> HSC donors for patients with myeloid diseases (Figure 7b) but not for patients with lymphoid diseases (Figure 7c).



**Figure 7.** Beneficial impact of cenAA HSC donors on relapse incidence after T replete haplo-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) in myeloid diseases. Relapse incidence (%) observed after T-replete haplo-identical HSCT with post-transplant cyclophosphamide depending on donor centromeric KIR motifs (cenAA vs. AB/BB) in (a) all patients ( $n = 81$ ), (b) restricted to patients with myeloid diseases ( $n = 39$ ) and (c) restricted to patients with lymphoid diseases ( $n = 42$ ). CenAA donors are KIR2DL2<sup>-</sup>/S2<sup>-</sup>/L3<sup>+</sup>, cenAB donors are KIR2DL2<sup>+</sup>/S2<sup>+</sup>/L3<sup>+</sup> and cenBB donors are KIR2DL2<sup>+</sup>/S2<sup>+</sup>/L3<sup>-</sup>. Statistical differences were analyzed using unpaired *t*-test. \*  $p < 0.05$ .

To assert that cenAA HSC grafts significantly limit relapse incidence in patients with myeloid malignancies after haplo-PTCY, we performed univariate and multivariate analyses including as variables age, recipient gender, status at treatment, disease risk index (DRI), conditioning and donor HSC cenAA motif. Univariate analysis identified DRI (high/very high vs. intermediate) as the most

significant factor predicting relapse (HR = 4.07 [95%CI 1.87–8.89],  $p = 0.0004$ ). There was a trend for a lesser relapse rate in patients with myeloid diseases grafted with cenAA HSC donors (HR = 0.50 [95%CI 0.23–1.09],  $p = 0.08$ ). Age, gender, status at treatment and conditioning were not significantly associated with relapse (data not shown [34]). Multivariate analysis confirmed that donor HSC cenAA motifs were significantly associated with decreased relapse in contrast to DRI that is associated with increased relapse in patients with myeloid diseases after haplo-PTCY (Table 1). Overall, these results sustain a beneficial effect of cenAA donors on relapse incidence after haplo-PTCY only in myeloid diseases, arguing for a better GvL effect driven by NK cells.

**Table 1.** Multivariate analysis of variables affecting relapse after T-replete haploidentical HSCT using post-transplant cyclophosphamide in patients with myeloid diseases.

Variables	HR [95CI%] <sup>1</sup>	<i>p</i> Values
DRI high/very high vs. intermediate <sup>2</sup>	5.38 [1.99–14.5]	0.0009
Donor HSC CenAA motif (positive vs. negative) <sup>3</sup>	0.42 [0.18–0.99]	0.048

<sup>1</sup> HR, hazard ratio; CI, confidence interval; <sup>2</sup> DRI, Disease risk index; <sup>3</sup> HSC hematopoietic stem cell; CenAA, centromeric KIR AA motif.

### 3. Discussion

We confirmed a limited number of alleles for each KIR2DL receptor with closed frequencies reported in other European cohorts [35] and an association with KIR A (L\*001, \*002 and \*003 alleles) and B (L1\*004) haplotypes [21,36–38]. For the first time, we highlighted the dominance of L1\*003 and L3\*001 alleles in cenAA individuals. Moreover, we showed that L1\*002, L3\*002 and L2\*001 alleles were predominant in cenAB whereas L1\*004 or no 2DL1 and L2\*003 alleles were predominant in cenBB individuals. We refined some LD [39,40], taking into account 2DL1/2/3/S1/S2 allele combinations encountered in both cen and tel motifs, although haplotype family segregation was lacking in our study. Thus, the clustering taking into account only cenA and B motifs is probably not completely accurate.

KIR2DL1/2/3 allotypes confer different phenotypic and functional characteristics to NK cells based on KIR cen motifs. CenAA individuals display mainly the L1\*003 allotype with highest frequency, expression level [19–21,38] and strength KIR/HLA-C interactions compared to the L1\*002 allotype in cenAB and to the L1\*004 allotype in cenBB individuals. In this study, we did not determine the CNV for KIR2DL1. However, although the frequency of NK cells expressing a given KIR correlates with the CNV of that gene [38], the coexpression of multiple copies is infrequent [41]. Thanks to the combination of KIR specific 1A6 and 8C11 mAbs [32], we discriminate for the first time the main KIR2DL1 allotypes. We demonstrated that KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation was higher with the L1\*003 allotype, usually associated with cenAA motifs.

The stronger recognition of C2 ligands by KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells was observed for the KIR2DL1\*003 allotype as previously observed [18]. In contrast to other studies pooling KIR2DL1\*002 and \*003 allotypes with R245 residue [18,20], we were able to discriminate both KIR2DL1 allotypes showing that the L1\*002 allotype (R245) interacts with all the C2<sup>+</sup> targets similar with the L1\*004 allotype (C245). The modelling of the studied KIR2DL1 allotypes associated with the HLA-Cw4 molecule [13] suggests that the difference in functionality between the allotypes is not due to the polymorphic positions located on the domains binding of the HLA-C molecule. However, we cannot exclude an influence of loaded peptides, which are probably different in our in vitro cellular model and in in silico modelling. Although a minimal role of peptide has been deduced from the crystal structure of KIR2DL1/HLA-Cw4 complex [13], studies with synthetic peptide analogs have showed that substitution of Lys8 in the peptide with acid residue results in KIR binding loss [42,43].

The KIR2DL1\*004 allele associated with cenBB motifs confers a lower degranulation potential to NK cells. It negatively affects the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> and 2DL3<sup>+</sup> NK cells and the level expression of L1\*003 and \*002 allotypes. In contrast, it positively affects the level expression of L3\*001 allotype when associated with cenAB motifs. In absence of KIR2DL2 specific mAb, it is difficult to grasp

KIR2DL2<sup>+</sup> NK cell frequency and the expression level of KIR2DL2. We observed that KIR2DL2<sup>+</sup> NK cell degranulation was more heterogeneous than L3<sup>+</sup> NK cells without identifying link with specific genetic parameters. Educated KIR2DL2\*001<sup>+</sup> NK cells harbored the worst degranulation compared to all KIR2DL2/3 allotypes. The L2\*001 allele is often observed in cenAB individuals in combination with L3\*001 or L3\*002 alleles whereas L2\*003 is mainly observed in cenBB donors without KIR2DL3. This observation suggests that KIR2DL3 could negatively regulate the function of the L2\*001 allotype in cenAB individuals.

Heterogeneous levels of inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation was observed mainly against less stringent ligands as HLA-C\*08:02 and -C\*02:02, -C\*06:02 showing a better inhibition even not significant of 2DL2 than L3 allotypes. HLA-C allelic polymorphism could affect the KIR2DL2/3/HLA-C affinity and the functionality of NK cells, both from a conformational and on the level of expression of this ligand [44,45]. The peptide presented by HLA-C molecules could also affect the KIR2DL2/3-ligand affinity [46]. In contrast to KIR2DL1, the peptide modulates the binding of KIR2DL2/3 to the HLA-Cw3 through direct interactions [14,42]. Studies have also shown that KIR2DL2/3 have a higher affinity with the HLA-C\*03:04 allotype loaded with Hepatitis Chronic Virus (HCV)-derived peptides [46]. Altogether, we suggest that cenAA individuals display more efficient KIR2DL alleles (L1\*003 and L3\*001) to mount a consistent frequency of KIR2DL<sup>+</sup> NK cells and to confer an effective spontaneous degranulation of NK cells. Nonetheless, further investigations on a broader cohort would be necessary to include rare KIR2DL alleles not documented in our study. Moreover, our functional results raise additional questions concerning the influence of HLA-C polymorphism. Indeed, we observed a broad spectrum of HLA-C recognition by KIR2DL independently of C1/C2 classification, suggesting an impact of HLA-C polymorphism on the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire. Finally, we did not include peptide influence that seems to modulate KIR2DL affinity.

Some studies have reported either a beneficial [25,28] or no impact [26] of donor KIR B genotypes on relapse incidence after haplo-PTCY. However, the impact of donor KIR centromeric motifs on clinical outcome was not investigated so far after T-replete haplo-PTCY. Here, we report with multivariate analysis that myeloid patients grafted with HSC donors harboring a KIR cenAA motif have a lower incidence of relapse compared to cenB<sup>+</sup> donors after haplo-PTCY. In addition, multivariate analysis showed that DRI was the most significant factor affecting relapse incidence in myeloid patients after haplo-PTCY, as previously reported [47,48]. By contrast, no protective effect of donor B<sup>+</sup> genotype was shown on relapse incidence (data not shown [34]). Heterogeneities concerning the proportion of AML patients, conditioning regimen and stem cell source between published studies [25,26,28] and that reported here could explain these discordances. The protective effect of cenAA donors we report here was observed whatever the immunosuppressive regimen and only in myeloid patients, including 59% of AML patients. This is in agreement with our recent work showing that KIR<sup>+</sup> NK cell subsets are preferentially engaged against AML [49]. Overall, these clinical data suggest that the GvL effect could be driven by KIR2DL1 or 2DL3 specific of cenAA motifs after haplo-PTCY.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Healthy Individuals

One hundred and eight blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Nantes, France) and informed consent was given by all donors. Preparation and conservation of these biocollections have been declared to French Research's Minister (DC-2014-2340) and has received approval from the IRB (2015-DC-1).

### 4.2. Cohort of T-Replete Haplo-Identical HSCT Patients

This retrospective study has included 81 adult patients with various hematological malignancies who received a T cell-replete haploidentical HSCT with post-transplant cyclophosphamide (haplo-PTCY) in the Hematology Department of Nantes University Hospital. Conditioning regimens



consisted of a Baltimore-based RIC regimen with fludarabine ( $n = 26$ ) [50] or clofarabine (Clo-Baltimore,  $n = 27$ ) [51] or a CloB2A1 regimen with clofarabine 30 mg/m<sup>2</sup>/day (d), d-6 to -2, busulfan 3.4 mg/kg d-3 and d-2, and ATG 2.5 mg/kg d-1 ( $n = 28$ ) [52]. The source of graft was peripheral blood stem cell (PBSC) for all cases. The study complies with the Declaration of Helsinki. All patients provided informed consent for collecting their own data from the PROMISE database of the European Bone Marrow Transplantation (EBMT). This study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University Hospital and all patients and HSC donors provided informed consent. The clinical outcome and immune reconstitution of some patients have been previously reported [30,53] and have been updated in October 2020 for this study. The primary endpoint was relapse incidence.

#### 4.3. Cells (PBMCs and Cell Lines)

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from healthy individuals using Ficoll-Hypaque (Biosera, Nuaille, France). NK cell amplification was done using an in vitro model based previously described [54]. HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid cells, referred to as 221 cells, were used as positive control to assess NK cell degranulation. HLA-C\*03:04 (C1), -C\*07:01 (C1), -C\*08:02 (C1), -C\*02:02 (C2), -C\*04:01 (C2), -C\*06:02 (C2) and -C\*15:03 (C2) transfected 221 cells were used to evaluate KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation as previously described [15]. The 221-cell line and HLA-C-transfected 221 cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing glutamax (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

#### 4.4. HLA Class I and KIR Genotyping

HLA-A, -B, and -C typing was carried out by Next-Generation-Sequencing (NGS) using Omixon Holotype HLA<sup>®</sup> (Omixon, Budapest, Hungary). Generic KIR typing was performed on all individuals and HSC donors using a KIR multiplex PCR-SSP method [55]. Centromeric and telomeric KIR motifs were defined taking into account KIR2DL2/3/S2 and KIR3DL1/S1/2DS1/2DS4 genes respectively as reported [12]. KIR2DL1/2/3/S1/S2 alleles were assigned on all healthy individuals by NGS [31]. KIR genes were firstly captured by Long Range PCR using five intergenic KIR primers according the LR-PCR protocol already described [31]. Qubit dsDNA high sensitivity Assay kit (Life technologies, Villebon sur Yvette, France) was used to quantify the starting DNA library on a Qubit<sup>®</sup> fluorometer (Life technologies). The KIR library preparation was performed using the NGSgo GENDX kit (Bedia Genomics, Chavenay, France) according to the manufacturer's instructions. The final denatured library was subsequently sequenced by using a MiSeq sequencer (HLA laboratory, EFS Nantes, France) with 500 cycles v2 kits which generated 250-base paired-end sequence reads. The quality of raw data sequences was monitored by using the Sequencing Analysis Viewer (SAV) Illumina software. KIR2DL1/2/3/S1/S2 allele assignment was performed by using the Profiler software developed by Dr M. Alizadeh (Research Laboratory, Blood Bank, Rennes, France) [31]. An updated KIR allele library (v2.9) was implemented into the Profiler software version 2.24.

#### 4.5. Phenotypic Analysis and CD107a Mobilization Assay Using Flow Cytometry

The phenotype of NK cells, defined as CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, was determined by 8-color multiparameter flow cytometry (MFC) using the following mAbs: anti-KIR2DL1-PE (143211; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-KIR2DL1/S1-PE/-PC7 (EB6), anti-KIR2DL2/3/S2-PC7/-PerCP5.5 (GL183; Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France), anti-KIR2DL3-FITC (clone 180701; R&D systems), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA) and CD3-PerCP (SK7, BD Biosciences, Le pont de Claix, France), anti-NKG2A-PE/-PerCP (Z199; Beckman Coulter), anti-CD56-APC-Cy7/-BV510 (HCD56), anti-KIR2DL1/2/3/S2-AF647 (8C11), anti-KIR2DL3/S2-AF647 (1F12), and anti-KIR2DL1/2/3/S1/S2-FITC (1A6) generated and characterized in our laboratory [32]. Ex vivo NK cells or in vitro expanded NK

cell degranulation was assessed as previously reported [53]. MFC data were collected on a FACS Canto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo™ 10.2 software (LLC, Ashland, OR, USA).

#### 4.6. Statistical Analysis

Categorical data were analyzed by Chi-square test and univariate comparisons were performed by the Student t test. Statistical differences in KIR2DL<sup>+</sup> NK cell frequencies between individuals having different KIR2DL1/2/3 alleles were analyzed with unpaired t tests or one-way ANOVA test for multiple comparisons using the GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA, USA). Clinical and demographic variables for patients (i.e., age, gender, status at treatment, disease risk index, conditioning and donor centromeric AA KIR motif) were evaluated for their impact on relapse incidence in univariate and multivariate analyses using LogRank test and Cox proportional hazards models adjusted for significant clinical factors. Multivariate analysis was performed including only variables having a *p*-value less than 0.20. Univariate and multivariate analyses were performed with the Medcalc (Ostend, Belgium) software. *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

### 5. Conclusions

Altogether, our data suggest that cenAA individuals display more efficient KIR2DL alleles (L1\*003 and L3\*001) to mount a consistent frequency of KIR2DL<sup>+</sup> NK cells and to confer an effective NK cell responsiveness. The transposition of our in vitro observations in T-replete haplo-identical HSCT context led us to observe that cenAA HSC grafts limit significantly the incidence of relapse in patients with myeloid diseases after T-replete haplo-identical HSCT. Nevertheless, our conclusions have to be taken with caution and to be confirmed from a larger cohort of haplo-identical HSCT donor/recipient pairs. NK cell characteristics are crucial in HSCT, one could expect that the consideration of KIR2DL1/2/3 allelic polymorphism could help to refine scores used for HSC donor selection, and to evaluate its influence on HSCT outcome.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/12/3595/s1>, Figure S1: Structural model of KIR2DL1 allotypes complexed with HLA-Cw4 molecule, Table S1: Numerous KIR2DL1/2/3/S1/S2 allele combinations encountered in a cohort of French blood donors (*n* = 108) depending on KIR gene motifs and HLA-Cw environment. Table S2: Characteristics of patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, C.R. and K.G. (Katia Gagne); methodology, L.D., B.M., N.L., G.D., C.W., D.R.M. and A.Q.; software, M.A., A.Q.; statistical analysis, L.D., C.R., K.G. (Katia Gagne) and M.C.B.; validation, C.R. and K.G. (Katia Gagne); formal analysis, L.D., N.L., A.Q., A.C. and B.M.; investigation, C.R., K.G. (Katia Gagne) and P.C.; resources, K.G. (Ketevan Gendzekhadze); data curation, L.D., B.M., A.C., P.C., M.C.B., C.R. and K.G. (Katia Gagne); writing—original draft preparation, L.D., K.G. (Katia Gagne) and C.R.; writing—review and editing, L.D., K.G. (Katia Gagne) and C.R.; supervision, C.R. and K.G. (Katia Gagne); funding acquisition, C.R. and K.G. (Katia Gagne). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by EFS Centre-Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated Hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET), Etablissement Français du Sang (EFS), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF), La Ligue contre le Cancer and Agence de la Biomédecine (ABM). L.D. and D.R.M. are PhD students supported by la Région Pays de la Loire/EFS Centre Pays de la Loire (N°2018-09766) and by Industrial Agreement for Training through research grants (N°2017-0850) respectively. B.M. was a PhD student supported by Industrial Agreement for Training through research grants (N°481-2015).

**Acknowledgments:** We are grateful to all blood donors for participating in this study. We thank Steven G.E. Marsh, James Robinson (Anthony Nolan Research Institute, London, UK), Tanguy Regnault (EFS, Rennes, France) for their help in updating the IPD-KIR allele database into the Profiler software. We also thank Alexandre Walencik (HLA laboratory, EFS Nantes, France) for his advices and the access of the MiSeq platform.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A

### Modelling of KIR2DL1/HLA-Cw4 Complexes

Sequence alignment of KIR2DL1 allotypes (\*002, \*003, \*004) was calculated from pairwise structure alignment (Align123 algorithm, Discovery Studio 2017 DS, Dassault Systèmes BIOVIA,

San Diego), and then manually optimized. The X-ray crystallographic structure of the KIR2DL1 bound to HLA-Cw4 (PDB code 1IM9) was used to obtain the structural models of the KIR2DL1 allotypes/HLA-Cw4 complexes. The structure was first prepared by adding hydrogen atoms, removing water molecules, and inserting the missing loop region using the Prepare Protein tool within DS. Non-bound KIR2DL1\*002 allotype structure was extracted from the prepared structure complex (100% identity) and used to obtain the structural model of the two other non-bound KIR2DL1 allotypes (\*003 and \*004) using the “Build Mutant” tool of DS with secondary restraints and a distance cut-off of 5 Å centered on the mutate residues for including neighboring residues in optimization. The generated models were checked using Verify\_3D (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D>) and Procheck (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK>) programs and the structures with the best stereochemical and folding qualities were retained. The structural models of the KIR2DL1 allotypes have then undergone a series of energy minimizations with CHARMM force field implemented under DS in a two-step procedure to relax progressively the structures (1: all heavy atoms fixed; 2: heavy atoms of the backbone fixed) using steepest descent steps with convergence obtained at 0.001 and 0.01 rmsg respectively. Finally, the structural models of the three KIR2DL1 allotypes bound to the HLA-Cw4 molecule were obtained by superimposing the three non-bound KIR2DL1 allotype structural models into the prepared KIR2DL1/HLA-Cw4 complex structure. A last minimization step (steepest descent with convergence obtained at 0.01 rmsg and fixed constraints for the backbone atoms and for the heavy atoms of all residues outside the KIR2DL1/HLA-Cw4 interface) was then carried out to avoid atom clashes and to optimize interactions in the interface.

## References

- Retière, C.; Willem, C.; Guillaume, T.; Vié, H.; Gautreau-Rolland, L.; Scotet, E.; Saulquin, X.; Gagne, K.; Béné, M.C.; Imbert, B.-M.; et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* **2018**, *9*, 11451–11464. [[CrossRef](#)]
- Locatelli, F.; Pende, D.; Falco, M.; Della Chiesa, M.; Moretta, A.; Moretta, L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 577–590. [[CrossRef](#)]
- Ruggeri, L.; Capanni, M.; Urbani, E.; Perruccio, K.; Shlomchik, W.D.; Tosti, A.; Posati, S.; Rogaia, D.; Frassoni, F.; Aversa, F.; et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **2002**, *295*, 2097–2100. [[CrossRef](#)]
- Kärre, K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 477–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hilton, H.G.; Parham, P. Missing or altered self: Human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics* **2017**, *69*, 567–579. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Anfossi, N.; André, P.; Guia, S.; Falk, C.S.; Roetynck, S.; Stewart, C.A.; Bresó, V.; Frassati, C.; Reviron, D.; Middleton, D.; et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* **2006**, *25*, 331–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thielens, A.; Vivier, E.; Romagné, F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): From biology to clinical intervention. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 239–245. [[CrossRef](#)]
- Djaoud, Z.; Parham, P. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. *Annu. Rev. Biochem.* **2020**, *89*, 717–739. [[CrossRef](#)]
- Béziat, V.; Hilton, H.G.; Norman, P.J.; Traherne, J.A. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology* **2017**, *150*, 248–264. [[CrossRef](#)]
- Uhrberg, M.; Valiante, N.M.; Shum, B.P.; Shilling, H.G.; Lienert-Weidenbach, K.; Corliss, B.; Tyan, D.; Lanier, L.L.; Parham, P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity* **1997**, *7*, 753–763. [[CrossRef](#)]
- Jiang, W.; Johnson, C.; Jayaraman, J.; Simecek, N.; Noble, J.; Moffatt, M.F.; Cookson, W.O.; Trowsdale, J.; Traherne, J.A. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res.* **2012**, *22*, 1845–1854. [[CrossRef](#)]

12. Cooley, S.; Weisdorf, D.J.; Guethlein, L.A.; Klein, J.P.; Wang, T.; Le, C.T.; Marsh, S.G.E.; Geraghty, D.; Spellman, S.; Haagensohn, M.D.; et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **2010**, *116*, 2411–2419. [[CrossRef](#)]
13. Fan, Q.R.; Long, E.O.; Wiley, D.C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 452–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Boyington, J.C.; Motyka, S.A.; Schuck, P.; Brooks, A.G.; Sun, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* **2000**, *405*, 537–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. David, G.; Djaoud, Z.; Willem, C.; Legrand, N.; Rettman, P.; Gagne, K.; Cesbron, A.; Retière, C. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4778–4788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gagne, K.; Willem, C.; Legrand, N.; Djaoud, Z.; David, G.; Rettman, P.; Bressollette-Bodin, C.; Senitzer, D.; Esbelin, J.; Cesbron-Gautier, A.; et al. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43*, 1085–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Gardiner, C.M.; Guethlein, L.A.; Shilling, H.G.; Pando, M.; Carr, W.H.; Rajalingam, R.; Vilches, C.; Parham, P. Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2992–3001. [[CrossRef](#)]
18. Bari, R.; Bell, T.; Leung, W.-H.; Vong, Q.P.; Chan, W.K.; Gupta, N.D.; Holladay, M.; Rooney, B.; Leung, W. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood* **2009**, *114*, 5182–5190. [[CrossRef](#)]
19. Dunphy, S.E.; Guinan, K.J.; Chorcora, C.N.; Jayaraman, J.; Traherne, J.A.; Trowsdale, J.; Pende, D.; Middleton, D.; Gardiner, C.M. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes Immun.* **2015**, *16*, 301–310. [[CrossRef](#)]
20. Le Luduec, J.-B.; Boudreau, J.E.; Freiberg, J.C.; Hsu, K.C. Novel Approach to Cell Surface Discrimination Between KIR2DL1 Subtypes and KIR2DS1 Identifies Hierarchies in NK Repertoire, Education, and Tolerance. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
21. Huhn, O.; Chazara, O.; Ivarsson, M.A.; Retière, C.; Venkatesan, T.C.; Norman, P.J.; Hilton, H.G.; Jayaraman, J.; Traherne, J.A.; Trowsdale, J.; et al. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 2593–2601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bari, R.; Rujkijyanont, P.; Sullivan, E.; Kang, G.; Turner, V.; Gan, K.; Leung, W. Effect of Donor KIR2DL1 Allelic Polymorphism on the Outcome of Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3782–3790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Boudreau, J.E.; Giglio, F.; Gooley, T.A.; Stevenson, P.A.; Le Luduec, J.-B.; Shaffer, B.C.; Rajalingam, R.; Hou, L.; Hurley, C.K.; Noreen, H.; et al. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 2268–2278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Weisdorf, D.; Cooley, S.; Wang, T.; Trachtenberg, E.; Vierra-Green, C.; Spellman, S.; Sees, J.A.; Spahn, A.; Vogel, J.; Fehniger, T.A.; et al. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 740–754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Symons, H.J.; Leffell, M.S.; Rossiter, N.D.; Zahurak, M.; Jones, R.J.; Fuchs, E.J. Improved survival with inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2010**, *16*, 533–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bastos-Oreiro, M.; Anguita, J.; Martínez-Laperche, C.; Fernández, L.; Buces, E.; Navarro, A.; Pascual, C.; Pérez-Corral, A.; Balsalobre, P.; Muñoz, C.; et al. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur. J. Haematol.* **2016**, *96*, 483–491. [[CrossRef](#)]



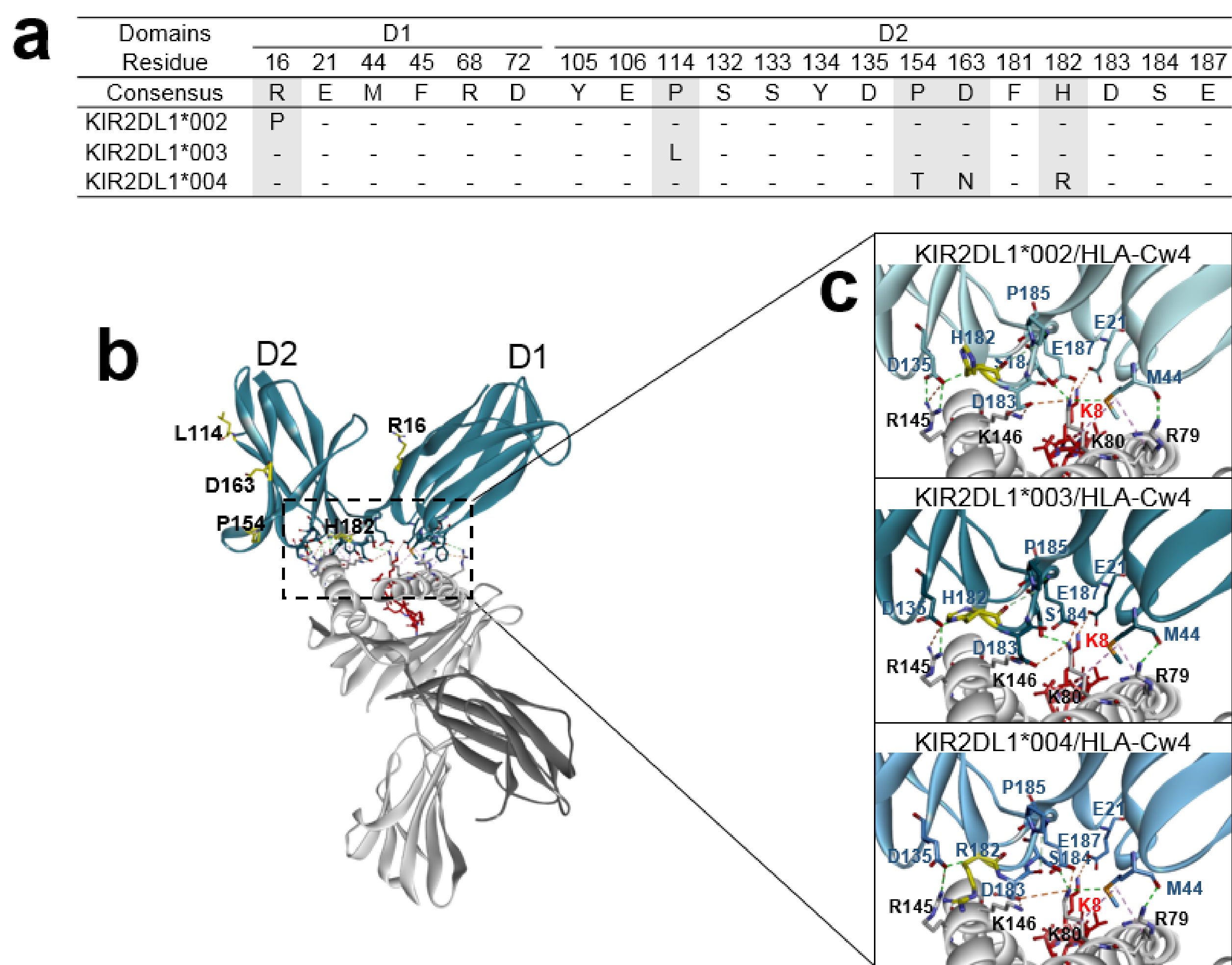
27. Wanquet, A.; Bramanti, S.; Harbi, S.; Fürst, S.; Legrand, F.; Faucher, C.; Granata, A.; Calmels, B.; Lemarie, C.; Picard, C.; et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor–Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell–Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 549–554. [[CrossRef](#)]
28. Solomon, S.R.; Aubrey, M.T.; Zhang, X.; Piluso, A.; Freed, B.M.; Brown, S.; Jackson, K.C.; Morris, L.E.; Holland, H.K.; Solh, M.M.; et al. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other Clinical Variables. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2018**, *24*, 789–798. [[CrossRef](#)]
29. Shimoni, A.; Labopin, M.; Finke, J.; Ciceri, F.; Deconinck, E.; Kröger, N.; Gramatzki, M.; Stelljes, M.; Blaise, D.; Stoelzel, F.; et al. Donor selection for a second allogeneic stem cell transplantation in AML patients relapsing after a first transplant: A study of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood Cancer J.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
30. Willem, C.; Makanga, D.R.; Guillaume, T.; Maniangou, B.; Legrand, N.; Gagne, K.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Béné, M.C.; Cesbron, A.; et al. Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 2141–2152. [[CrossRef](#)]
31. Maniangou, B.; Legrand, N.; Alizadeh, M.; Guyet, U.; Willem, C.; David, G.; Charpentier, E.; Walencik, A.; Retière, C.; Gagne, K. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
32. David, G.; Morvan, M.; Gagne, K.; Kerdudou, N.; Willem, C.; Devys, A.; Bonneville, M.; Folléa, G.; Bignon, J.-D.; Retière, C. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* **2009**, *128*, 172–184. [[CrossRef](#)]
33. Schönberg, K.; Sribar, M.; Enczmann, J.; Fischer, J.C.; Uhrberg, M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* **2011**, *117*, 98–107. [[CrossRef](#)]
34. Gagne, K.; Béné, M.C.; Nantes University Hospital, Nantes, France. Unpublished work. 2020.
35. Wagner, I.; Schefzyk, D.; Pruschke, J.; Schöfl, G.; Schöne, B.; Gruber, N.; Lang, K.; Hofmann, J.; Gnahn, C.; Heyn, B.; et al. Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Hilton, H.G.; Vago, L.; Older Aguilar, A.M.; Moesta, A.K.; Graef, T.; Abi-Rached, L.; Norman, P.J.; Guethlein, L.A.; Fleischhauer, K.; Parham, P. Mutation at Positively Selected Positions in the Binding Site for HLA-C Shows That KIR2DL1 Is a More Refined but Less Adaptable NK Cell Receptor Than KIR2DL3. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 1418–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hilton, H.G.; Norman, P.J.; Nemat-Gorgani, N.; Goyos, A.; Hollenbach, J.A.; Henn, B.M.; Gignoux, C.R.; Guethlein, L.A.; Parham, P. Loss and Gain of Natural Killer Cell Receptor Function in an African Hunter-Gatherer Population. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1005439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Vargas, L.d.B.; Dourado, R.M.; Amorim, L.M.; Ho, B.; Calonga-Solis, V.; Issler, H.C.; Marin, W.M.; Beltrame, M.H.; Petzl-Erler, M.L.; Hollenbach, J.A.; et al. Single Nucleotide Polymorphism in KIR2DL1 Is Associated With HLA-C Expression in Global Populations. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Luduec, J.-B.L.; Kudva, A.; Boudreau, J.E.; Hsu, K.C. Novel multiplex PCR-SSP method for centromeric KIR allele discrimination. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Shilling, H.G.; Guethlein, L.A.; Cheng, N.W.; Gardiner, C.M.; Rodriguez, R.; Tyan, D.; Parham, P. Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 2307–2315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Béziat, V.; Traherne, J.A.; Liu, L.L.; Jayaraman, J.; Enqvist, M.; Larsson, S.; Trowsdale, J.; Malmberg, K.-J. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* **2013**, *121*, 4703–4707. [[CrossRef](#)]
42. Saunders, P.M.; Vivian, J.P.; O’Connor, G.M.; Sullivan, L.C.; Pymm, P.; Rossjohn, J.; Brooks, A.G. A bird’s eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 148–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rajagopalan, S.; Long, E.O. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1523–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Charoudeh, H.N.; Schmied, L.; Gonzalez, A.; Terszowski, G.; Czaja, K.; Schmitter, K.; Infanti, L.; Buser, A.; Stern, M. Quantity of HLA-C surface expression and licensing of KIR2DL+ natural killer cells. *Immunogenetics* **2012**, *64*, 739–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Sips, M.; Liu, Q.; Draghi, M.; Ghebremichael, M.; Berger, C.T.; Suscovich, T.J.; Sun, Y.; Walker, B.D.; Carrington, M.; Altfeld, M.; et al. HLA-C levels impact natural killer cell subset distribution and function. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 1147–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lunemann, S.; Martrus, G.; Hölzemer, A.; Chapel, A.; Ziegler, M.; Körner, C.; Beltran, W.G.; Carrington, M.; Wedemeyer, H.; Altfeld, M. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C\*03:04 and modulate NK cell function. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 252–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cieri, N.; Greco, R.; Crucitti, L.; Morelli, M.; Giglio, F.; Levati, G.; Assanelli, A.; Carrabba, M.G.; Bellio, L.; Milani, R.; et al. Post-transplantation Cyclophosphamide and Sirolimus after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using a Treosulfan-based Myeloablative Conditioning and Peripheral Blood Stem Cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2015**, *21*, 1506–1514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Solomon, S.R.; Solh, M.; Morris, L.E.; Holland, H.K.; Bashey, A. Myeloablative Conditioning with PBSC Grafts for T Cell-Replete Haploidentical Donor Transplantation Using Posttransplant Cyclophosphamide. *Adv. Hematol.* **2016**, *2016*, 9736564. [[CrossRef](#)]
49. Makanga, D.R.; Da Rin de Lorenzo, F.; David, G.; Willem, C.; Dubreuil, L.; Legrand, N.; Guillaume, T.; Peterlin, P.; Lebourgeois, A.; Béné, M.C.; et al. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers* **2020**, *12*, 1927. [[CrossRef](#)]
50. Luznik, L.; O'Donnell, P.V.; Symons, H.J.; Chen, A.R.; Leffell, M.S.; Zahurak, M.; Gooley, T.A.; Piantadosi, S.; Kaup, M.; Ambinder, R.F.; et al. HLA-haploidentical bone marrow transplantation for hematologic malignancies using nonmyeloablative conditioning and high-dose, posttransplantation cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2008**, *14*, 641–650. [[CrossRef](#)]
51. Chevallier, P.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Le Bourgeois, A.; Mahé, B.; Dubruille, V.; Blin, N.; Touzeau, C.; Gastinne, T.; Lok, A.; et al. Clofarabine-based reduced intensity conditioning regimen with peripheral blood stem cell graft and post-transplant cyclophosphamide in adults with myeloid malignancies. *Oncotarget* **2018**, *9*, 33528–33535. [[CrossRef](#)]
52. Le Bourgeois, A.; Labopin, M.; Leclerc, M.; de Latour, R.P.; Bourhis, J.-H.; Ceballos, P.; Orvain, C.; Wallet, H.L.; Bilger, K.; Blaise, D.; et al. Clofarabine/busulfan-based reduced intensity conditioning regimens provides very good survivals in acute myeloid leukemia patients in complete remission at transplant: A retrospective study on behalf of the SFGM-TC. *Oncotarget* **2018**, *9*, 36603–36612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Makanga, D.R.; Guillaume, T.; Willem, C.; Legrand, N.; Gagne, K.; Cesbron, A.; Gendzekhadze, K.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Le Bourgeois, A.; et al. Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1441–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Morvan, M.; David, G.; Sébille, V.; Perrin, A.; Gagne, K.; Willem, C.; Kerdudou, N.; Denis, L.; Clémenceau, B.; Folléa, G.; et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 3474–3486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Sun, J.Y.; Gaidulis, L.; Miller, M.M.; Goto, R.M.; Rodriguez, R.; Forman, S.J.; Senitzer, D. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* **2004**, *64*, 462–468. [[CrossRef](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Figure S1. Structural model of KIR2DL1 allotypes complexed with HLA-Cw4 molecule.** (a) Alignment of partial amino acid sequences of D1 and D2 domains for three KIR2DL1 allele-encoded receptors (allotypes). Identity with the consensus sequence is indicated by dashes “-”, the polymorphic residues are highlighted in grey and residues in contact with the HLA-Cw4 molecule are also shown. (b) Ribbon diagram of the KIR2DL1\*003 allotype (in blue) bound to the HLA-Cw4 molecule (in grey) and in complex with its specific peptide (in red) (modelling based on the structure PDB 1IM9). The polymorphic residues are shown in yellow. (c) Details and comparison of the interaction network between three KIR2DL1 allotypes (in blue) and the HLA-Cw4 molecule (in grey) in complex with its specific peptide (in red), the polymorphic residue at position 182 of the KIR2DL1 allotypes is shown in yellow.

Table S1. Numerous KIR2DL1/2/3/S1/S2 allele combinations encountered in a cohort of French blood donors (N=108) depending on KIR gene motifs and HLA-Cw environment

	KIR allele typing									N	HLA-C environment			KIR motifs		
	2DS2	2DS2	2DL2	2DL2	2DL3	2DL3	2DL1	2DL1	2DS1		2DS1	C1C1	C1C2	C2C2	Cen	Tel
1	-	-	-	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	-	-	9	4	4	1	AA	AA
2	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	6	1	3	2	AB	AB/BB
3	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*007</i>	<b>*002</b>	-	-	-	5	4	1		AA	AA
4	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	-	-	5	3		2	AB	AA
5	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	5	1	4		AB	AB/BB
6	-	-	-	-	+	-	<b>*003</b>	-	-	-	4	1	3		AA	AA
7	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*001</i>	<b>*002</b>	<b>*003</b>	-	-	4	2		2	AA	AA
8	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*004</b>	-	-	4	4			AB	AA/AB
9	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	-	-	4	2	1	1	AB	AA/AB
10	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	-	-	3	2		1	AB	AA
11	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	-	-	3		1	2	AB	AA/AB
12	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	3	2	1		AB	AB/BB
13	-	-	-	-	<b>*002</b>	<b>*005</b>	<b>*002</b>	<b>*001</b>	-	-	2		1	1	AA	AA
14	-	-	-	-	<b>*005</b>	<i>*007</i>	<b>*002</b>	-	-	-	2		1	1	AA	AA
15	-	-	-	-	<b>*001</b>	<i>*002</i>	<b>*003</b>	-	-	-	2	1	1		AA	AA
16	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	2		1	1	AB	AB/BB
17	<b>*001</b>	-	+	-	+	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	2		1	1	AB	AB/BB
18	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<i>*001</i>	-	-	<b>*004</b>	-	-	-	2	1		1	BB	AA
19	-	-	-	-	<b>*001</b>	<b>*005</b>	<b>*003</b>	<b>*001</b>	-	-	1	1			AA	AA
20	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*015</i>	<b>*003</b>	<b>*001</b>	-	-	1		1		AA	AA
21	-	-	-	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	-	-	1	1			AA	AA
22	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*001</i>	<b>*002</b>	<i>J01/002/00</i>	-	-	1		1		AA	AA
23	-	-	-	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<i>*001/002</i>	-	-	1	1			AA	AA
24	-	-	-	-	+	-	<b>*003</b>	<i>*001/002</i>	-	-	1		1		AA	AA
25	-	-	-	-	<b>*001</b>	<i>*002</i>	<b>*003</b>	<i>J01/002/00</i>	-	-	1		1		AA	AA
26	-	-	-	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	1		1		AA	AB
27	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*007</i>	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*003</b>	1	1			AA	AB
28	-	-	-	-	<b>*002</b>	<i>*001</i>	<b>*002</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	1			1	AA	AB
29	-	-	-	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	<b>*006</b>	1	1			AA	AB
30	-	-	-	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	<b>*003</b>	1		1		AA	AB
31	-	-	-	-	<b>*003</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	1			1	AA	AB
32	-	-	-	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	1	1			AA	AB
33	-	-	-	-	+	-	<b>*003</b>	<i>J01/002/00</i>	<b>*002</b>	-	1		1		AA	AB
34	-	-	-	-	<b>*001</b>	<i>*005</i>	<b>*003</b>	<i>*001/002</i>	<b>*002</b>	-	1		1		AA	AB
35	-	-	-	-	<b>*001</b>	<i>*002</i>	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	<b>*006</b>	1	1			AA	AB
36	-	-	-	-	<b>*001</b>	<i>*002</i>	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	1			1	AA	BB
37	-	-	-	-	+	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	-	-	1		1		AA	nd
38	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*005</b>	-	<b>*004</b>	<b>*001</b>	-	-	1			1	AB	AA
39	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*007</b>	-	-	1		1		AB	AA
40	<b>*001</b>	-	+	-	+	-	<b>*002</b>	<b>*007</b>	-	-	1			1	AB	AA
41	<b>*001</b>	-	<b>*012</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	-	-	1	1			AB	AA
42	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<i>*004/006</i>	-	-	1	1			AB	AA
43	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*003</b>	1		1		AB	AB
44	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	+	-	<b>*002</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	1	1			AB	AB
45	<b>*001</b>	-	<b>*008</b>	-	<b>*002</b>	-	<b>*002</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	1			1	AB	AB
46	-	-	+	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	<b>*002</b>	-	1	1			AB	AB
47	<b>*001</b>	<b>*002</b>	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	<b>*002</b>	-	1		1		AB	AB
48	<b>*001</b>	-	+	-	+	-	<b>*003</b>	<b>*004</b>	-	-	1		1		AB	AB
49	<b>*001</b>	-	+	-	+	-	<b>*003</b>	<b>*007</b>	<b>*002</b>	-	1	1			AB	BB
50	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	-	-	-	-	-	-	1		1		BB	AA
51	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<i>*012</i>	-	-	-	-	-	-	1		1		BB	AA
52	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	<i>*012</i>	-	-	-	<i>*002/006</i>	-	-	1	1			BB	AB
53	<b>*001</b>	<b>*002</b>	<b>*003</b>	<i>*008</i>	-	-	<b>*004</b>	-	<b>*002</b>	-	1	1			BB	AB
54	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	-	-	-	<b>*004</b>	-	-	-	1			1	BB	AB
55	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	<i>*008</i>	-	-	<b>*004</b>	-	-	-	1			1	BB	AB
56	<b>*001</b>	-	<b>*001</b>	<i>*005</i>	-	-	<b>*004</b>	-	-	-	1		1		BB	AB
57	<b>*001</b>	-	<b>*003</b>	-	-	-	<b>*004</b>	-	<b>*002</b>	-	1		1		BB	AB
58	<b>*001</b>	-	+	-	-	-	<b>*007</b>	<i>*001/002</i>	<b>*002</b>	-	1		1		BB	AB
59	<b>*001</b>	-	+	-	-	-	<b>*007</b>	-	<b>*002</b>	-	1			1	BB	AB
N											108	42	41	25		

KIR2DL1/2/3/S1/S2 alleles were assigned using NGS and Profiler software. Main KIR2DL1/2/3 allele combinations were highlighted in bold or italics characters. Absence of a specific KIR gene was mentioned using "-". KIR2DL1/2/3 remaining allele ambiguities and non-assigned alleles were indicated using "/" and "+" respectively. KIR centromeric (Cen)/telomeric (Tel) motifs were defined. C1C1, C1C2 and C2C2 environment were defined depending on HLA-C allelic typing.



**Table S2.** Characteristics of patients

	<b>All patients N=81</b>	<b>CenAA* donors N=39</b>	<b>CenAB.BB* donors N=42</b>	<b>P value</b>
Gender: male	49 (60%)	26 (67%)	23 (55%)	0.36
Median age: years (range)	60 (24-71)	61 (24-71)	58 (32-71)	0.71
<b>Disease</b>				
AML/MDS	32/14 (57%)	17/6 (59%)	15/8 (55%)	0.82
ALL	5	1	4	
HD	4	2	2	
NHL	14	7	7	
CLL	4	3	1	
Myelofibrosis	4		4	
pDCs neoplasm	2	2		
CML	1		1	
Mycosis fungoides	1	1		
Myeloid/lymphoid	51(63%)/30(37%)	23(59%)/16(41%)	28(67%)/14(33%)	0.50
<b>Status at treatment</b>				
CR1/CR2/CR3	30/10/3 (53%)	13/4/1 (46%)	17/6/2 (60%)	0.27
PR1/PR2/PR3/PR5	5/5/4/4 (22%)	3/3/3/4 (33%)	2/2/1 (12%)	
Active	19 (24%)	7 (18%)	12 (28%)	
Aplasia	1 (1%)	1 (3%)		
<b>Disease risk index</b>				
Intermediate	34 (42%)	15 (38%)	19 (45%)	0.65
High	47 (58%)	24 (62%)	23 (55%)	
Previous allograft	12 (15%)	6 (15%)	6 (15%)	
<b>Conditioning</b>				
Baltimore	26 (32%)	11 (28%)	15 (36%)	0.49
Clo-Baltimore	27 (33%)	13 (33%)	14 (33%)	
CloB2A1	28 (35%)	15 (38%)	13 (31%)	
<b>Haplo-donors</b>				
Median age: years (range)	42 (20-72)	42 (22-71)	41 (20-72)	0.85
Sister/Brother	12/20 (40%)	9/7 (41%)	3/13 (38%)	0.83
Father/Mother	6/2 (10%)	4/1 (13%)	2/1 (7%)	
Son/Daughter	24/12 (44%)	11/4 (38%)	13/8 (50%)	
Nephew	5 (6%)	3 (8%)	2 (5%)	
<b>Donor/recipient CMV status</b>				
-/-	46 (57%)	20 (51%)	26 (62%)	0.37
-/+	16 (20%)	8 (21%)	8 (19%)	
+/-	8 (10%)	5 (13%)	3 (7%)	
+/+	11 (13%)	6 (15%)	5 (12%)	
<b>ABO compatibility</b>				
compatibility	53 (65%)	27 (70%)	26 (62%)	0.64
Minor inc	15 (19%)	6 (15%)	9 (21%)	
Major inc	13 (16%)	6 (15%)	7 (17%)	
<b>Graft composition</b>				
Median CD34 <sup>+</sup> cells: 10 <sup>6</sup> /kg	7.92 (2.88-19.94)	7.89 (3.10-15.16)	7.96 (2.88-19.94)	0.95
Median CD3 <sup>+</sup> T cells: 10 <sup>7</sup> /kg	26.61 (7.71-49.99)	25.02 (12.60-46.66)	24.27 (7.71-49.99)	0.94
Median CD45 <sup>+</sup> cells: 10 <sup>8</sup> /kg	8.57 (3.80-18.65)	8.04 (3.80-18.65)	9.07 (5.04-13.80)	0.80

Abbreviations: AML: acute myeloid leukemia; MDS: myelodysplastic syndrome; ALL: acute lymphoblastic leukemia; HD: Hodgkin disease; NHL: non-Hodgkin lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; pDCs: plasmacytoid dendritic cells; CML: chronic myeloid leukemia; CR: complete remission; PR: partial remission; CMV: cytomegalovirus; inc: incompatibility. \*CenAA donors are KIR2DL3+/2DL2-/S2- ; CenAB.BB donors are KIR2DL2/S2+ and KIR2DL3-/+

**ARTICLE N°2:** The structuration of NK cell repertoire: more complexed than expected

Léa Dubreuil, Catherine Willem, Nolwenn Legrand, Gaëlle David, Léa Lemoine, Alexandre Walencik,  
Ketevan Gendzekhadze, Katia Gagne and Christelle Retière

*En préparation*

La diversité du répertoire des cellules NK est inter et intra-individuelle et repose à la fois sur les polymorphismes des gènes KIR et HLA de classe I. En effet, les individus peuvent héberger 7 à 14 gènes KIR fonctionnels conférant un premier niveau de diversité des cellules NK. De plus, l'expression des KIR est clonale sur les cellules NK et certains clones de cellules NK peuvent exprimer 1, 2, 3 ou plus de KIR alors que d'autres n'expriment pas de KIR. Bien que les gènes KIR et HLA de classe I ne soient pas portés par le même chromosome, la relation fonctionnelle étroite entre KIR et HLA conduit à une structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire des cellules NK (Makanga et al., 2020b).

Le complexe HLA est le système le plus polymorphe qui assure à la fois la restriction des lymphocytes T, principalement par les molécules HLA-A et HLA-B, et la surveillance des cellules NK, principalement par les molécules HLA-Cw reconnues par les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1/2/3 des cellules NK. Les molécules HLA-Cw sont environ 15 fois moins exprimées que les molécules HLA-A et -B (Apps et al., 2015). Cependant, l'expression des différentes molécules HLA-C est régulée par de nombreux mécanismes supportés par des polymorphismes SNP dans les régions régulatrices (Apps et al., 2013; Kaur et al., 2017; Kulkarni et al., 2011; Thomas et al., -2009; Vince et al., 2016) et/ou des haplotypes HLA étendus (Bettens et al., 2014). Par exemple, les polymorphismes localisés dans les sites de liaison des facteurs de transcription des gènes HLA-C ont un impact sur leur expression, les mutations dans les régions EnhA ou TATA affectant respectivement l'expression des molécules HLA-Cw7 et HLA-Cw3 (Ramsuran et al., 2017). Alors que nous commençons à comprendre les nombreux mécanismes qui régissent l'expression cellulaire des molécules HLA de classe I, nous sommes encore incapables de prédire le niveau d'expression des molécules HLA-Cw à la surface des cellules d'un individu donné, voire de différents types cellulaires chez un même individu (Carey et al., 2019).

Dans cette étude, notre objectif était de mieux prédire le niveau d'expression des molécules HLA-Cw à la surface de différents types cellulaires pour un allotype HLA-C donné en fonction du polymorphisme. Cette étude doit décrire les règles régissant l'expression des allotypes HLA-C et son impact sur la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire des cellules NK KIR2DL+. A partir d'une large cohorte de donneurs de sang HLA-C homozygotes, nous avons montré que le niveau d'expression des molécules HLA-C est hétérogène selon les allotypes et les types cellulaires (LT, LB, NK). L'absence de

corrélation entre les niveaux de transcrits HLA-C et des molécules HLA-Cw exprimées suggère des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle. Nous avons confirmé l'impact délétère du gène KIR2DL2 sur la fréquence des cellules NK KIR2DL1+ et KIR2DL3+, spécifiquement dans les environnements HLA-Cw3 et -Cw7 respectivement. L'éducation des cellules NK KIR2DL1+ par les ligands C2 est significativement modulée par le statut CMV, le gène KIR2DL5 et les allèles KIR2DL1. De plus, la nomenclature C1/C2 ne remplit pas tous les critères pour prédire l'éducation des cellules NK KIR2DL2/3+. Par ailleurs, une analyse de regroupement non supervisée basée sur la fréquence des différentes sous-populations NK des donneurs de sang HLA-C homozygotes montre une dichotomie structurelle entre les compartiments de cellules NK KIR2DL1/2/3+ et KIR3DL1+. Ces profils de sous-populations NK modulées par les marqueurs HLA de classe I permettent de mettre en lumière la structuration phénotypique et fonctionnelle des cellules NK. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que la classification des allotypes HLA-C en groupes C1 et C2 peut être modulée par d'autres marqueurs génétiques et par un niveau d'expression différentiel de certains allotypes HLA-C compensant une affinité plus faible du KIR2DL et réciproquement. Même si les grandes lignes sont définies pour comprendre les règles de la structuration du répertoire NK, cette étude souligne la complexité des interactions moléculaires KIR/HLA et la nécessité d'intégrer le polymorphisme HLA-C pour faire progresser notre compréhension de la biologie des cellules NK.

# The structuration of NK cell repertoire: more complexed than expected

Léa Dubreuil<sup>1,2,3</sup>, Catherine Willem<sup>1,2,3</sup>, Nolwenn Legrand<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle David<sup>1,2,3</sup>, Léa Lemoine<sup>1,2,3</sup>, Alexandre Walencik<sup>1</sup>, Ketevan Gendzekhadze<sup>4</sup>, Katia Gagne<sup>1,2,3,5,\*†</sup> and Christelle Retière<sup>1,2,3,\*†</sup>

## Affiliations:

<sup>1</sup> Etablissement Français du Sang, Nantes, 44011, France

<sup>2</sup> Université de Nantes, INSERM U1232 CNRS, CRCINA, 44000 Nantes

<sup>3</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, 44000 Nantes

<sup>4</sup> HLA laboratory, Department of Hematology and HSCT, City of Hope, Medical Center, 91010 Duarte, CA, USA

<sup>5</sup> LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, Strasbourg, 67000, France

\*Corresponding authors: Dr Katia GAGNE and Dr Christelle RETIERE, Etablissement Français du Sang Centre Pays de la Loire, INSERM U1232 CNRS, Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers, 34 boulevard Jean Monnet, 44011 Nantes cedex 01, France. Tel: +33-2-40-12-34-00; Fax: +33-2-40-12-33-33; Email: [katia.gagne@efs.sante.fr](mailto:katia.gagne@efs.sante.fr); [christelle.retiere@efs.sante.fr](mailto:christelle.retiere@efs.sante.fr)

† These authors have equally contributed to this work.

## Abstract

The inter- and intra-individual diversity of the NK cell repertoire is based on large KIR and HLA class I polymorphisms. In this study, we investigated the sway of HLA-C allotypes on the phenotypic and functional structuration of the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire from a large cohort of homozygous HLA-C blood donors. The HLA-C expression level is heterogeneous between allotypes and following blood cells. The absence of correlation between transcript and protein levels suggests mechanisms of post-transcriptional or post-translational regulation. We confirmed the deleterious impact of the KIR2DL2 gene on the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells, specifically in HLA-Cw3 and -Cw7 environments respectively. The C2 ligands driven KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education is significantly modulated by the CMV status, the KIR2DL5 gene and KIR2DL1 alleles. Even more decisively, the C1/C2 nomenclature does not fulfill all criteria to predict KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education. Otherwise, an unsupervised clustering analysis based on the frequency of NK cells from homozygous HLA-C blood donors revealed a structural dichotomy between KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell compartments. These NK cell profiles linked to HLA class I markers shed in light a functional driving of the phenotypic NK cell structuration. Altogether, our results speculate that the classification of HLA-C allotypes into C1 and C2 groups is balanced by other genetic markers and by a differential expression level of some HLA-C allotypes compensating a lower affinity of the KIR2DL and reciprocally. Even mainlines are defined to understand the rules of the structuration of the NK repertoire, this study highlights the complexity of molecular KIR/HLA interactions and the need to integrate the HLA-C polymorphism to advance our understanding of NK cell biology.

## Introduction

NK cells are the main cytotoxic lymphocytes of innate immunity implicated in anti-tumoral and anti-viral defences. NK cells are not antigen specific but they express numerous inhibitory and activating receptors that their engagement with cognate ligands regulate NK cell functions. NK cells sense the absence of HLA class I molecules on target cells via different inhibitory receptors. In particular, they express inhibitory KIR and CD94/NKG2A that recognize HLA class I and HLA-E molecules respectively. Thus, HLA class I expression is often down-regulated by viruses and in tumoral processes to escape from the T lymphocyte surveillance. In this way, target cells are susceptible to NK cell lysis as they do not express protective HLA class I molecules. This process is called “missing-self” (1).

Among inhibitory KIR of interest, KIR2DL1 recognises HLA-Cw molecules belonging to the group C2 epitope (Lys<sup>80</sup>) whereas KIR2DL2/3 recognises HLA-Cw molecules belonging to the C1 group epitope (Asn<sup>80</sup>) and some HLA-Cw molecules of C2 group (2). Beside HLA-C ligands, KIR3DL1 recognizes some HLA-A and HLA-B molecules bearing the Bw4 serologic motif (3, 4) and KIR3DL2 recognizes HLA-A3/A11 molecules (5, 6).

The diversity of the NK cell repertoire is inter- and intra-individual and is based on both KIR and HLA class I polymorphisms. Indeed, individuals can harbour 7 to 14 functional KIR genes and a first level of the NK cell diversity is conferred by the KIR gene content. Moreover, KIR expression is clonal on NK cells and some NK cell clones can express 1, 2, 3 or more KIR while others do not express KIR. The composition of all NK cell subsets with specific frequencies designs the NK cell repertoire. Although KIR and HLA class I genes are not carried by the same chromosome, the close functional relationship between KIR and HLA drives the phenotypic and functional structuration of the NK cell repertoire (7). In addition, we have recently shown the implication of KIR allelic polymorphism on NK cell repertoire with a clinical outcome after haplo-identical Hematopoietic Stem Cell Transplantations (HSCT) (8).

However, our functional results shed in light the needs to revisit the C1/C2 classification of HLA-Cw molecules leading to explain that all C1 and all C2 do not similarly interact with inhibitory KIR2DL1/2/3 receptors.

The HLA complex is the most polymorphic human system leading to ensure both T lymphocyte restriction mainly by HLA-A and HLA-B molecules and NK cell surveillance mainly using HLA-C molecules recognized by inhibitory KIR2DL1/2/3 on NK cells. HLA-C molecules are about 15 times lower expressed than HLA-A and -B molecules (9). However, among HLA-C molecules, allotype expression is differently regulated by numerous mechanisms supporting by SNP polymorphisms in the regulatory regions (10–14) and/or extended HLA haplotypes (15). For example, polymorphisms in the transcription factor binding sites of HLA-C impact their expression, as mutations in EnhA or TATA regions affect respectively HLA-Cw7 and HLA-Cw3 expression (16). Whilst we are beginning to understand the numerous mechanisms that govern cellular expression of HLA class I molecules, we are as yet unable to predict the level expression of HLA-C molecules on the cell surface of any one individual, or even on different cell types in the same individual (17).

In addition, different KIR/HLA class I interactions can act through NK licensing to generate different levels of intrinsic responsiveness. The "Rheostat model" predicted weaker licensing by KIR2DL2/3/HLA-C1 interactions than KIR2DL1/HLA-C2 (18, 19). Another study stated that KIR2DL2/3 and KIR2DL1 have similar capacities to licence NK cells (20). Therefore, the impact of the affinity of HLA-C ligands to cognate KIRs on NK cell licensing is still conflicting, suggesting that both the inhibitory signal strength and the amount of available HLA-C ligands play a role in this process. Overall, variation in HLA-C expression adds another layer of the NK repertoire diversity. We have recently shown heterogeneous levels of inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation against less stringent ligands as HLA-C\*08:02, -C\*02:02 and -C\*06:02 allele-encoded products (8). These observations do not match the



conventional C1 and C2 classification of HLA-C molecules. Thus, we speculate that either the classification of HLA-C allotypes into C1 and C2 groups has to be revisited or either a higher expression of some HLA-C allotypes might compensate a lower affinity of KIR2DL receptors and reciprocally.

In this study, our purpose had to better predict the expression level of HLA-C molecules on the cell surface on different cell types for a given HLA-C allotype. This study has to depict the rules governing HLA-C allotype expression and its impact on the phenotypic and functional structuration of the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire from a large cohort of homozygous HLA-C blood donors.

# Materials and Methods

## Cells (PBMCs and cell lines)

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated by density centrifugation on Ficoll-Hypaque (Biosera, France). One hundred and three homozygous HLA-C blood donors (**Table 1**) were recruited at the Blood Transfusion Center (Etablissement Français du Sang, Centre Pays de la Loire, France) and informed consent was given by all donors. Preparation and conservation of these biocollections have been declared to French Research's Minister (DC-2014-2340) and has received approval from the IRB (2015-DC-1). Cytomegalovirus (CMV) serology of 59 blood donors was carried out by the technical platform of the Virology Department of Nantes University Hospital (Pr. BM. Imbert, Dr. C. Bressollette) using plasmas from donor biocollections. The CMV serological status of donors was determined by the detection of IgG2 anti-CMV antibodies in plasmas using the LIAISON chemiluminescent immune test (DiaSorin, Saluggia, Italie). HLA class I-deficient 721.221 lymphoblastoid cells, referred to as 221 cells, were used as positive control to assess NK cell degranulation. The 221-cell line were cultured in RPMI 1640 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA-US) containing glutamax (Life Technologies) and penicillin-streptomycin (Life Technologies), and supplemented with 10% FBS (Life Technologies). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

## Lymphocyte's cell-sorting

B cells, T lymphocytes and NK cells were isolated from PBMC of homozygous HLA-C blood donors by positive selection. PBMC were pre-incubated at 5°C with the anti-CD19 (HIBI9; Becton Dickinson) mAb for B cells, the anti-CD3 (OKT3; EFS Nantes, France) mAb for T cells and the anti-NKp46 (9E2; Becton Dickinson) mAb for NK cells. The labelled cells were isolated with Dynabeads Pan Mouse IgG (Invitrogen, Waltham, MA, USA) (Cell/Beads

ratio=1:4) and incubated during 30 min under agitation. Respective B, T and NK cells were separated by means of magnetic rack DynaMag-15 (Invitrogen).

### **Phenotypic analysis by flow cytometry**

The phenotype of NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) cells was determined by 8-color multiparameter flow cytometry (MFC) using the following mAbs: anti-KIR2DL1-PE (143211; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-KIR2DL1/S1-APC/-PE/-PC7 (EB6; Beckman Coulter Immunotech, Marseille, France), anti-KIR2DL2/3/S2-APC/-PC7/-PerCP5.5 (GL183; Beckman Coulter), anti-KIR2DL3-FITC (clone 180701; R&D systems), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA), anti-CD3-PerCP (SK7, BD Biosciences, Le pont de Claix, France), anti-NKG2A-PC7 (Z199; Beckman Coulter), anti-CD56-APC-Cy7/-BV510 (HCD56; Biolegend Sony, San Diego, CA, USA), anti-KIR3DL1-APC (DX9; R&D Systems), anti-CD57-FITC (HNK-I; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), anti-NKG2C-PE (134591; R&D Systems), anti-DNAM-1-BV510 (11A8; Biolegend Sony), anti-KIR2DL1/2/3/S2-AF647 (8C11), anti-KIR2DL3/S2-AF647 (1F12), and anti-KIR2DL1/2/3/S1/S2-FITC (1A6) generated and characterized in our laboratory (21). HLA-C mean expression was evaluated on gated monocytes (CD14<sup>+</sup>), PBMC (CD45<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>), T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) and NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) cells, using the following mAbs: anti-HLA-C/HLA-E-PE (DT9; Becton Dickinson), anti-HLA-E-APC (HIB19; Biolegend Sony), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology), anti-CD45-BV421 (HI30, Biolegend Sony), anti-CD56-BV510 (HCD56; Biolegend Sony), anti-CD14-AF647 PC7 (3D12; Biolegend Sony) and anti-CD19-APC (HIB19; Biolegend Sony) mAbs. After cell sorting, the phenotypic control of enriched T, NK and B cells was determined using the anti-CD20-FITC (2H7, BD Biosciences), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology), anti-CD56-BV510 (HCD56; Biolegend Sony), anti-CD4-FITC (RPA-T4, BD Bioscience) and anti-CD8-PE mAbs (HIT8 $\alpha$ , BD Biosciences). MFC

phenotypic data were collected on a FACS Canto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo™ 10.2 software (LLC, Ashland, OR, USA).

### **CD107a mobilization assay**

*Ex-vivo* NK cells were pre-incubated with the anti-CD107a-BV421 mAb (H4A3; BD Biosciences) at 37°C. NK cell degranulation was assessed after incubation for 5h alone, with the 221 target cells (E/T ratio=1:1 and  $2.5 \times 10^6$  cells/well) in a bottom 96 well plate with brefeldin A (Sigma, Lezennes, France) at 10 µg/ml for the last 4h. Experiments were carried out in duplicate for each condition tested. NK cells were surface stained using the following mAbs: anti-KIR2DL1-FITC (143211; R&D), anti-KIR2DL3-FITC (180701; R&D), anti-KIR2DL3/S2-FITC (1F12), anti-KIR2DL2/3/S2-PE/-APC (GL183; Beckman Coulter), anti-KIR2DL1/S1-PE/-APC (EB6; Beckman Coulter), anti-KIR3DL1/S1 (Z27; Beckman Coulter), anti-ILT2-PE (GH1-75; Becton Dickinson), anti-NKG2A-PE (Z199 ; Beckman Coulter), anti-CD57 (KLRG1, CLEC15A; Sony), anti-CD3-APC-Cy7 (SK7; Sony) and anti-CD56-BV510 (HCD56; Sony). Degranulation of NK cells, defined by CD107a positive expression, was studied by MFC using CD3 absence and CD56 expression to target NK cells. All functional MFC data were collected on a FACS Canto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with the Flowjo™ 10.2 software (LLC).

### **HLA class I typing**

High-resolution typing for HLA-A, -B, and -C loci was carried out for all blood donors ( $n = 103$ ) by Next-Generation-Sequencing (NGS) using Omixon Holotype HLA® (Omixon, Budapest, Hungary) as reported (8). Depending on allelic HLA-A and HLA-B typing, the presence or absence of HLA-A3/A11 and HLA-A/B Bw4 environments were determined. Depending on HLA-C typing, donors were classified into C1+ or C2+ individuals.

### **KIR genotyping**

Generic KIR typing was performed on all blood donors ( $n = 103$ ) using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described (22). The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes were assigned. KIR genotypes (AA, B+), KIR centromeric (cenAA, cenB+) and telomeric (telAA, telB+) motifs were assigned as previously reported (8).

### **KIR allele typing**

To assign KIR alleles, KIR genes were firstly captured by Long Range PCR and subjected to sequencing on a MiSeq sequencer after library preparation as described (23). The quality of raw data was monitored by using the Illumina Sequencing Analysis viewer software. KIR allele assignment was performed by using the Profiler software version 2.24 developed by Dr M. Alizadeh (Research Laboratory, Blood Bank, Rennes, France) as reported (23).

### **Quantification of HLA-C transcripts**

Total RNA was extracted from peripheral blood lymphocytes of HLA-C homozygous blood donors ( $n = 90$ ), using the Nucleospin RNA+ kit (Macherey Nagel, Germany) according to manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed with the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and a random oligodT in presence of RNaseOUT (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). RNA from sorted T, B and NK cells were extracted using the Nucleospin RNA XS kit (Macherey Nagel) and reverse transcribed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). HLA-C transcripts were quantified relative to GAPDH (control) using the power SYBR® Green PCR master mix (ThermoFisher) on a real time-PCR System QuantStudio3 (ThermoFisher). Data were analysed using the QuantStudio software v1.5.1 (ThermoFisher) and results were expressed as relative quantification (RQ) of HLA-C/GAPDH transcripts (Quantity means). For HLA-C amplification, the forward and reverse primers 5'-

ATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCCT-3' and 5'- TCATCAGAGCCCTGGGCACTGTT-3' were used respectively. For GAPDH amplification, the forward and reverse primers 5'- GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' and 5'-CATGGGTGGAATCATATTGGA-3' were used respectively.

### **Hierarchical Clustering Analysis**

The hierarchical clustering of 32 NK cell subsets following KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2, KIR3DL1, NKG2A and CD57 markers was performed following a ward linkage using the Genesis software (24). The software is available at [www.genome.tugraz.at](http://www.genome.tugraz.at).

### **Statistical analyses**

KIR ligands, KIR genotypes, KIR motifs, KIR alleles, HLA-C expression level (MFI), HLA-C transcripts on blood cell populations, KIR<sup>+</sup> NK cells, CD107a<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> NK cells and NK cell repertoire frequencies were compared between individuals having different HLA-C allotypes with unpaired t tests or one-way ANOVA test for multiple comparisons using the GraphPad Prism v9.1.2 software (San Diego, CA, USA). Linear regressions between HLA-C transcripts and expression, CD107a<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cells and KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells were established using GraphPad Prism. P values < 0.05 were considered statistically significant.

# Results

## Linkage disequilibria between HLA-C allotypes and HLA-A and -B molecules

In this study, we hypothesized that the C1/C2 nomenclature of KIR2DL ligands has to be revisited taking into account the HLA-C polymorphism. To decipher this question, we established a cohort of homozygous HLA-C blood donors ( $n = 103$ ) including HLA-C\*02 ( $n = 4$ ), -C\*03 ( $n = 15$ ), -C\*04 ( $n = 23$ ), -C\*05 ( $n = 11$ ), -C\*06 ( $n = 7$ ), -C\*07 ( $n = 35$ ), -C\*08 ( $n = 4$ ), -C\*12 ( $n = 2$ ) and -C\*15 ( $n = 2$ ) individuals (**Table 1**). Of note, HLA-C\*03, -C\*04, -C\*05, and -C\*07 homozygous donors are the most frequent ones. Frequencies of KIR ligands as HLA-A3/A11, and Bw4+ HLA-A/-B molecules were determined in all blood donors showing a high disparity following the nature of HLA-C alleles (**Figure 1A**). C2 ligands as HLA-C\*05, -C\*06 and -C\*15 are systematically associated to Bw4+ ligands. In contrast, C1 ligands as HLA-C\*03 and -C\*07 are less frequently Bw4+ or even Bw4- as C\*08. However, HLA-C\*12 is different from the other C1 ligands as being Bw4+ (**Figure 1B**). Taking into account the combination of A3/A11+ and Bw4+ ligands, we delineate 2 groups. The first one A3/A11+ Bw4- including mainly C1 allotypes (HLA-C\*08, -C\*12 and C\*07) (**Figure 1C**) and the second one A3/A11- Bw4+ regrouping mainly C2 ligands (HLA-C\*15, -C\*06, -C\*05) (**Figure 1D**). Of note, some HLA-C\*04 donors share the A3/A11+ Bw4- profile, the hallmark of C1 ligands. Overall, 2 groups of C2+ donors can be identified: A3/A11- Bw4+ (HLA-C\*15, -C\*06, -C\*05) and A3/A11+/- Bw4+/- donors (HLA-C\*02, -C\*04) (**Figure 1E**). In parallel, 2 groups of C1+ donors can be identified on the basis of Bw4 expression: A3/A11+/- Bw4+ donors (HLA-C\*12) and A3/A11+/-Bw4<sup>-low</sup> donors (HLA-C\*03, -C\*07, -C\*08).

Otherwise, even it is not significant due to the low sample size for some HLA-C allotypes, HLA-C\*15 is associated to the AA KIR genotype whereas HLA-C\*08 and -C\*12 seem to be associated to B+ KIR genotypes (**Figure 1F**). The distribution of predominant

KIR2DL1 alleles seems to be different following HLA-C allotypes even though not significant. KIR2DL1\*003 is dominant in HLA-C\*08 donors and rare in -C\*02 and -C\*15 counterparts (**Figure 1G**). A deep analysis of the distribution of KIR2DL3 alleles between all groups following HLA-C allotypes requires a higher number of blood donors (**Figure 1H**). KIR2DS4 gene harbors different alleles, some of them being not expressed. Interestingly, we observed a significant difference of the non-expressed KIR2DS4\*006 allele distribution between HLA-C\*12 and -C\*07 or -C\*05 donors (**Figure 1I**). Finally, KIR3DL1/S1 allele distribution can be evaluated following the level expression of KIR3DL1 (null, low and high). The KIR3DL1\*002 allele (high) is more predominant in C1<sup>+</sup> donor groups although not significant difference can be highlighted due to the limited size sample for some HLA-C specificities (**Figure 1J**). Overall, linkage disequilibria between HLA class I loci lead to distinguish homozygous HLA-C blood donors harboring some specific KIR gene features which may impact on NK cell repertoire.

### **Hierarchical HLA-C expression depending on HLA-C allotypes and the cell type**

We further investigated HLA-C level expression for all HLA-C allotypes in 90 homozygous HLA-C blood donors on monocytes (CD14<sup>+</sup>), lymphocytes (CD45<sup>+</sup>), T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) and B (CD19<sup>+</sup>) lymphocytes as illustrated in **Figure 2A**. HLA-C expression level was evaluated using the combination of anti-HLA-C/HLA-E (DT9) and anti-HLA-E (3D12) mabs enabling to better target HLA-C expression level (**Figure 2B**). HLA-C expression level was higher in lymphocytes compared to monocytes (**Figure 2C**). Among lymphocytes, HLA-C was higher expressed on B compared to NK or T cells (**Figure 2D**). NK cells exhibited higher HLA-C expression compared to T cells. A hierarchical expression of HLA-C allotypes can be defined on all lymphocytes (**Figure 2E**). In particular, HLA-Cw12 and HLA-Cw6 exhibited the highest-level expressions compared to -Cw15, -Cw4,



-Cw3, -Cw2, -Cw8, -Cw5 and -Cw7 molecules and the expression of HLA-Cw4 was higher compared to HLA-Cw7 molecules. The highest-level expression of HLA-Cw12 and HLA-Cw6 and the lowest level expression of HLA-Cw7 are also observed on T, NK and B cells (**Figure 2F**). Of note, the CMV status of blood donors does not impact HLA-C expression evaluated on different blood cells and following HLA-C allotype (data not shown). Overall, our data suggest that HLA-C expression level differ depending on HLA-C specificities and blood cells.

### **Absence of correlation between HLA-C transcripts and HLA-Cw level expression in T and NK cells but not in B lymphocytes**

To unravel a potential post-transcriptional regulation of HLA-Cw molecules, we further quantify HLA-C transcripts in 90 homozygous HLA-C blood donors by using a real-time qPCR with locus specific HLA-C primers. Depending of HLA-C genes, a hierarchy of HLA-C transcript amounts was observed in PBMC (**Figure 3A**). In particular, low amounts of HLA-C\*03, -C\*05 and -C\*07 transcripts were observed whereas HLA-C\*06 and in a lesser extent -C\*04 transcripts were the most abundant compared to others (**Figure 3A**). Heterogeneous mRNA expression was observed for HLA-C\*04 donors (**Figure 3A**). Because HLA-C expression differ depending on HLA-C specificities and blood cells, we further quantity HLA-C\*03, -C\*04, -C\*05, -C\*06 and -C\*07 transcripts in sorted T, NK and B cells from homozygous HLA-C blood donors. No significant difference of HLA-C\*03, -C\*04, -C\*05, -C\*06 and -C\*07 transcript amounts were observed in sorted T, NK or B cells (data not shown). Interestingly, a positive correlation for HLA-C\*03, -C\*04, -C\*05, -C\*06 and -C\*07 specificities between HLA-C transcripts and HLA-Cw expression level was observed in sorted B cells but not in T or NK cells (**Figure 3B**) suggesting different mechanisms of post-transcriptional or -translational regulation of HLA-C expression depending on lymphoid cells.

## **Modulation of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequency and KIR2DL1 level expression by HLA-C allotypes and the KIR2DL2 gene**

We further investigated the impact of HLA-C allotypes on KIR2DL1 expression. For this, the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK cells was determined by flow cytometry as illustrated in **Figure 4A** for 72 homozygous HLA-C blood donors. No difference of frequency of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK cells was observed following HLA-C allotypes (**Figure 4B**). A large diversity was noted for each HLA-C allotype without clear association with KIR/HLA genetic markers or CMV status (data not shown). Nevertheless, the KIR2DL2 gene had a negative effect on KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK cell frequency specifically in an HLA-Cw3 environment (**Figure 4C**). In parallel, the frequency of KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cells was determined in 88 homozygous HLA-C blood donors (**Figure 4D**). NKG2A and CD57 markers were included in the analysis to refine the KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell subset impacted by the HLA-C environment. Interestingly, HLA-Cw3 and HLA-Cw7, both C1 ligands contributed to significantly increase the frequency of NKG2A<sup>+/-</sup> CD57<sup>-</sup> KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cells. Moreover, the frequency of NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cells was significantly increased in the HLA-Cw3 environment. Thus, KIR2DS1 seems to be differently expressed in these different HLA-C environments and probably favored in C1 environments and particularly with HLA-Cw3. We further evaluated the level expression of KIR2DL1 in all HLA-C environments. For this, we focused on KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK cells to determine the relative Mean Fluorescent Intensity (rMFI) compared to the isotype control as illustrated in **Figure 4E**. Indeed, C1 ligands contribute to increase the KIR2DL1 MFI compared to C2 ligands (**Figure 4F**). More specifically, HLA-Cw3 and HLA-Cw7, both C1 ligands, lead a better level expression of KIR2DL1 whatever the KIR2DL1 allele. No difference was observed between the three C2 ligands. Taken together, the HLA-Cw3 environment favors high frequencies of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK cells in the absence of KIR2DL2

expression and the level expression of KIR2DL1 is increased in HLA-Cw3 and -Cw7 compared to -Cw4, -Cw6 and -Cw5 environments.

### **KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequency depends on HLA-C allotypes and the KIR2DL2 gene**

We further investigated KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequency and KIR2DL3 level expression following the same approach here as for KIR2DL1. Thus, we focused on KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells (mainly CD56<sup>dim</sup>) then on KIR2DL3<sup>+</sup> using a combination of KIR2DL3 and KIR2DL3/S2 specific mAbs (8, 21) as illustrated in **Figure 5A**. A large diversity was noted for each HLA-C allotype (**Figure 5B**) without association with KIR/HLA genetic markers or CMV status (data not shown). Nevertheless, the KIR2DL2 gene constituted a negative effect on KIR2DL3<sup>+</sup>/S2<sup>-</sup> NK cell frequencies specifically in HLA-Cw3 and -Cw7 environments (**Figure 5C**). In parallel, the frequency of KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells was determined in 88 HLA-C blood donors. NKG2A and CD57 markers were included in the analysis to refine the KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cell subset impacted by the HLA-C environment. Interestingly, HLA-Cw3 contributed to significantly increase the frequency of NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells compared to the HLA-Cw7 allotype (**Figure 5D**). We further evaluated the level expression of KIR2DL3 from only KIR2DL3<sup>+</sup> KIR2DL2<sup>-</sup> blood donors in all HLA-C environments. For this, we focused on KIR2DL3<sup>+</sup>/S2<sup>-</sup> NK cells to determine the relative MFI compared to the KIR2DL3 isotype control as illustrated in **Figure 5E**. No difference of KIR2DL3 rMFI was observed between C1<sup>+</sup> versus C2<sup>+</sup> blood donors and following HLA-C allotypes (**Figure 5F**). Overall, HLA-Cw3 and HLA-Cw7 allotypes favor high frequencies of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells only in the absence of KIR2DL2 expression.

## **CMV status and the KIR2DL5 gene modulate the C2 ligand driven KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education**

In a recent study, we have raised the issue of C1/C2 classification for KIR NK cell education (8). To reply to this question, homozygous HLA-C blood donors constitute a useful tool as only one type of HLA-C allotype contributes to educate KIR2DL<sup>+</sup> NK cells. Thus, we firstly gated KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cells in removing those expressing receptors susceptible to skew functional analysis. ILT2, NKG2A, KIR3DL1/S1 and KIR2DL2/3/S2 were therefore excluded and activating KIR2DS1 to focus only on KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells (**Figure 6A**). The degranulation was the retained readout to evaluate the NK cell education from 90 homozygous HLA-C blood donors. Interestingly, less mature CD57<sup>-</sup> KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells harbored a higher degranulation against HLA class I deficient 221 target cells compared to mature CD57<sup>+</sup> counterparts (**Figure 6B**). Moreover, the KIR2DL1\*003 allele gained functional potential to KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells compared to KIR2DL1\*002 and \*004 alleles (**Figure 6C**). As previously described (25), C2 environment strongly participates to KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell education (**Figure 6D**). Significant differences were observed mainly between C1 (HLA-Cw3 and -Cw7) and C2 ligands (HLA-Cw2, -Cw4, -Cw5 and -Cw6). However, a large disparity exists for some HLA-C allotypes as observed for HLA-Cw3, -Cw7, -Cw6, -Cw4 and -Cw5. We noted a beneficial impact of CMV positive status and the absence of KIR2DL5 gene on the education of KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells in an HLA-Cw3 environment that does not constitute a privileged ligand to educate KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells (**Figure 6E**). In contrast, CMV status and the KIR2DL5 gene and, to a lesser extent B<sup>+</sup> KIR genotype and the KIR2DS1 gene, impair KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell education in an HLA-Cw4 environment that constitutes a C2 ligand by nature (**Figure 6F**). Finally, the nature of KIR2DL1 alleles deeply impacts KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell education with the HLA-C\*05 allotype with a better education imparted by the increased number of KIR2DL1\*003 alleles (**Figure 6G**). Obviously, more homozygous HLA-

C\*06 blood donors are needed to understand the observed disparity of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education. However, despite the high number of homozygous HLA-C\*07 blood donors, we cannot identify genetic KIR/HLA markers potentially implicated in the modulation of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education. Overall, CMV status, the KIR2DL5 gene, the nature of KIR2DL1 alleles modulate the C2 ligands driven KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education and contribute to educate KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells with the HLA-Cw3 allotype.

### **The C1/C2 nomenclature does not fulfil all criteria to predict KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education**

We further investigated *ex vivo* KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell degranulation following the same approach here as for KIR2DL1 from 86 homozygous HLA-C blood donors. Thus, we gated KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells in removing those expressing receptors susceptible to skew functional analysis. ILT2, NKG2A, KIR3DL1/S1 and KIR2DL1/S1 were excluded to define KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell subset. Then, the combination of KIR2DL2/3/S2 and KIR2DL3/S2 specific mAbs (21) was used to focus only KIR2DL2<sup>+</sup> 2DL3/S2<sup>-</sup> NK cells for KIR2DL2<sup>+</sup> blood donors and KIR2DL2/S2<sup>-</sup> 2DL3<sup>+</sup> NK cells for KIR2DL2/S2<sup>-</sup> blood donors (**Figure 7A**). Interestingly, less mature CD57<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells harbored a higher degranulation against HLA class I deficient 221 target cells compared to mature CD57<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> counterparts (**Figure 7B**). The nature of KIR2DL2/3 alleles does not impact KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK degranulation (data not shown). C1 environment participates to KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell education (**Figure 7C**). However, the limit between educated and uneducated KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells is difficult to discern due to the large disparity between all HLA-C allotypes and notably for HLA-C\*03, -C\*07, -C\*02, -C\*06, -C\*04 and -C\*05 donors (**Figure 7C**). No significant difference of KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation was observed between HLA-C allotypes. Despite the high number of HLA-C\*07

blood donors, we notified only the nature of KIR2DL2 alleles that deeply impacts KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education within this allotype with a better education imparted by the KIR2DL2\*003 allele (**Figure 7D**). Obviously, others parameters implicated in the modulation of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education has to be identified with the HLA-Cw7 environment. The absence of KIR2DL5 gene and the presence of telAA motifs contribute to favor KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw3 environment (**Figure 7E**). Moreover, the absence of HLA-A3/A11 molecules is linked to an impressive KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw2 environment that does not constitute a privileged HLA-C ligand to educate KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK compartment (**Figure 7F**). Finally, HLA-B molecules with a serologic Bw4 motif participate to efficient KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw4 environment that does not constitute again a privileged HLA-C ligand to educate KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK compartment (**Figure 7G**). More HLA-C\*06 blood donors are needed to understand the observed disparity of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education within this allotype. A positive correlation between CD107a<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell frequencies was observed only in HLA-C\*03, -C\*07 but not in -C\*04, -C\*05 and -C\*06 blood donors (**Figure 7H**). Overall, the C1/C2 nomenclature does not fulfill all criteria to predict KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education.

### **Structural dichotomy between KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell compartments**

We have recently shown that KIR/HLA genetic markers and the CMV status channel the phenotypic structuration of the NK cell repertoire in healthy blood donors mainly HLA-C heterozygous. However, this previous study has only included KIR2DL2/3 as representative KIR. Thus, we further defined NK cell subsets according to the NK cell differentiation model (KIR, NKG2A and CD57) previously described (26, 27) in including main KIR (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 and KIR3DL1) which recognize C2, C1 and Bw4 ligands respectively. The frequency of 32 NK cell subsets following these markers was determined by flow cytometry.

A first level based on NKG2A, CD57 and KIR lead to identify 8 NK cell subsets (**Supplemental Figure 1A**). A second level based on KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 and KIR3DL1 lead to identify 7 KIR<sup>+</sup> NK cell subsets (**Supplemental Figure 1B**). Thus, 32 NK cell subsets can be identified (4 KIR<sup>-</sup> and 28 KIR<sup>+</sup> NK cell subsets) and analyzed from the cohort of 73 homozygous HLA-C blood donors. Hierarchical clustering analysis was performed following a ward linkage using Genesis software leading to generate a clustering of both NK cell subsets and blood donors (**Figure 8**). Interestingly, three main clusters of NK cell subsets were defined with a strong phenotypic signature. The first one clusters NKG2A<sup>-</sup> NK cells expressing or not CD57, KIR2DL1 and KIR2DL3 (**Figure 8A**). The second one clusters KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells expressing or not CD57 or CD57 and NKG2A (**Figure 8B**). The last one clusters NKG2A<sup>+</sup> NK cells expressing or not CD57, KIR2DL1 and KIR2DL3 (**Figure 8C**). In parallel, six clusters of homozygous HLA-C blood donors were defined (**Figure 8D**). Overall, this clustering analysis based on the frequency of NK cells reveals firstly a structural dichotomy between KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell compartments.

### **Main profiles of NK cell repertoire following KIR/HLA genetic markers**

The hierarchical classification of NK cell subset frequencies defined in all investigated homozygous HLA-C blood donors revealed a predominance of KIR<sup>-</sup> NK cell subsets: NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>, NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>, NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> and NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> cell subsets successively (**Figure 9A**). In parallel, the seventh KIR<sup>+</sup> NK cells (frequencies > 2.4%) are mainly NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> (**Figure 9A**). Among KIR<sup>+</sup> NK cells, NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> and KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell subsets were the most represented before KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell subsets. However, a large disparity exists as illustrated by the standard deviation. Thus, we further evaluated the representation of the main NK cell subsets in the 6 clusters of homozygous HLA-C blood donors established by a hierarchical clustering (**Figure 9B and supplemental Figure 2**). Based

on the frequencies of each NK cell subset and their significant representation in a given cluster, a profile of NK cell repertoire can be drawn for each cluster of homozygous HLA-C donors (**Figure 9C**). Thus, the first cluster is marked by a predominance of CD57<sup>+</sup> NK cell subsets with all KIR combinations expressed on NK cells in the NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> subset and mainly KIR2DL2/3<sup>+</sup> 2DL1<sup>+/-</sup> in the NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> subset. The second cluster is characterized by NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> NK subsets. The third cluster is marked by the absence of CD57 on NK cell subsets with a predominance of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell subset in association with NKG2A. The fourth cluster harbors mainly KIR3DL1 in association with NKG2A or CD57. The fifth cluster is characterized by the absence of NKG2A on NK cells and a predominant expression of KIR3DL1. The last cluster is characterized by a frequent expression of KIR2DL1. A genetic profile emerges for each cluster of homozygous HLA-C blood donors highlighting the importance of KIR genotypes/motifs and HLA class I environment (**Figure 9D**). Interestingly, KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell subsets were predominant in the cluster 1 which includes mainly C1 blood donors. Inversely, KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell subsets are predominant in the clusters 5 and 6 which group C2 blood donors. Otherwise, KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells subsets were predominant in the clusters 4 and 5 which group Bw4<sup>+</sup> blood donors. Overall, the presence of KIR ligands imprints the expansion of cognate KIR<sup>+</sup> NK cell subsets. Of note, the dimorphism -21M/T in HLA-B genes does not impact the donor clustering. Only the first cluster harbors more -21M HLA-B encoded molecules. However, this association is probably due to LD between HLA-B and HLA-C alleles.



## Discussion

On the basis of HLA-A3/A11 and Bw4 molecules, HLA-C allotypes can be clustered in 4 groups. The HLA-Cw12 allotype is strongly linked to Bw4<sup>+</sup> molecules in contrast to other C1 ligands (HLA-Cw3, -Cw7 and -Cw8). These observations are mainly linked to known HLA-C/B linkage disequilibria (LD) reported in European populations (<http://allelefrequencies.net>). Of note, HLA-C\*12:03 blood donors are all HLA-B\*38:01 (Bw4<sup>+</sup>). HLA-C\*03:03/03:04, and -C\*07:01/07:02 blood donors are predominantly HLA-B\*15:01/B\*40:01 and -B\*07:02/B\*08:01, all Bw4<sup>-</sup>, respectively. HLA-Cw12 is also the highest HLA-C molecule expressed on lymphocytes although other C1 ligands are poorly expressed. HLA-Cw3 and HLA-Cw7 allotypes are A3/A11<sup>+/-</sup>Bw4<sup>-/low</sup> C1 and differently expressed on B lymphocytes. These observations can explain the association of a particular HLA-C allotype in a pathologic context. It has been recently shown that HLA-Cw7 was overrepresented among patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) compared with smokers with normal pulmonary function, whereas HLA-C\*12 was conversely underrepresented among the patients with COPD (28). HLA-C\*15, -C\*06 and -C\*05 donors are rather A3/A11<sup>-</sup> Bw4<sup>+</sup> in contrast to HLA-C\*02 and -C\*04 donors that are A3/A11<sup>+/-</sup> Bw4<sup>+/-</sup>. Once again, HLA-C/B LD support these observations since HLA-C\*15:02, -C\*06:02 and -C\*05:01 alleles are linked to HLA-B\*51:01, -B\*37:01/B\*57:01 and -B\*44:02 alleles respectively.

The hierarchy of HLA-C expression according to HLA-C specificities we reported is concordant with previous studies in which HLA-C expression, measured using DT9 binding, was investigated only on CD3<sup>+</sup> T cells in heterozygous HLA-C individuals and mainly in an HIV context (10, 11, 29). Indeed, we point out that expression of HLA-C molecules also varies in B, T or NK cells. We reported a highest expression of HLA-C molecules on B cells concordant with a previous study including a limited sample size of control individuals and

leukemic patients 6 months after HSCT (30). The high variability of HLA-C transcripts observed in total lymphocytes is concordant with those reported in heterozygous HLA-C individuals (15). Interestingly, we reported a positive correlation between HLA-C transcripts and HLA-Cw expression for HLA-Cw3, -Cw4, -Cw5, -Cw6 and -Cw7 allotypes in B lymphocytes. In contrast, the absence of correlation between HLA-C transcripts and HLA-Cw expression in T and NK cells suggest post-transcriptional and/or post-translational modifications. This is of particular interest since an NK-specific system regulating HLA-C expression involved in both NK cell development and function has been described (31). One cannot exclude that the high expression of HLA-Cw6 and HLA-Cw12 compared with other allotypes observed in NK cells could be due to alternative mRNA splicing or differences in the peptide binding groove (32, 33). Of note, we did not observe an impact of CMV on HLA-C expression as previously documented by Amir et al. (30) due probably by the small number of donors investigated in this previous study.

We confirmed the deleterious impact of the KIR2DL2 gene on the frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells in an HLA-Cw3 environment (8). Similarly, we confirmed the deleterious impact of the KIR2DL2 gene on the KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequency in a C1 environment and mainly in an HLA-Cw7 environment. Moreover, the KIR2DL1 level expression is higher in C1 than C2 blood donors and particularly in HLA-Cw3 and -Cw7 contexts. This observation nuances those showing that the co-expression of the HLA-C2 ligand diminishes the cell surface density of KIR2DL1 on NK cells instead of impacting the respective frequencies of KIR2DL1-expressing cells within the NK repertoire (34).

The KIR2DL1\*003 allotype gained functional potential to KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells compared to KIR2DL1\*002 and \*004 allotypes. These observations are in accordance with our previous results (8) showing a better functional interaction between the KIR2DL1\*003 allotypes and C2 ligands compared with KIR2DL1\*002 and \*004 allotypes. This gain is also

boosted by the specificity of HLA-C allotypes. Indeed, 2 copies of KIR2DL1\*003 alleles confer a better KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education only in an HLA-Cw5 environment. In contrast, the nature of KIR2DL2/3 allele was preponderant only in an HLA-Cw7 environment with a functional gain with the KIR2DL2\*003 allotype. The low impact of allelic KIR2DL2/3 polymorphism on KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education can be explained by the lower strength of the KIR2DL2/3 interactions with HLA-Cw molecules.

We have previously observed a lower inhibition of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell degranulation with the 221-HLA-Cw6 cell line in comparison to 221-HLA-Cw2 and -Cw4 target cells (8). The high membrane expression of HLA-Cw6 compared to other HLA-C allotypes can explain that HLA-Cw6 constitutes a ligand to functionally educate KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells. However, more homozygous HLA-C\*06 blood donors are needed to understand the observed disparity of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education. The same analysis can be drawn for the HLA-Cw15 allotype which harbors a lower inhibitory interaction with KIR2DL1 (8) and seems to be better expressed than HLA-Cw2 and -Cw4 molecules.

The absence of the KIR2DL5 gene was particularly beneficial to improve the KIR2DL1 and KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in HLA-Cw3 and -Cw4 environments respectively. Recent observations in HSCT corroborate the beneficial impact of CenB02 genotype marked by the absence of KIR2DL5 in comparison with CenB01 (35). Moreover, the KIR2DL5 gene is associated to deleterious effects in bladder cancers (36). In contrast, Weisdorf *et al.* reports that both KIR2DS3 and 2DL5 genes, present in CenB01 donors, provide protection against relapse after reduced intensity conditioning HSCT only in AML recipients having C1<sup>+</sup> ligands (37). These conflicting data probably linked to the conditioning regimen and the poor knowledge on KIR2DL5 ligands complexify the biological significance of our observations. In any event, it would be essential to integrate the KIR2DL5 gene in future investigations on the implication of

KIR markers on the structuration of the NK repertoire in both physiological and clinical contexts.

Slowly cycling sorted KIR<sup>+</sup> NK cells with an induced CD57 phenotype display increased functional potential (27). However, in our study, we observed a better *ex vivo* degranulation of CD57<sup>-</sup> compared with CD57<sup>+</sup> NK cells for KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell subsets. CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients (38) and it is associated to CD57 expression on NK cells. However, no association can be done with the CMV status in our cohort. It has been shown that the differentiation process based on NKG2A, KIR and CD57 is uncoupled from NK cell education (26). Indeed, even CD57<sup>+</sup> is associated with mature NK cell stage, it's not induced expression on educated KIR<sup>+</sup> NK cells do not corroborate with a better cytotoxic potential. Thus, the CD57 pattern as mature stage of NK cell differentiation considered as the most cytotoxic stage should be moderated.

In our study, we described an intriguing boost of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education by CMV in an HLA-Cw3 environment although this allotype is not a C2 ligand. In contrast, the CMV status limits KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw4 environment although this allotype is a C2 ligand. The CMV down-regulates HLA class I molecules on infected cells to escape T lymphocyte recognition. It is particularly clear for HLA-A and -B restricted T lymphocytes. However, this escape mechanism seems to be selective and less stringent for HLA-C molecules. HLA-C is unaffected by viral-induced endocytosis, and this may explain the crucial role that HLA-C plays in protection from HIV and other viral infections such HCV (10, 11, 39). Interestingly, Ameres *et al.* have shown an allotype-specific viral immunoevasion (40) with a resistance of HLA-C\*0702 to viral immunoevasins US2 and US11. However, no investigation has been driven to evaluate precisely this selective immunoevasion depending on HLA-C allotypes. Moreover, peptide loaded on HLA class I molecules modulate CMV immunoevasion (41). It is conceivable that CMV immunoevasins impact differently HLA-Cw3 and HLA-Cw4

molecules involving or not the nature of loaded peptides. This question should be raised to better understand molecular mechanisms regulating the close relationship between CMV and NK cell education.

Both HLA-Cw2 and HLA-Cw4 constitute C2<sup>+</sup> ligands clustered in the A3/A11<sup>+/-</sup> Bw4<sup>+/-</sup> group and present a similar level of membrane expression. Interestingly, the absence of HLA-A3/A11 molecules is linked to an impressive KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw2 environment which does not constitute a privileged HLA-C ligand to educate KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK compartment. Similarly, HLA-B molecules with a serologic Bw4 motif participate to an efficient KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education in an HLA-Cw4 environment which does not constitute again a privileged HLA-C ligand to educate KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK compartment. In these two HLA-C contexts, other KIR ligands such as HLA-A3/A11 and Bw4 appear to contribute to KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education by an unknown mechanism. In our approach, we excluded KIR3DL1/S1 receptors but we did not dismiss other inhibitory KIR as KIR3DL2, KIR2DL4 or KIR2DL5. Thus, we cannot discount the implication of other KIR in this education mechanism.

The diversity of the NK cell repertoire is particularly large with each NK cell subset harboring a specific transcriptomic signature as recently confirmed by single-cell RNA sequencing (42). In this present study, the hierarchical clustering analysis performed from 32 NK cell subsets and 73 homozygous HLA-C blood donors led us to divide the NK repertoire in 3 main clusters defined by the expression or not of NKG2A. Moreover, our study reveals a structural dichotomy between KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell compartments. Taking together, we can identify 2 clusters marked by a preponderant representation of KIR2DL1/3 on KIR<sup>+</sup> NK cells, the first cluster is marked by the absence of NKG2A expression and the second one is marked by the NKG2A expression on all NK cells. The last cluster is marked by the KIR3DL1 expression on all NK cell subsets. The clustering of homozygous HLA-C blood donors steers the understanding of genetic rules imprinting the structuration of the NK cell

repertoire. Indeed, KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell subsets are favored by C1 environments. Inversely, KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell subsets are predominant in C2 blood donors. Otherwise, KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells subsets are predominant in Bw4<sup>+</sup> blood donors. These NK cell profiles linked to HLA markers shed in light a functional driving of the phenotypic NK cell structuration as recently observed in Ameridian populations (43). Overall, the presence of KIR ligands imprints the expansion of cognate KIR<sup>+</sup> NK cell subsets. However, the identification of genetic KIR/HLA markers susceptible to drive the NK cell differentiation following NKG2A, CD57 and KIR expression appears more complicated.

Recently, a genetic polymorphism at position -21 of HLA-B genes, which influences the supply of HLA-E binding peptides and the availability of HLA-E to recognize the NKG2A inhibitory NK cell receptor, was shown to have a marked influence on NK cell functionality in healthy CMV seronegative Caucasian individuals. In this study, -21 methionine (M)-expressing alleles supplying HLA-E binding peptides were poor ligands for inhibitory KIRs, and a bias to NKG2A-mediated education of functionally-potent NK cells was observed (44). The -21M/T dimorphism has been spotlighted to explain the prevalence of NKG2A<sup>+</sup> NK cells in contrast to KIR<sup>+</sup> NK cells (45). However, this -21M/T dimorphism in HLA-B genes does not impact at all the donor clustering found in our study and cannot explain the predominance of NKG2A<sup>+</sup> or KIR<sup>+</sup> NK cells in accordance with a recent study of Parham's group (35) and Norman's group (46). The absence of influence of -21M/T dimorphism in HLA-B genes is probably due to the fact that the peptide loaded on HLA-E molecule can derive from HLA-B molecules but also HLA-A, -C and -G molecules. Indeed, different HLA class I molecules can supply a peptide leading the expression of HLA-E and its interaction with CD94/NKG2A homodimer. Otherwise, CMV status did not constitute a marker driving the structuration of the NK cell repertoire in our study. It is probably because the NKG2C marker was not included in our unsupervised analysis.

Even mainlines are defined to understand the rules of the structuration of the NK repertoire, results of this present study highlight the complexity of molecular KIR/HLA interactions that integrate not only genetic and allelic KIR and HLA polymorphisms but also probably loaded peptides.

## **Competing interests**

The authors declared that they have no competing interests.

## **Funding**

This work was supported by EFS Centre-Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated Hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET), Société Francophone d’Histocompatibilité et d’Immunogénétique (SFHI), Etablissement Français du Sang (EFS), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF), Tous avec Fabien, La Ligue contre le Cancer and Agence de la Biomédecine (ABM). LD is a PhD student supported by la Région Pays de la Loire/EFS Centre Pays de la Loire (N°2018-09766).

## **Acknowledgements**

We are grateful to all blood donors and corresponding blood collection departments from Nantes, Angers, Tours (EFS CPDL, France) for participating in this study. We also thank Dr M. Alizadeh (Blood bank, Rennes, France) for his help in the update of the KIR library for KIR allele assignment using the Profiler software.



## References

1. Ljunggren, H. G., and K. Kärre. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162: 1745–1759.
2. Mandelboim, O., H. T. Reyburn, M. Valés-Gómez, L. Pazmany, M. Colonna, G. Borsellino, and J. L. Strominger. 1996. Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules. *J. Exp. Med.* 184: 913–922.
3. Gumperz, J. E., V. Litwin, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and P. Parham. 1995. 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: 1133–1144.
4. Stern, M., L. Ruggeri, M. Capanni, A. Mancusi, and A. Velardi. 2008. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 112: 708–710.
5. Döhning, C., D. Scheidegger, J. Samaridis, M. Cella, and M. Colonna. 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156: 3098–3101.
6. Pende, D., R. Biassoni, C. Cantoni, S. Verdiani, M. Falco, C. di Donato, L. Accame, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta. 1996. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J. Exp. Med.* 184: 505–518.
7. Makanga, D. R., F. Da Rin de Lorenzo, G. David, C. Willem, L. Dubreuil, N. Legrand, T. Guillaume, P. Peterlin, A. Lebourgeois, M. C. Béné, A. Garnier, P. Chevallier, K. Gendzekhadze, A. Cesbron, K. Gagne, B. Clemenceau, and C. Retière. 2020. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers* 12: 1927.
8. Dubreuil, L., B. Maniangu, P. Chevallier, A. Quémener, N. Legrand, M. C. Béné, C. Willem, G. David, M. Alizadeh, D. R. Makanga, A. Cesbron, K. Gendzekhadze, K. Gagne, and C. Retière. 2020. Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers* 12: 3595.
9. Apps, R., Z. Meng, G. Q. Del Prete, J. D. Lifson, M. Zhou, and M. Carrington. 2015. Relative expression levels of the HLA class-I proteins in normal and HIV-infected cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 194: 3594–3600.
10. Apps, R., Y. Qi, J. M. Carlson, H. Chen, X. Gao, R. Thomas, Y. Yuki, G. Q. Del Prete, P. Goulder, Z. L. Brumme, C. J. Brumme, M. John, S. Mallal, G. Nelson, R. Bosch, D. Heckerman, J. L. Stein, K. A. Soderberg, M. A. Moody, T. N. Denny, X. Zeng, J. Fang, A. Moffett, J. D. Lifson, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, J. Fellay, P. McLaren, S. G. Deeks, F. Pereyra, B. Walker, N. L. Michael, A. Weintrob, S. Wolinsky, W. Liao, and M. Carrington. 2013. Influence of HLA-C expression level on HIV control. *Science* 340: 87–91.
11. Thomas, R., R. Apps, Y. Qi, X. Gao, V. Male, C. O’Uigin, G. O’Connor, D. Ge, J. Fellay, J. N. Martin, J. Margolick, J. J. Goedert, S. Buchbinder, G. D. Kirk, M. P. Martin, A. Telenti, S. G. Deeks, B. D. Walker, D. Goldstein, D. W. McVicar, A. Moffett, and M. Carrington. 2009. HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat. Genet.* 41: 1290–1294.
12. Kulkarni, S., R. Savan, Y. Qi, X. Gao, Y. Yuki, S. E. Bass, M. P. Martin, P. Hunt, S. G. Deeks, A. Telenti, F. Pereyra, D. Goldstein, S. Wolinsky, B. Walker, H. A. Young, and M. Carrington. 2011. Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature* 472: 495–498.

13. Vince, N., H. Li, V. Ramsuran, V. Naranbhai, F.-M. Duh, B. P. Fairfax, B. Saleh, J. C. Knight, S. K. Anderson, and M. Carrington. 2016. HLA-C Level Is Regulated by a Polymorphic Oct1 Binding Site in the HLA-C Promoter Region. *Am. J. Hum. Genet.* 99: 1353–1358.
14. Kaur, G., S. Gras, J. I. Mobbs, J. P. Vivian, A. Cortes, T. Barber, S. B. Kuttikkatte, L. T. Jensen, K. E. Attfield, C. A. Dendrou, M. Carrington, G. McVean, A. W. Purcell, J. Rossjohn, and L. Fugger. 2017. Structural and regulatory diversity shape HLA-C protein expression levels. *Nat. Commun.* 8: 15924.
15. Bettens, F., L. Brunet, and J.-M. Tiercy. 2014. High-allelic variability in HLA-C mRNA expression: association with HLA-extended haplotypes. *Genes Immun.* 15: 176–181.
16. Ramsuran, V., P. G. Hernández-Sánchez, C. O’huigin, G. Sharma, N. Spence, D. G. Augusto, X. Gao, C. A. García-Sepúlveda, G. Kaur, N. K. Mehra, and M. Carrington. 2017. Sequence and Phylogenetic Analysis of the Untranslated Promoter Regions for HLA Class I Genes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198: 2320–2329.
17. Carey, B. S., K. V. Poulton, and A. Poles. 2019. Factors affecting HLA expression: A review. *Int. J. Immunogenet.* 46: 307–320.
18. Brodin, P., K. Kärre, and P. Höglund. 2009. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol.* 30: 143–149.
19. Brodin, P., T. Lakshmikanth, S. Johansson, K. Kärre, and P. Höglund. 2009. The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. *Blood* 113: 2434–2441.
20. Sim, M. J. W., J. Stowell, R. Sergeant, D. M. Altmann, E. O. Long, and R. J. Boyton. 2016. KIR2DL3 and KIR2DL1 show similar impact on licensing of human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 46: 185–191.
21. David, G., M. Morvan, K. Gagne, N. Kerdudou, C. Willem, A. Devys, M. Bonneville, G. Folléa, J.-D. Bignon, and C. Retière. 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128: 172–184.
22. Sun, J. Y., L. Gaidulis, M. M. Miller, R. M. Goto, R. Rodriguez, S. J. Forman, and D. Senitzer. 2004. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* 64: 462–468.
23. Maniangou, B., N. Legrand, M. Alizadeh, U. Guyet, C. Willem, G. David, E. Charpentier, A. Walencik, C. Retière, and K. Gagne. 2017. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front. Immunol.* 8.
24. Sturn, A., J. Quackenbush, and Z. Trajanoski. 2002. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 18: 207–208.
25. Anfossi, N., P. André, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetyneck, C. A. Stewart, V. Bresò, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagné, S. Ugolini, and E. Vivier. 2006. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 25: 331–342.
26. Björkström, N. K., P. Riese, F. Heuts, S. Andersson, C. Fauriat, M. A. Ivarsson, A. T. Björklund, M. Flodström-Tullberg, J. Michaëlsson, M. E. Rottenberg, C. A. Guzmán, H.-G. Ljunggren, and K.-J. Malmberg. 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116: 3853–3864.
27. Pfefferle, A., B. Jacobs, H. Netskar, E. H. Ask, S. Lorenz, T. Clancy, J. P. Goodridge, E. Sohlberg, and K.-J. Malmberg. 2019. Intra-lineage Plasticity and Functional Reprogramming Maintain Natural Killer Cell Repertoire Diversity. *Cell Rep.* 29: 2284-2294.e4.
28. Mkorombindo, T., T. K. Tran-Nguyen, K. Yuan, Y. Zhang, J. Xue, G. J. Criner, Y.-I. Kim, J. M. Pilewski, A. Gaggar, M. H. Cho, F. C. Sciurba, and S. R. Duncan. 2021. HLA-C and KIR permutations influence chronic obstructive pulmonary disease risk. *JCI Insight* 6: e150187.

29. Bachtel, N. D., G. Umvilighozo, S. Pickering, T. M. Mota, H. Liang, G. Q. D. Prete, P. Chatterjee, G. Q. Lee, R. Thomas, M. A. Brockman, S. Neil, M. Carrington, B. Bwana, D. R. Bangsberg, J. N. Martin, E. G. Kallas, C. S. Donini, N. B. Cerqueira, U. T. O'Doherty, B. H. Hahn, R. B. Jones, Z. L. Brumme, D. F. Nixon, and R. Appas. 2018. HLA-C downregulation by HIV-1 adapts to host HLA genotype. *PLoS Pathog.* 14: e1007257.
30. Horowitz, A., L. A. Guethlein, N. Nemat-Gorgani, P. J. Norman, S. Cooley, J. S. Miller, and P. Parham. 2015. Regulation of Adaptive NK Cells and CD8 T Cells by HLA-C Correlates with Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and with Cytomegalovirus Reactivation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 195: 4524–4536.
31. Li, H., M. A. Ivarsson, V. E. Walker-Sperling, J. Subleski, J. K. Johnson, P. W. Wright, M. Carrington, N. K. Björkström, D. W. McVicar, and S. K. Anderson. 2018. Identification of an elaborate NK-specific system regulating HLA-C expression. *PLoS Genet.* 14.
32. Goodson-Gregg, F. J., S. A. Krepel, and S. K. Anderson. 2020. Tuning of human NK cells by endogenous HLA-C expression. *Immunogenetics* 72: 205–215.
33. Goodson-Gregg, F. J., B. Rothbard, A. Zhang, P. W. Wright, H. Li, V. E. Walker-Sperling, M. Carrington, and S. K. Anderson. 2020. Tuning of NK-Specific HLA-C Expression by Alternative mRNA Splicing. *Front. Immunol.* 10.
34. Le Luduec, J.-B., J. E. Boudreau, J. C. Freiberg, and K. C. Hsu. 2019. Novel Approach to Cell Surface Discrimination Between KIR2DL1 Subtypes and KIR2DS1 Identifies Hierarchies in NK Repertoire, Education, and Tolerance. *Front. Immunol.* 10.
35. Guethlein, L. A., N. Beyzaie, N. Nemat-Gorgani, T. Wang, V. Ramesh, W. M. Marin, J. A. Hollenbach, J. Schetelig, S. R. Spellman, S. G. E. Marsh, S. Cooley, D. J. Weisdorf, P. J. Norman, J. S. Miller, and P. Parham. 2021. Following Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia, Donor KIR Cen B02 Better Protects against Relapse than KIR Cen B01. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* j2100119.
36. Guillamón, C. F., L. Gimeno, G. Server, M. V. Martínez-Sánchez, J. F. Escudero, P. López-Cubillana, J. Cabezas-Herrera, J. A. Campillo, D. J. Abellan, J. Martínez-García, J. Martínez-Escribano, B. Ferri, M. R. López-Álvarez, C. Moreno-Alarcón, M. R. Moya-Quiles, M. Muro, and A. Minguela. 2021. Immunological Risk Stratification of Bladder Cancer Based on Peripheral Blood Natural Killer Cell Biomarkers. *Eur. Urol. Oncol.* 4: 246–255.
37. Weisdorf, D., S. Cooley, T. Wang, E. Trachtenberg, C. Vierra-Green, S. Spellman, J. A. Sees, A. Spahn, J. Vogel, T. A. Fehniger, A. E. Woolfrey, S. M. Devine, M. Ross, E. K. Waller, R. M. Sobecks, J. McGuirk, B. Oran, S. S. Farag, T. Shore, K. Van Besien, S. G. E. Marsh, L. A. Guethlein, P. Parham, and J. S. Miller. 2020. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv.* 4: 740–754.
38. Della Chiesa, M., L. Muccio, and A. Moretta. 2013. CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients. *Immunol. Lett.* 155: 11–13.
39. Legrand, N., G. David, A. Rodallec, A. Gaultier, D. Salmon, A. Cesbron, L. Wittkop, F. Raffi, K. Gendzekhadze, C. Retière, C. Allavena, and K. Gagne. 2021. Influence of HLA-C environment on the spontaneous clearance of hepatitis C in European HIV-HCV co-infected individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 204: 107–124.
40. Ameres, S., J. Mautner, F. Schlott, M. Neuenhahn, D. H. Busch, B. Plachter, and A. Moosmann. 2013. Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS Pathog.* 9: e1003383.
41. Holtappels, R., D. Thomas, and M. J. Reddehase. 2009. The efficacy of antigen processing is critical for protection against cytomegalovirus disease in the presence of viral immune evasion proteins. *J. Virol.* 83: 9611–9615.
42. Smith, S. L., P. R. Kennedy, K. B. Stacey, J. D. Worboys, A. Yarwood, S. Seo, E. H. Solloa, B. Mistretta, S. S. Chatterjee, P. Gunaratne, K. Allette, Y.-C. Wang, M. L. Smith, R. Sebra, E.

- M. Mace, A. Horowitz, W. Thomson, P. Martin, S. Eyre, and D. M. Davis. 2020. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Adv.* 4: 1388–1406.
43. Vargas, L. de B., M. H. Beltrame, B. Ho, W. M. Marin, R. Dandekar, G. Montero-Martín, M. A. Fernández-Viña, A. M. Hurtado, K. R. Hill, L. T. Tsuneto, M. H. Hutz, F. M. Salzano, M. L. Petzl-Erler, J. A. Hollenbach, and D. G. Augusto. 2021. Remarkably low KIR and HLA diversity in Amerindians reveals signatures of strong purifying selection shaping the centromeric KIR region. *Mol. Biol. Evol.* msab298.
44. Cubero, E. M., A. Ogbe, I. Pedroza-Pacheco, M. S. Cohen, B. F. Haynes, P. Borrow, and D. Peppas. 2020. Subordinate Effect of -21M HLA-B Dimorphism on NK Cell Repertoire Diversity and Function in HIV-1 Infected Individuals of African Origin. *Front. Immunol.* 11: 156.
45. Horowitz, A., Z. Djaoud, N. Nemat-Gorgani, J. Blokhuis, H. G. Hilton, V. Béziat, K.-J. Malmberg, P. J. Norman, L. A. Guethlein, and P. Parham. 2016. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci. Immunol.* 1: eaag1672.
46. Deng, Z., J. Zhao, S. Cai, Y. Qi, Q. Yu, M. P. Martin, X. Gao, R. Chen, J. Zhuo, J. Zhen, M. Zhang, G. Zhang, L. He, H. Zou, L. Lu, W. Zhu, W. Hong, M. Carrington, and P. J. Norman. 2019. Natural Killer Cells Offer Differential Protection From Leukemia in Chinese Southern Han. *Front. Immunol.* 10: 1646.

## Figure legends

**Figure 1: Linkage disequilibria between HLA-C allotypes and HLA-A and -B molecules.** (A) Dot plots illustrating frequencies of HLA-A3/A11, Bw4 (HLA-A and/or HLA-B), A3/A11<sup>+</sup> Bw4<sup>+</sup>, A3/A11<sup>+</sup> Bw4<sup>-</sup> and A3/A11<sup>-</sup> Bw4<sup>+</sup> in homozygous HLA-C blood donors (N=103). HLA-C\*02 (N=4), -C\*03 (N=15), -C\*04 (N=23), -C\*05 (N=11), -C\*06 (N=7), -C\*07 (N=35), -C\*08 (N=4), -C\*12 (N=2) and -C\*15 (N=2) donors were identified with specific colors. Each HLA-C allotype is represented by a color (graduation of red for C1 ligands and graduation of blue for C2 ligands) as indicated on the figure. Histograms showing (B) the frequencies of Bw4<sup>+</sup>, (C) A3/A11<sup>+</sup>/Bw4<sup>-</sup> and (D) A3/A11<sup>-</sup>/Bw4<sup>+</sup> in 103 homozygous HLA-C blood donors. (E) Plots illustrating the combination of A3/A11 and Bw4 molecules delimiting 4 groups of homozygous HLA-C blood donors. Dot plots illustrating (F) frequencies of AA KIR genotype, centromeric (cenAA) and telomeric (telAA) motifs, frequencies of main (G) KIR2DL1 alleles, (H) KIR2DL3 alleles, (I) KIR2DS4 and specific KIR2DS4\*006 and (J) KIR3DL1/S1 alleles following HLA-C allotypes. Frequencies between HLA-C allotypes were established using one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

**Figure 2: Hierarchical HLA-C expression depending on HLA-C allotypes and the cell type.** (A) Density plots illustrating the cell strategy to target monocytes (CD14<sup>+</sup>), lymphocytes (CD45<sup>+</sup>), T cells (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>), NK cells (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>) and B cells (CD19<sup>+</sup>). (B) Histograms illustrating the mean fluorescence intensity (MFI) of HLA-C molecules evaluated on all lymphocytes using the anti-HLA-C/HLA-E specific mAb (DT9) alone (in blue) or in combination with the anti-HLA-E specific mAb (3D12) (incubation of both Mabs in red or incubation of 3D12 first followed by DT9 in yellow). Isotype control is represented in grey. The relative MFI (rMFI) of HLA-C molecules representing the difference of HLA-C MFI on

the isotype control MFI in homozygous HLA-C blood donors in (C) monocytes (n=80), lymphocytes (n=84), (D) T cells (n=84), NK cells (n=84) and B cells (n=84). Dot plots showing the rMFI of HLA-C molecules on (E) lymphocytes and (F) T, NK and B cells following HLA-C allotypes (Cw7 n=29, Cw5 n=10, Cw8 n=4, Cw2 n=3, Cw3 n=12, Cw4 n=19, Cw15 n=2, Cw6 n=6 and Cw12 n=2). Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established using one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

**Figure 3: Absence of correlation between HLA-C transcripts and HLA-Cw level expression in T and NK cells but not in B lymphocytes.** Relative Quantification (RQ) of HLA-C transcripts representing the ratio of the quantity means of HLA-C on the GAPDH control transcripts in total lymphocytes from homozygous HLA-C\*07 (n=30), -C\*03 (n=12), -C\*05 (n=10), -C\*12 (n=2), -C\*08 (n=3), -C\*02 (n=3), -C\*15 (n=2), -C\*04 (n=21) and -C\*06 (n=6) blood donors (A). Linear regressions established between RQ of HLA-C transcripts and the relative MFI of HLA-C molecules for T, NK and B cells from homozygous HLA-C\*07 (n=7), -C\*03 (n=4), -C\*05 (n=6), -C\*04 (n=8) and -C\*06 (n=4) blood donors (B). Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

**Figure 4: Modulation of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell frequency and KIR2DL1 level expression by HLA-C allotypes and the KIR2DL2 gene.** (A) Density plot illustrating the cell strategy to target KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>) cells and KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> NK (CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>) cells by combining anti-KIR2DL1/S1 (EB6) and a specific anti-KIR2DL1 mAbs. Dot plots showing KIR2DL1<sup>+</sup>/2DS1<sup>-</sup> NK cell frequencies in (B) homozygous HLA-C\*04 (n=20), -C\*07 (n=25),

-C\*03 (n=12), -C\*05 (n=9) and -C\*06 (n=6) individuals and (C) following KIR2DL2 expression in homozygous HLA-C\*03 (n=12). (D) Dot plots comparing the frequencies of NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>, NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> and NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell subsets for each HLA-C allotype (HLA-C\*03 n=12, -C\*07 n=29, -C\*04 n=20, -C\*06 n=6 and -C\*05 n=10). (E) Density plot and histogram representing the flow cytometry strategy to evaluate the relative MFI (rMFI) of KIR2DL1. The relative MFI has been determined in dividing the MFI of KIR2DL1 on the MFI of the isotype control in the same conditions. (F) Dot plots representing the rMFI of KIR2DL1 in C1 and C2 blood donors and in all blood donor groups following the main HLA-C allotypes (HLA-C\*03, -C\*04, -C\*07, -C\*05 and -C\*06). Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

**Figure 5: KIR2DL3<sup>+</sup> NK cell frequency depends on HLA-C allotypes and the KIR2DL2 gene.** (A) Representative density plots illustrating the gating of KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells then KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells using the combination of KIR2DL3 and KIR2DL3/S2 specific mAbs. Dot plots representing the frequencies of KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells (B) following the main HLA-C allotypes (HLA-C\*03, -C\*04, -C\*07, -C\*05 and -C\*06), (C) following KIR2DL2 expression in HLA-C\*03 and HLA-C\*07 blood donors. (D) Dot plots representing the hierarchical frequencies of NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> KIR2DL3<sup>+</sup> NK cells following the main HLA-C allotypes (HLA-C\*03, -C\*04, -C\*07, -C\*05 and -C\*06). (E) Density plot and histogram representing the flow cytometry strategy to evaluate the relative MFI (rMFI) of KIR2DL3. The relative MFI has been determined in dividing the MFI of KIR2DL3 on the MFI of the isotype control in the same conditions. (F) Dot plots representing the rMFI of KIR2DL3 in C1 and C2 blood donors and in all blood donor groups following the main HLA-C allotypes (HLA-C\*03, -C\*04, -C\*07, -C\*05

and -C\*06). Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001.

**Figure 6: CMV status and the KIR2DL5 gene modulate the C2 ligand driven KIR2DL1<sup>+</sup> NK cell education.** (A) Density plots illustrating the strategy to gate KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK subsets excluding other HLA class I specific NK receptors such as ILT2, NKG2A, KIR3DL1/S1, and KIR2DL2/3/S2 (others<sup>-</sup>). Then, from these cells the combination of KIR2DL1/S1 and KIR2DL1 specific mAbs led us to target only KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cell subset. The degranulation of NK cells was evaluated on CD57<sup>-</sup> and CD57<sup>+</sup> NK cell subsets. (B) Dot plots representing the frequencies of degranulation (CD107a) of CD57<sup>-</sup> versus CD57<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells. (C) Dot plots representing the frequencies of degranulation (CD107a) of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells following the nature of KIR2DL1 alleles (\*002, \*003 and \*004). (D) Dot plots representing the hierarchical frequencies of degranulation (CD107a) of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells in C1 and C2 homozygous blood donors and following HLA-C allotypes (HLA-C\*07, -C\*03, -C\*12, -C\*08, -C\*05, -C\*15, -C\*02, -C\*04 and -C\*06). Dot plots representing the frequencies of degranulation (CD107a) of KIR2DL1<sup>+</sup>/S1<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells in (E) HLA-C\*03 blood donors following CMV status and the presence/absence of the KIR2DL5 gene, (F) HLA-C\*04 blood donors following CMV status, KIR genotype (AA or B<sup>+</sup>), the presence/absence of KIR2DL5 and KIR2DS1 genes and (G) HLA-C\*05 blood donors following the number of KIR2DL1\*003 alleles (0, 1 or 2). Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established using one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001.

**Figure 7: The C1/C2 nomenclature does not fulfill all criteria to predict KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell education.** (A) Density plots illustrating the strategy to gate KIR2DL2<sup>+</sup> and KIR2DL3<sup>+</sup>

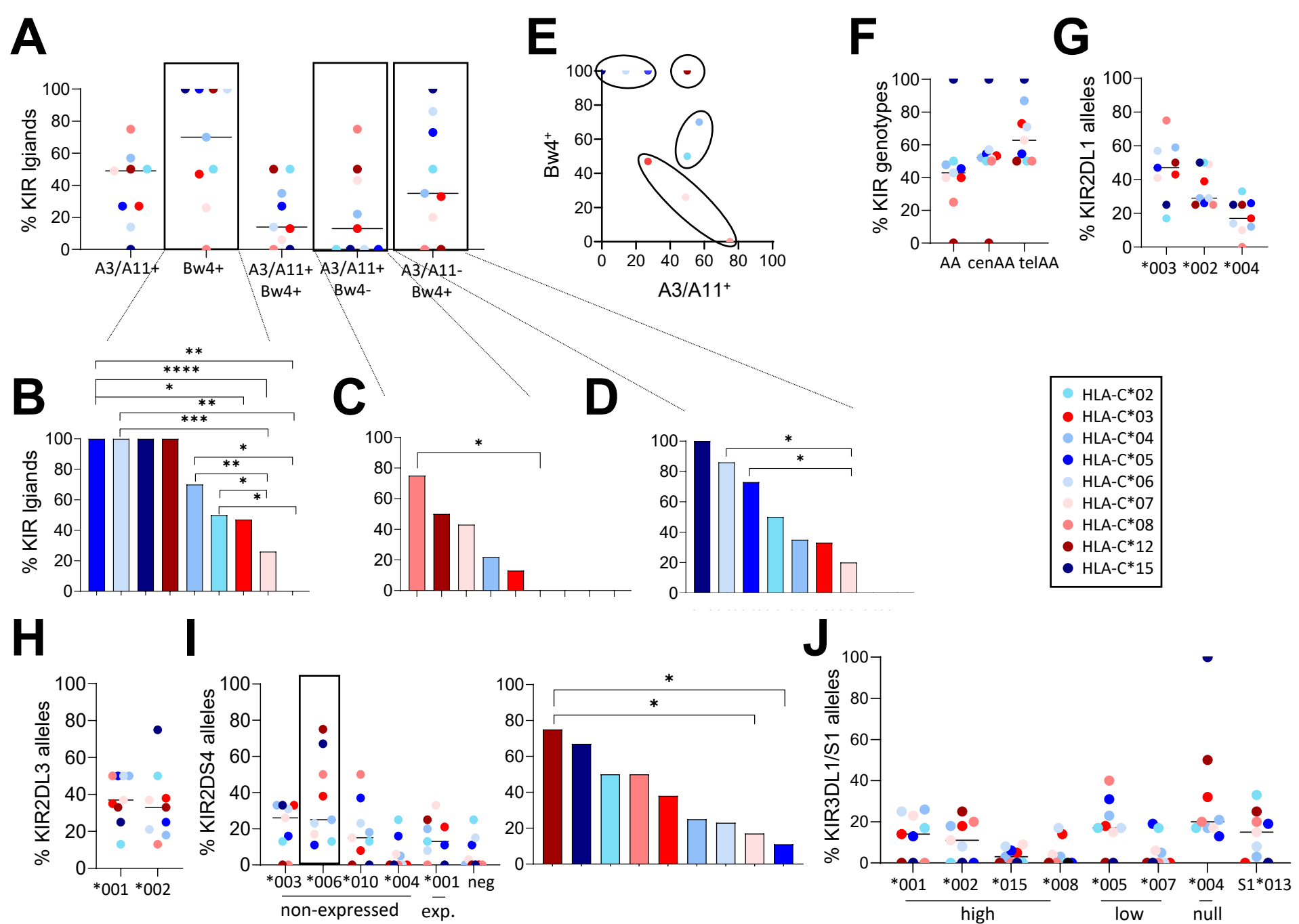


NK cells in excluding other HLA class I specific NK receptors such as ILT2, NKG2A, KIR3DL1/S1, and KIR2DL1/S1 (others<sup>-</sup>). Then, from KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells, the combination of KIR2DL2/3/S2 and KIR2DL3/S2 specific mAbs led us to target only KIR2DL2<sup>+</sup>/L3/S2<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cell subset. In parallel, from KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> NK cells, the combination of KIR2DL2/3/S2 and KIR2DL3/S2 specific mAbs led us to target only KIR2DL3<sup>+</sup>/L2/S2<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cell subset only from KIR2DL2<sup>-</sup> blood donors. The degranulation of NK cells was evaluated on CD57<sup>-</sup> and CD57<sup>+</sup> NK cell subsets. **(B)** Dot plots representing the frequencies of degranulation (CD107a) of CD57<sup>-</sup> versus CD57<sup>+</sup> KIR2DL2<sup>+</sup> or KIR2DL3<sup>+</sup> S2<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells. **(C)** Dot plots representing the hierarchical frequencies of degranulation (CD107a) of KIR2DL2<sup>+</sup> or KIR2DL3<sup>+</sup> S2<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells in C1C1 and C2C2 homozygous blood donors and following HLA-C allotypes (HLA-C\*12, -C\*03, -C\*08, -C\*07, -C\*02, -C\*06, -C\*04, -C\*05 and -C\*15). Dot plots representing the frequencies of degranulation (CD107a) of KIR2DL2<sup>+</sup> or KIR2DL3<sup>+</sup> S2<sup>-</sup> others<sup>-</sup> NK cells in **(D)** HLA-C\*07 blood donors depending on the nature of KIR2DL2 alleles (\*001 or \*003), **(E)** HLA-C\*03 blood donors following the KIR2DL5 gene and tel KIR motifs (AA or B<sup>+</sup>), **(F)** HLA-C\*02 blood donors following A3/A11 environment and **(G)** HLA-C\*04 blood donors following Bw4 motif on HLA-B molecules (Bw4<sub>B</sub>). **(H)** Linear regressions between CD107a<sup>+</sup> KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell frequencies in HLA-C\*03, -C\*07, -C\*04, -C\*05 and -C\*06 blood donors. Frequencies were compared between two groups with unpaired t tests and multiple comparisons were established using one-way ANOVA test. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and \*\*\*p < 0.001.

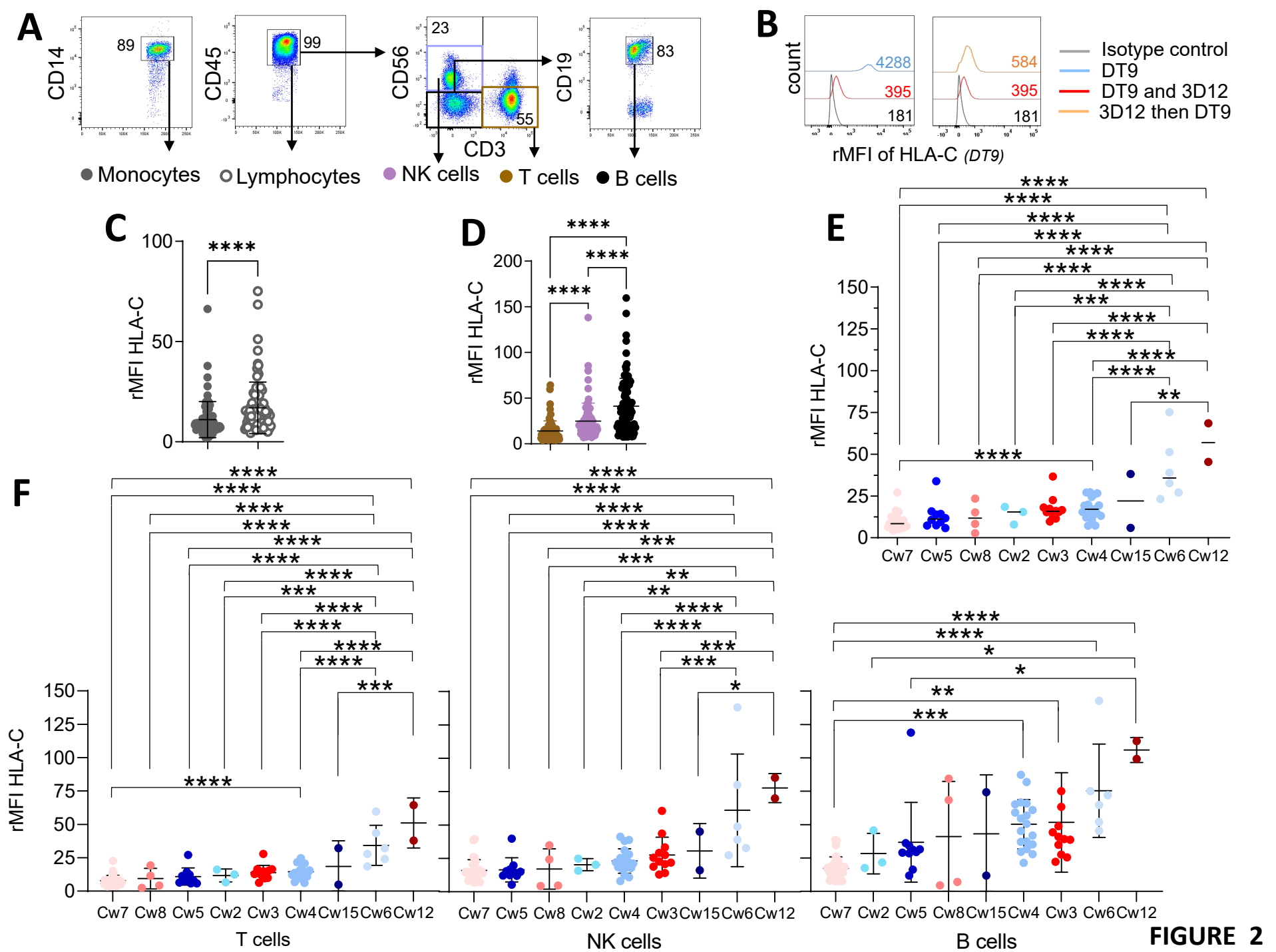
**Figure 8: Structural dichotomy between KIR2DL1/2/3<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell compartments.** The frequency of 32 NK cell subsets following KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2, KIR3DL1, NKG2A and CD57 markers was determined by flow cytometry. Thus, 32 NK cell subsets can be identified (4 KIR<sup>-</sup> and 28 KIR<sup>+</sup> NK cell subsets) and analyzed. All NK subsets

were clustered from 73 homozygous HLA-C blood donors using GENESIS<sup>®</sup> software. The hierarchical cluster analysis was performed using the method of ward linkage to cluster donors and NK cell subsets illustrated in the heatmap. Identification of 3 clusters of NK cell subsets following the tree diagrams and relevant NK cell iconographies. **(A)** The first one clusters NKG2A<sup>-</sup> NK cells expressing or not CD57, KIR2DL1 and KIR2DL3. **(B)** The second one clusters KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells expressing or not CD57 and NKG2A. **(C)** The last one clusters NKG2A<sup>+</sup> NK cells expressing or not CD57, KIR2DL1 and KIR2DL3. **(D)** Identification of 6 clusters of homozygous HLA-C blood donors following the tree diagrams: cluster 1 (n=11), cluster 2 (n=14), cluster 3 (n=15), cluster 4 (n=7), cluster 5 (n=15) and cluster 6 (n=11).

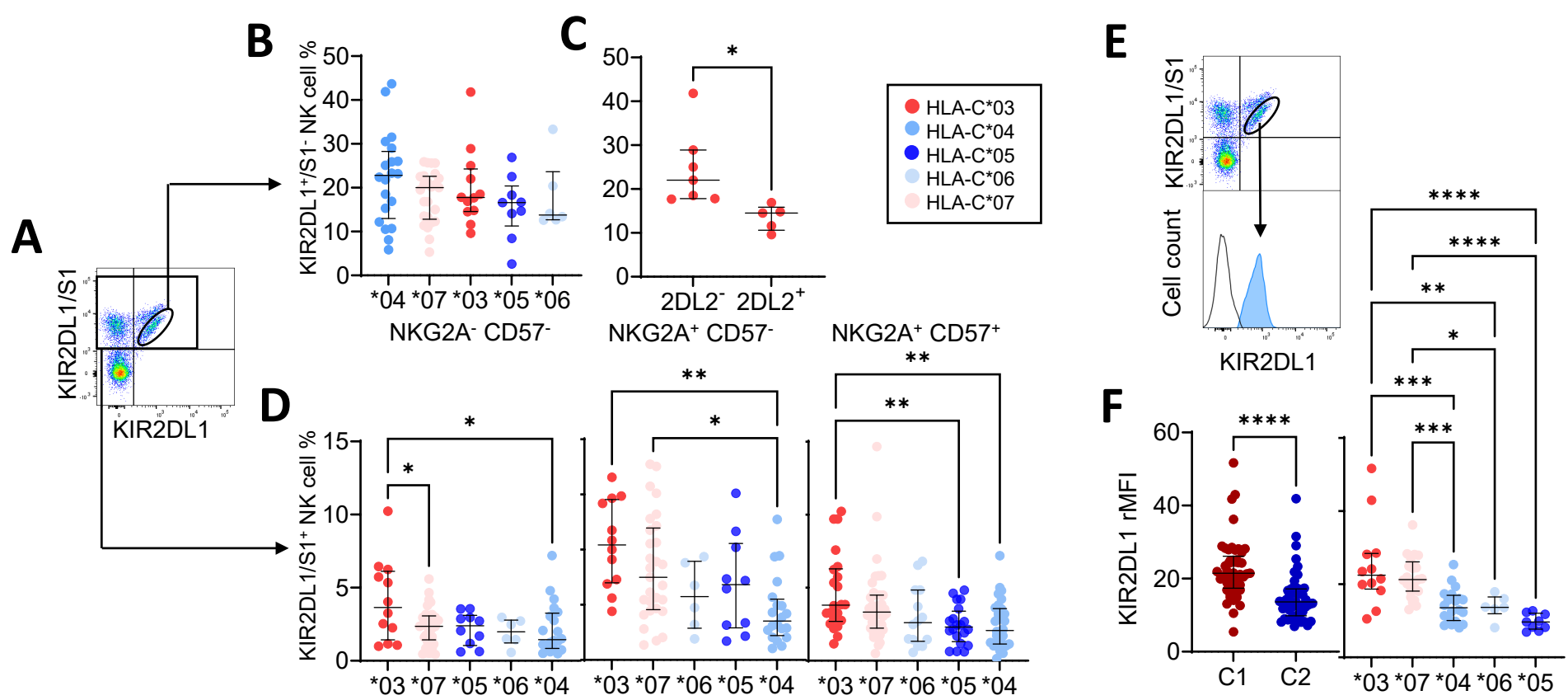
**Figure 9: Main profiles of NK cell repertoire following genetic markers.** **(A)** Histograms showing the main frequencies of NK cell subsets (>2.4%) organized in a decreasing order. The fourth predominant NK cell subsets are KIR<sup>-</sup> and the seventh ones are KIR<sup>+</sup> NK cell subsets. **(B)** The subsequent comparison of NK cell frequencies between homozygous HLA-C donor clusters was performed only for highest NK cell frequencies. **(C)** NK cell iconographies illustrating the main profiles of NK cell repertoire for the 6 donor clusters. **(D)** Radar diagrams for each donor cluster with main HLA (A3/A11, Bw4, C1, C2, -21T and -21M positions in HLA-B genes) and KIR (KIR genotype, Cen and Tel motifs (AA/B<sup>+</sup>), KIR2DL2 and KIR2DL5 genes) genetic markers. Hallmarks of each cluster are highlighted in red (genetic markers observed in more than 73% of blood donors) and pink (genetic markers observed in more than 60% of blood donors).



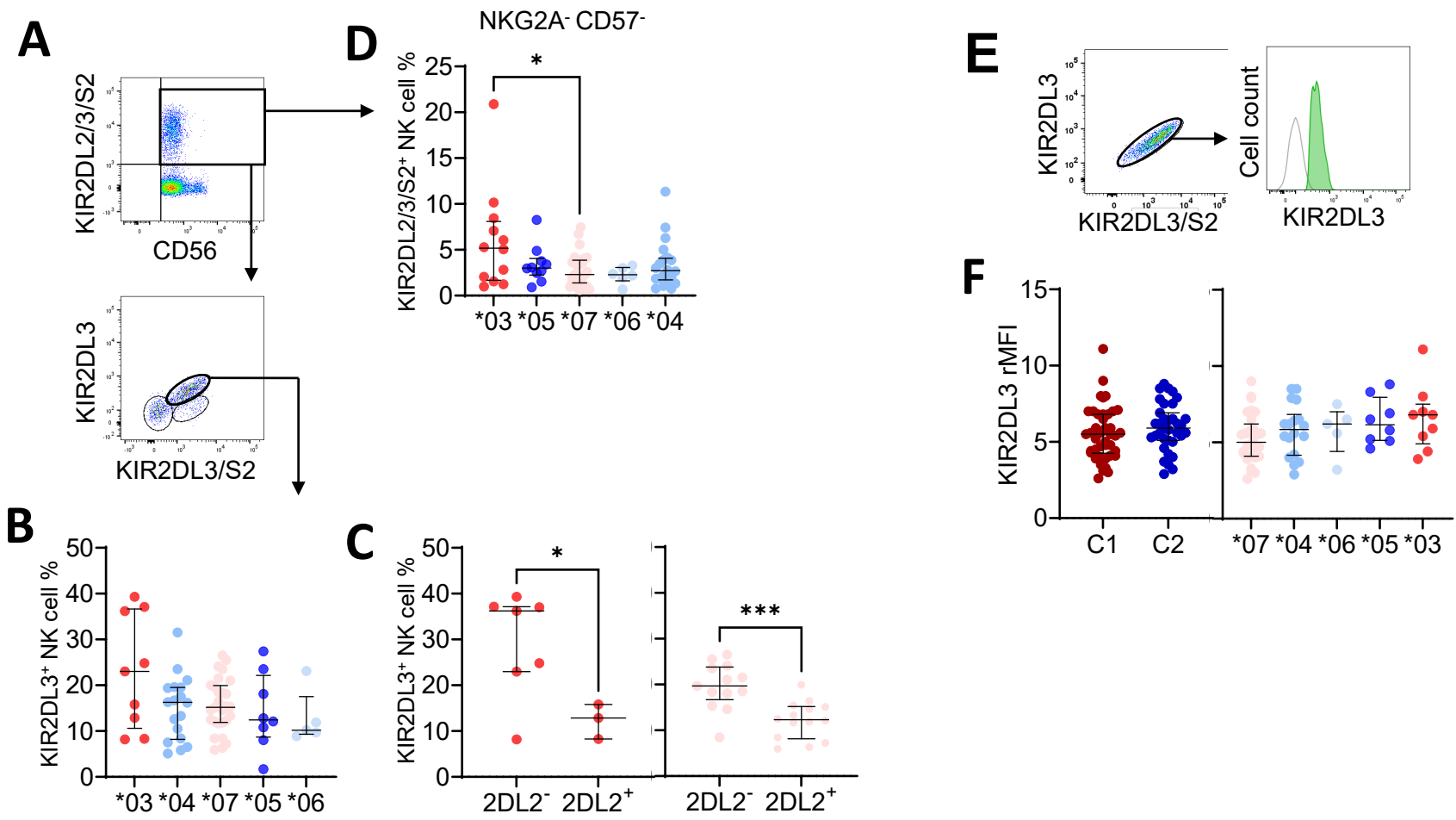
**FIGURE 1**







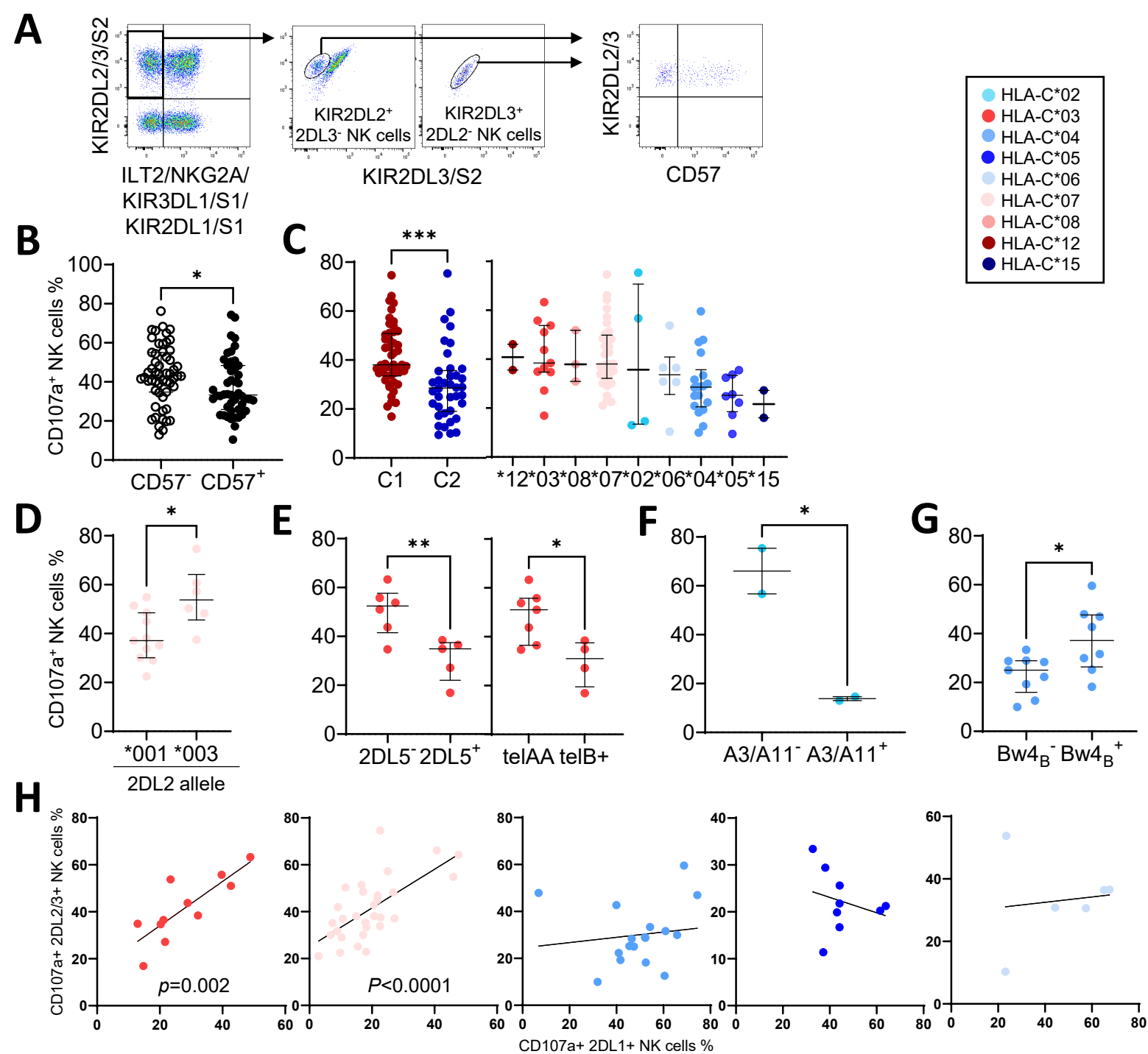
**FIGURE 4**



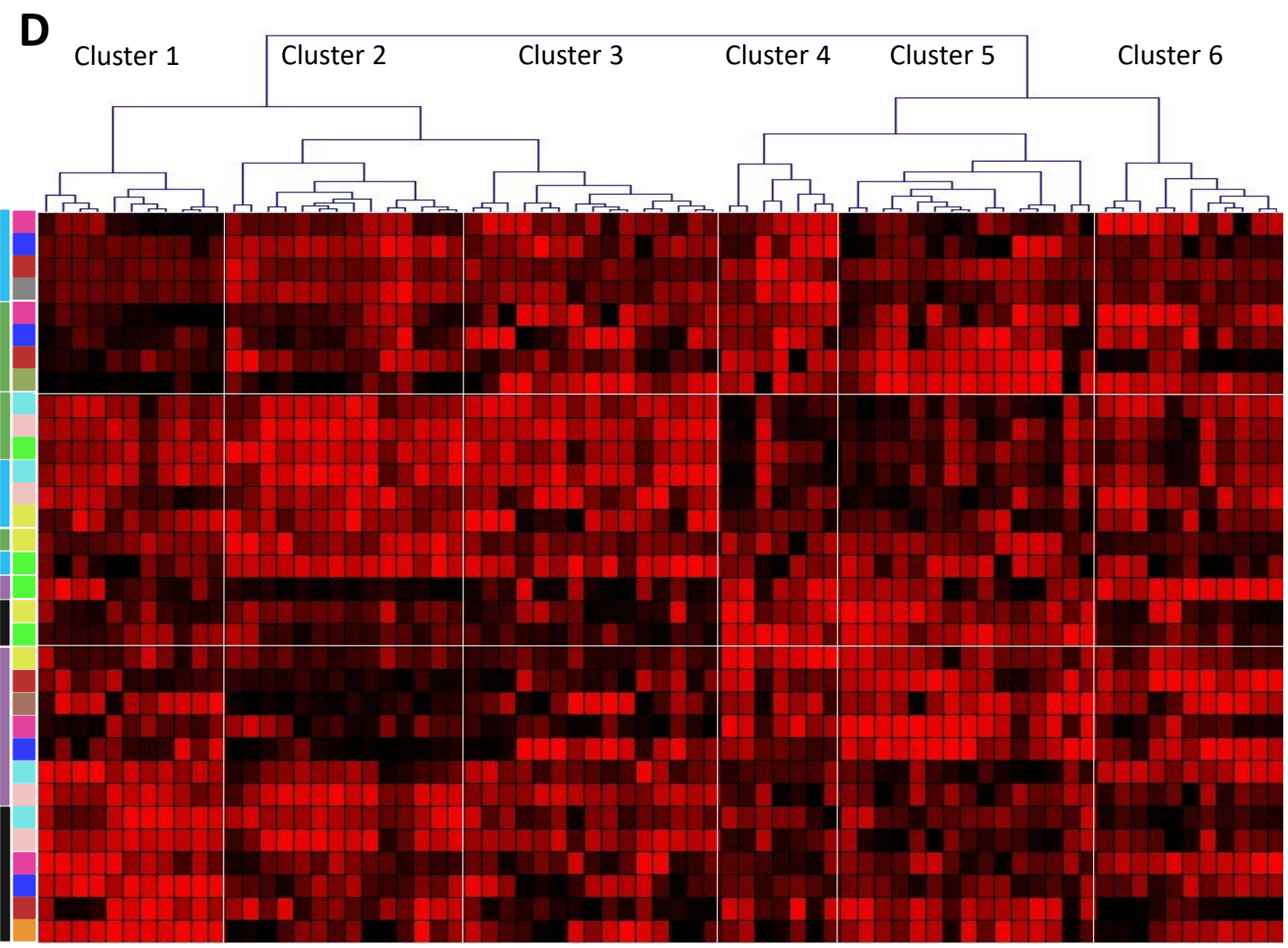
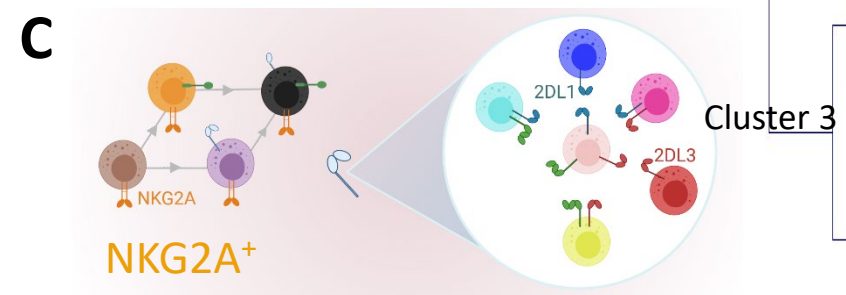
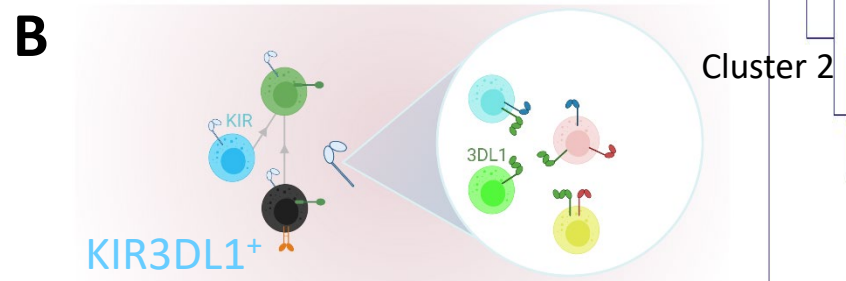
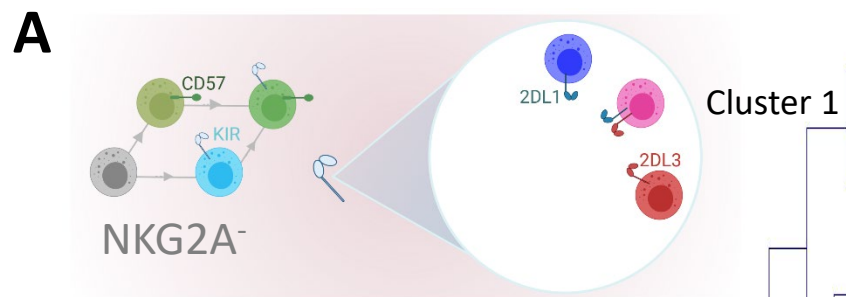
**FIGURE 5**



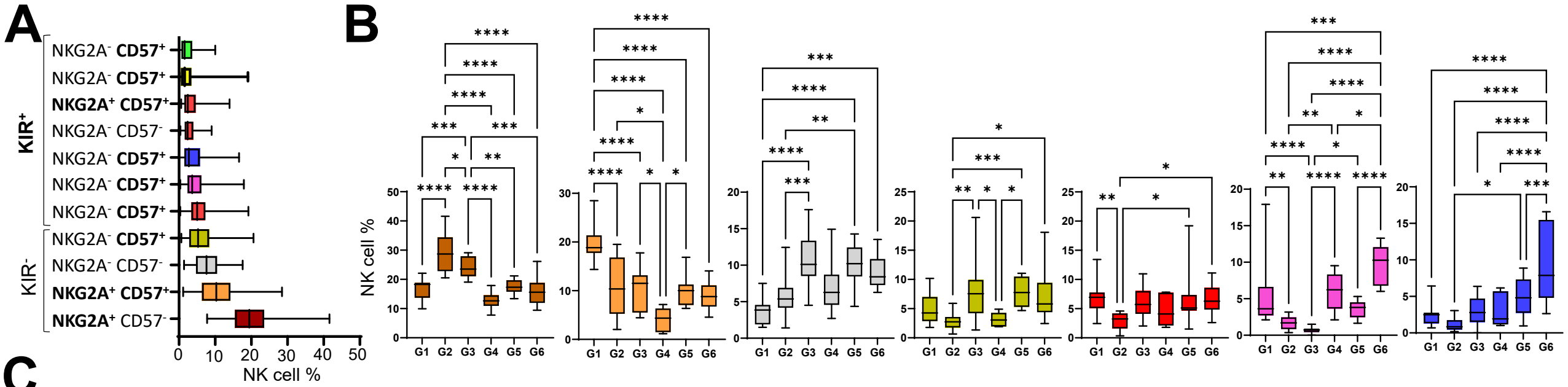




**FIGURE 7**



**FIGURE 8**



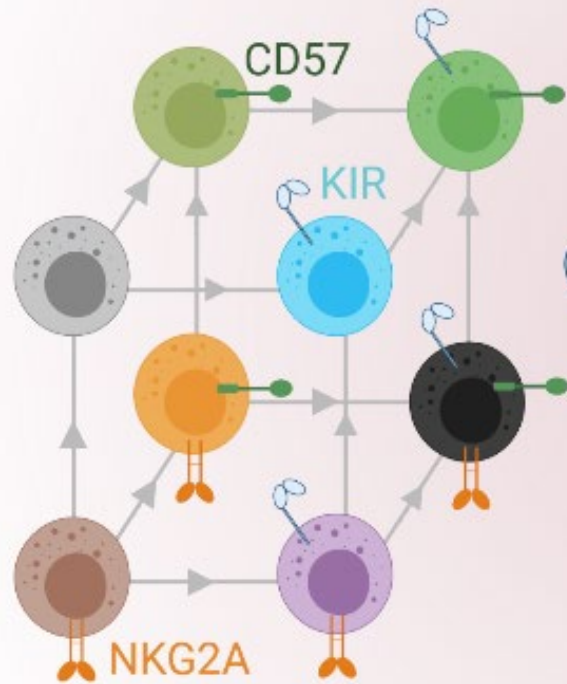
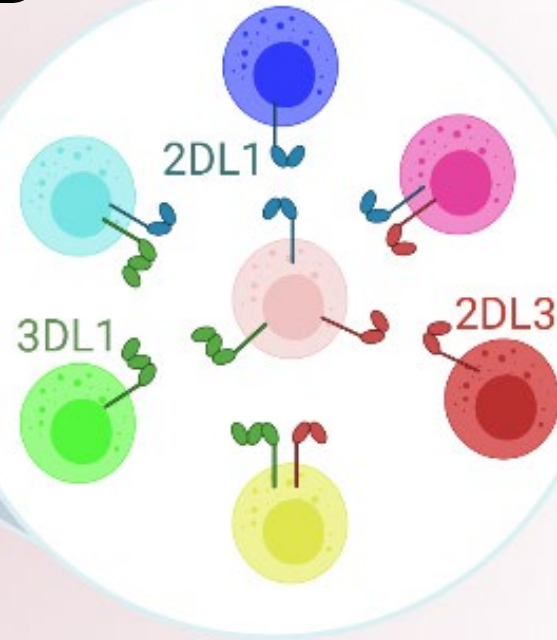
**FIGURE 9**

**Table 1: HLA-C typing and KIR genetic characteristics of homozygous HLA-C blood donors (N=103)**

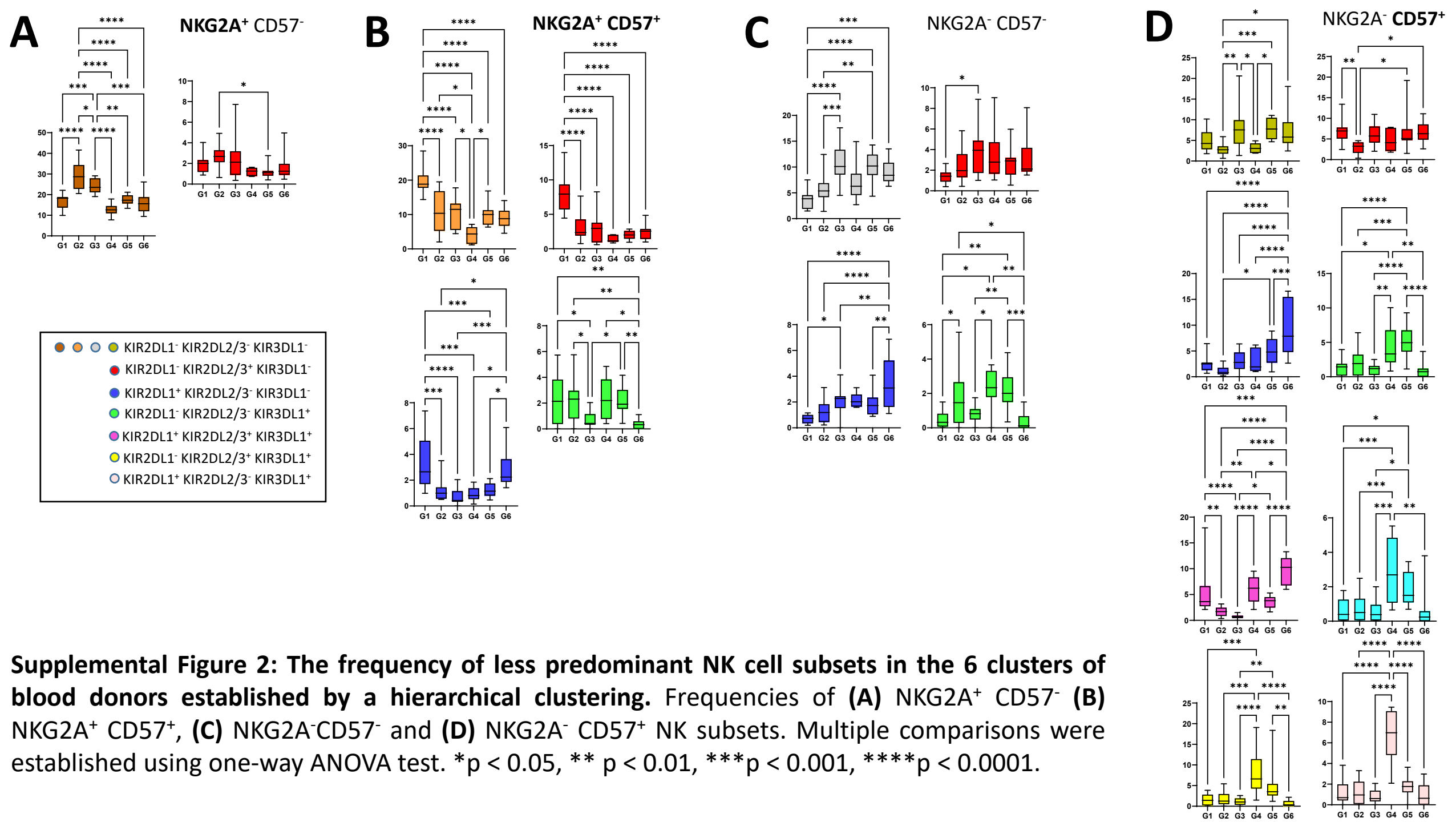
HLA-C specificities		N	HLA class I environment		KIR genotype	
HLA-C*	HLA-C*		A3/A11+	Bw4+	AA	B+
02:02	02:02	1	-	+	+	-
		1	-	+	-	+
		1	+	-	-	+
		1	+	+	+	-
03:03/03:04	03:03/03:04	4	-	+	-	+
		3	-	-	+	-
		3	-	-	-	+
		1	-	+	+	-
		1	+	-	+	-
		1	+	-	-	+
		1	+	+	+	-
		1	+	+	-	+
04:01	04:01	4	+	-	+	-
		4	+	-	-	+
		3	+	+	-	+
		3	-	-	-	+
		3	-	+	+	-
		2	+	+	+	-
		2	-	-	+	-
		2	-	+	-	+
05:01	05:01	3	-	-	+	-
		3	-	-	-	+
		1	-	+	+	-
		1	-	+	-	+
		1	+	-	+	-
		1	+	+	-	+
		1	+	+	-	+
06:02	06:02	3	-	+	-	+
		2	-	-	+	-
		1	-	-	-	+
		1	+	-	+	-
07:01/07:02	07:01/07:02	9	-	-	-	+
		9	+	-	+	-
		7	+	-	-	+
		5	-	+	-	+
		4	-	-	+	-
		1	+	+	+	-
08:02	08:02	2	+	-	-	+
		1	+	-	+	-
		1	-	-	-	+
12:03	12:03	1	+	-	-	+
		1	+	+	-	+
15:02	15:02	1	-	-	+	-
		1	-	+	+	-
		103	45	58	44	59

HLA-C allelic typing of all blood donors was determined by Next-Generation-Sequencing. HLA-C\*03:03, -C\*03:04, -C\*07:01 and -C\*07:02 homozygous blood donors were included. HLA-A3/A11 and Bw4 environment were assigned from HLA-A and HLA-A/HLA-B typing respectively. KIR genotypes were assigned in all homozygous HLA-C blood donors by KIR genotyping. The presence or absence of KIR2DS4 and other activating KIR genes permits to define KIR AA (only 2DS4 present) and B+ (other activating KIR) genotypes.



**A****B**

**Supplemental Figure 1. NK cell subsets according to the NK cell differentiation model (KIR, NKG2A and CD57) in including main KIR (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 and KIR3DL1).** The frequency of 32 NK cell subsets following these markers was determined by flow cytometry. **(A)** A first level based on NKG2A, CD57 and KIR lead to identify 8 NK cell subsets. **(B)** A second level based on KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 and KIR3DL1 lead to identify 7 KIR<sup>+</sup> NK cell subsets. Thus, together, 32 NK cell subsets can be identified (4 KIR<sup>-</sup> and 28 KIR<sup>+</sup> NK cell subsets) and analyzed.



**ARTICLE N°3:** Relevance of Polymorphic KIR and HLA Class I Genes in NK-Cell-Based Immunotherapies for Adult Leukemic Patients.

Léa Dubreuil, Patrice Chevallier, Christelle Retière and Katia Gagne

*Cancers* 2021, 13(15), 3767

Depuis le milieu des années 1990, la biologie et les fonctions des cellules Natural Killer (NK) ont fait l'objet d'études approfondies à la fois chez des individus sains et des personnes atteintes de maladies. Ces cellules effectrices jouent un rôle crucial après GCSH allogéniques grâce à leur effet anti-leucémique (étant les premières cellules immunitaires à reconstituer l'hématopoïèse des patients. Les fonctions des cellules NK sont principalement médiées par les récepteurs KIR qui ont pour ligands les molécules HLA de classe I. Cependant, le poids du polymorphisme des gènes KIR et HLA de classe I dans les immunothérapies NK reste peu documenté. Cette revue présente l'état de l'art du polymorphisme des gènes KIR et HLA de classe I qui modulent le répertoire des cellules NK et la façon dont la prise en compte de ces marqueurs peut améliorer le devenir des patients atteints de leucémie aiguë. En particulier, nous décryptons les connaissances actuelles sur l'étendue des polymorphismes des gènes KIR et HLA classe I, leurs expressions, interactions et les impacts fonctionnels sur le répertoire des cellules NK KIR+ dans des contextes physiologique et leucémique. En outre, nous présentons l'impact de l'alloréactivité des cellules NK sur les résultats post-GCSH chez des patients adultes atteints de leucémie aiguë, ainsi qu'une description des modèles génétiques KIR/HLA et des données de la reconstitution des cellules NK, en mettant l'accent sur les GCSH haplo-identiques non T déplétées avec administration de cyclophosphamide post-greffe (haplo-PTCy). Ensuite, nous documentons comment l'immunogénétique KIR/HLA et l'immunobiologie des cellules NK pourraient diminuer l'incidence de rechute post-haplo-PTCy. Enfin, nous décrivons les immunothérapies NK émergentes pour le traitement des patients leucémiques et comment la prise en compte des marqueurs polymorphes KIR/HLA pourraient améliorer leur efficacité.



Review

# Relevance of Polymorphic KIR and HLA Class I Genes in NK-Cell-Based Immunotherapies for Adult Leukemic Patients

Léa Dubreuil <sup>1,2,3</sup>, Patrice Chevallier <sup>2,3,4</sup>, Christelle Retière <sup>1,2,3</sup>  and Katia Gagne <sup>1,2,3,5,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Research, Etablissement Français du Sang, F-44011 Nantes, France; lea.dubreuil@efs.sante.fr (L.D.); christelle.retiere@efs.sante.fr (C.R.)

<sup>2</sup> University de Nantes, INSERM U1232 CNRS, CRCINA, F-44000 Nantes, France; patrice.chevallier@chu-nantes.fr

<sup>3</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, F-44000 Nantes, France

<sup>4</sup> Hematology Clinic, CHU, F-44093 Nantes, France

<sup>5</sup> LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France

\* Correspondence: katia.gagne@efs.sante.fr; Tel.: +33-2-40-12-34-72

**Simple Summary:** Immunotherapies are promising approaches to curing different acute leukemias. Natural killer (NK) cells are lymphocytes that are efficient in the elimination of leukemic cells. NK-cell-based immunotherapies are particularly attractive, but the landscape of the heterogeneity of NK cells must be deciphered. This review provides an overview of the polymorphic KIR and HLA class I genes that modulate the NK cell repertoire and how these markers can improve the outcomes of patients with acute leukemia. A better knowledge of these genetic markers that are linked to NK cell subsets that are efficient against hematological diseases will optimize hematopoietic stem-cell donor selection and NK immunotherapy design.



**Citation:** Dubreuil, L.; Chevallier, P.; Retière, C.; Gagne, K. Relevance of Polymorphic KIR and HLA Class I Genes in NK-Cell-Based Immunotherapies for Adult Leukemic Patients. *Cancers* **2021**, *13*, 3767. <https://doi.org/10.3390/cancers13153767>

Academic Editor: Antonio Curti

Received: 21 June 2021

Accepted: 23 July 2021

Published: 27 July 2021

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Since the mid-1990s, the biology and functions of natural killer (NK) cells have been deeply investigated in healthy individuals and in people with diseases. These effector cells play a particularly crucial role after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) through their graft-versus-leukemia (GvL) effect, which is mainly mediated through polymorphic killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and their cognates, HLA class I ligands. In this review, we present how KIRs and HLA class I ligands modulate the structural formation and the functional education of NK cells. In particular, we decipher the current knowledge about the extent of KIR and HLA class I gene polymorphisms, as well as their expression, interaction, and functional impact on the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire in a physiological context and in a leukemic context. In addition, we present the impact of NK cell alloreactivity on the outcomes of HSCT in adult patients with acute leukemia, as well as a description of genetic models of KIRs and NK cell reconstitution, with a focus on emergent T-cell-repleted haplo-identical HSCT using cyclophosphamide post-grafting (haplo-PTCy). Then, we document how the immunogenetics of KIR/HLA and the immunobiology of NK cells could improve the relapse incidence after haplo-PTCy. Ultimately, we review the emerging NK-cell-based immunotherapies for leukemic patients in addition to HSCT.

**Keywords:** natural killer cells; killer-cell immunoglobulin-like receptors; HLA class I; polymorphism; acute leukemia; hematopoietic stem-cell transplantations; NK-cell-based immunotherapy

## 1. Introduction

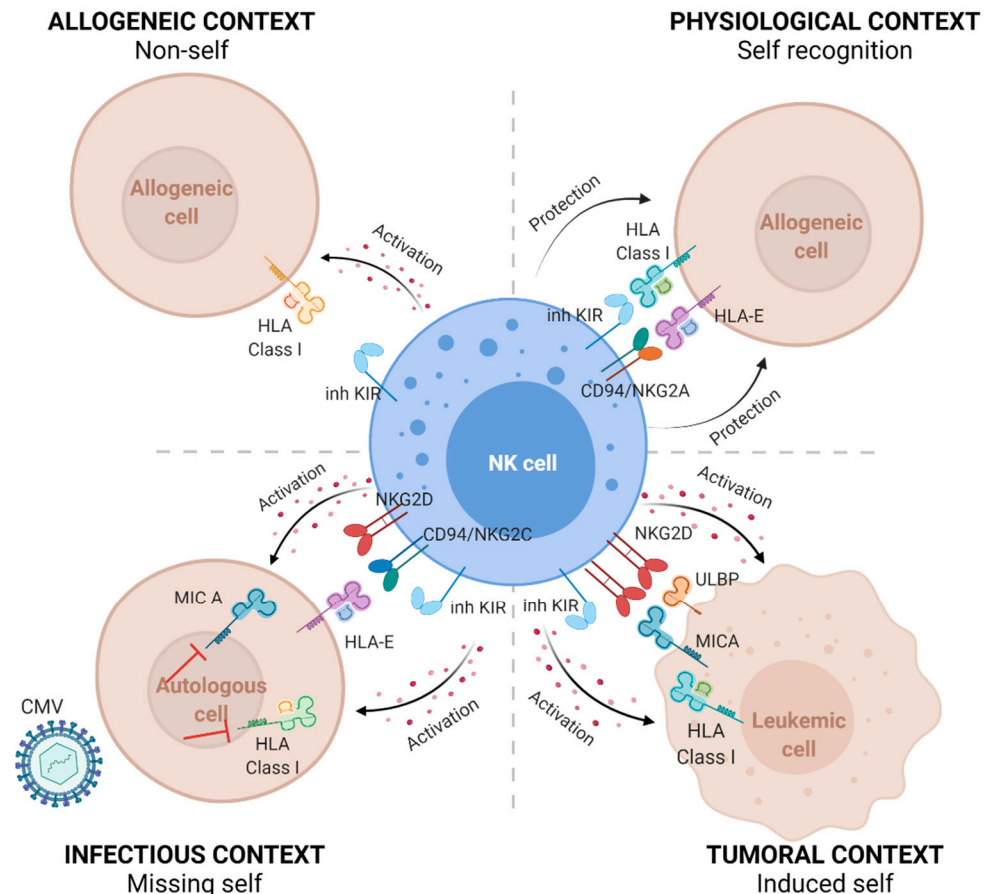
Natural killer (NK) cells, which develop from common lymphoid progenitors in the bone marrow, correspond to large granular lymphocytes and are usually identified as CD3<sup>−</sup> CD56<sup>+</sup>, representing about 5–20% of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [1]. These innate immune effectors [2] proliferate, produce cytokines, and are cytotoxic against virus-infected cells or tumor cells. According to the level of CD56 expression, two NK cell subsets with distinct repertoire signatures have been defined; CD56<sup>dim</sup> NK cells (90%) are

mainly cytotoxic, while CD56<sup>bright</sup> NK cells (10%) produce high levels of cytokines, but have a low cytotoxicity [3]. NK cells are able to lyse target cells by using antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) driven by the activating CD16 receptor. They express a wide range of activating receptors including NKG2D, DNAM-1, 2B4, and NCRs such as NKp30, NKp44, and NKp46 that recognize induced or upregulated molecules on tumor and virus-infected cells. NK cells recognize healthy cells that express normal levels of HLA class I molecules and sense the absence of HLA class I molecules on allogeneic cells or their decreased expression on tumor or virus-infected cells, as demonstrated by the “missing-self” hypothesis [4,5]. Killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and the CD94/NKG2A heterodimer represent the two main inhibitory NK receptors that are engaged in this missing-self recognition. Overall, NK cell functions are regulated by a balance of synergistic signals from combinations of inhibitory and activating receptors engaged with cognate ligands on target cells. HLA class I molecules play a central role in the regulation of immune responses with respect to their interactions with T- or NK-cell-specific receptors [6]. KIRs and their HLA class I ligands constitute the main polymorphic and polygenic pair in humans for the regulation of functions and the licensing of NK cells [6,7]. KIRs are clonally expressed on the surface of mature NK cells [8,9]. Functional KIR/HLA interactions drive the tremendous diversity of NK cells with a limited number of germline-encoded genes [10]. In addition to KIRs, the CD94/NKG2A heterodimer recognizes the nonclassical HLA-E molecule. This receptor/ligand is expressed in all individuals and does not present the broad genetic diversity that characterizes the KIR/HLA pair. The inhibitory CD94/NKG2A receptor and its activating NKG2C counterpart are involved in missing-self recognition, and CD94/NKG2A is also involved in NK cell licensing [11]. Moreover, the expression of inhibitory and activating receptors is strongly associated with NK cell differentiation and maturation. In particular, NK cell subsets can be defined on the basis of differentiation markers. During their development, NK cells first acquire NKG2A expression and, at a later stage, KIR expression, followed by the terminal differentiation CD57 receptor [11]. The cytomegalovirus (CMV) also modulates the NK cell repertoire with an expansion of KIR2D<sup>+</sup> NKG2C<sup>+</sup> NK cells [12,13]. The model of NK cell differentiation established by Björsktrom et al. [11], therefore, permits the investigation of the heterogeneity of NK cells.

In cancer immunotherapies, NK cells represent key components especially for patients with hematological malignancies. In these cases, NK cells can easily access tumor sites without the barrier represented by the tumor microenvironment, unlike in the case of solid tumors [14]. Although they are diverse, hematological malignancies include acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoid leukemia (ALL), which are frequent in adult patients. For patients with acute leukemia, the relapse of the initial disease remains the major cause of death. The relapse may be due to a failure of conventional chemotherapies but also due to the escape of tumor cells from immune responses [15]. The lost or decreased expression of HLA molecules and/or upregulation of ligands on leukemic cells that are recognized by activating NK cell receptors can sustain the crucial role of NK cells. For leukemic patients for whom conventional chemotherapies have failed, allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) is usually suggested in order to replace both the defective hematopoiesis and the immune system of the patient with healthy HSCs from donors. In that case, NK cells play a crucial role through their graft-versus-leukemia (GvL) effect, as they are the first lymphocytes to participate in the reconstitution of the immune system of the patient even before T cells after HSCT [16,17]. However, the NK cell functions in leukemic patients can be altered by the tumor microenvironment. The efficiency of NK-cell-based immunotherapies can be enhanced by cytokines, inhibitory specific monoclonal antibodies (mAbs), and adoptive transfer of *in vitro* activated NK cells [18,19]. Promising recent advances have shown the use of NK cells armed with chimeric antigen receptors (CARs) to enhance their antileukemic function [20]. The CRISPR technology also permits the optimization of some cellular pathways to boost the antileukemic efficacy of NK cell immunotherapies [21]. Numerous approaches to NK cell immunotherapy have been developed by using mainly autologous or allogeneic NK cells in bulk without considering

all genetic and allelic KIR and HLA polymorphisms known to govern the structural and functional heterogeneity of NK cells.

In the present review, we present the characteristics of KIR and HLA class I gene polymorphisms, their expression, the KIR/HLA interactions that regulate the NK cell repertoire in healthy individuals, and the relevance of KIR/KIR ligands to NK-cell-based immunotherapies for adult patients with hematological malignancies, especially in the context of allogeneic HSCT. The roles of NK cells in physiological, allogeneic, infectious, and leukemic contexts are summarized in Figure 1.



**Figure 1.** The natural cytotoxicity of NK cells is driven by the missing-self recognition. NK cells recognize healthy cells that express normal levels of HLA class I molecules and sense the absence of HLA class I molecules on allogeneic cells (non-self) or decreased expression of HLA class I molecules (missing-self) on tumor cells or virus-infected cells, as reported for the cytomegalovirus (CMV). Recognition of “self” mainly involves interactions between polymorphic inhibitory killer-cell immunoglobulin-like receptors (inh KIRs) and classical HLA class I molecules, as well as interactions between the CD94/NKG2A heterodimer and the nonclassical HLA-E molecule. The lack of interaction of inh KIRs with their HLA class I ligands or CD94-NKG2A with HLA-E induces the activation of NK cell lysis. In addition to KIR/KIR ligands, interactions of the induced MHC class I-like MICA ligand, ULBP ligand expressed on tumor cells, or the HLA-E molecule by respectively activating NKG2D or CD94/NKG2C receptors could activate NK cell lysis.

## 2. Relevance of the KIR and HLA Class I Genes to the NK Cell Repertoire

In healthy individuals, the formation of the NK cell repertoire is influenced by various factors including the variability of the KIR and HLA class I genes, the CMV status, and the frequency of NK cell subsets. KIRs represent a family of receptors belonging to the immunoglobulin (Ig)-like superfamily. The KIR family is composed of receptors with two or three (2D, 3D) extracellular domains. The intracytoplasmic tail can be long (L) with two

ITIMs (immune tyrosine-based inhibitory motifs) or short (S) and coupled with the DAP12 molecule, which bears an ITAM (immune tyrosine-based activating motif) discriminating inhibitory and activating KIRs, respectively [22].

### 2.1. KIR Genes

The genetics of KIRs are complex because KIR genes vary in structure, exon/intron organization, and relative size. Currently, the KIR gene family consists of 15 different loci (2DL1, 2DL2/2DL3, 2DL4, 2DL5A, 2DL5B, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DS5, 3DL1/3DS1, 3DL2, 3DL3, 2DP1, 3DP1) encoded in a 100–200 kb region in the leucocyte region complex (LRC) located on chromosome 19. The LRC constitutes a dense cluster of immune-related genes that encode, in addition to KIR, other NK cell receptors [23]. KIR genes have a head-to-tail organization and are arranged within 2.4 kb of each other, except between 3DP1 and 2DL4, where there is a gap of 14 kb [24]. KIR genes have four to nine exons with an entire genomic size ranging from 4 kb for 3DP1 to 16 kb for 3DL2 and long introns [25]. Three KIR exon/intron gene organizations have been described. The first one corresponds to the genes encoding KIR3DL, such as 3DL1/2. These genes consist of nine exons: exons 1 and 2 encode the signal peptide; exons 3, 4, and 5 encode each Ig-like domain (D0, D1, and D2 respectively); exon 6 encodes the stem connecting the D2 domain to the transmembrane part, which is encoded by exon 7; exons 8 and 9 encode the intracytoplasmic tail. KIR3DL3 has a similar structure, but with the absence of exon 6 and a stop codon in exon 9. KIR3DS1 has the same exon/intron organization as that of 3DL1, but a shorter exon 9 encoding for the short tail. Interestingly, KIR3DL1 and KIR3DS1 are defined as alleles of the same gene, although they have different functions [26]. The second and third exon/intron gene organization corresponds to KIR2D: type I KIR2D includes genes that encode 2DL1/2/3/S1/2/3/4/5. These genes consist of eight exons with exons 4 and 5 encoding the D1 and D2 domains respectively, and a region homologous to exon 3 encoding the D0 domain of KIR3D, which is called “pseudo-exon 3” [27,28]. The KIR2DS4 gene is found in two forms, with one common 1D variant that is characterized by a 22 bp deletion in exon 5, which block transcription of the corresponding receptor [24]; the type II KIR2D genes include 2DL4/5, which exhibits eight exons and a 22 kb deletion in exon 4. Exons 3 and 5 of these genes encode the D0 and D2 domains, respectively.

The number and nature of KIR genes differ between individuals, allowing one to distinguish two major KIR haplotypes (A, B) [29]. The KIR A and B haplotypes both have four framework genes (3DL3, 3DP1, 2DL4, and 3DL2), and are present in all individuals with some rare exceptions. KIR3DL3 and 3DL2 are located at the centromeric and telomeric ends, respectively, and delimit the LRC, while 3DP1 and 2DL4 are located between both. The KIR A haplotype is defined by a fixed set of nine KIR genes (3DL3, 2DL3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, and 3DL2) with only 2DS4 as an activating gene. In contrast, the B haplotypes are diverse with a variable number of KIR genes and are characterized by the presence of specific inhibitory KIRs, such as 2DL2, and more than one activating KIR gene. Based on the combination of the KIR A and B haplotypes, 660 KIR genotypes have been described worldwide (<http://www.allelefreqencies.net/>) (accessed on 26 July 2021). Conventionally, the gene frequencies of KIR are close to 100% for inhibitory 2DL1/2/3, whereas the frequencies of the activating KIR genes are low, except for 2DS4. Different commercial or in-house methods including the use of specific KIR primers or probes, permit the assessment of the presence or absence of KIR genes. Various studies have shown that frequencies of KIR genes, haplotypes and/or genotypes vary between populations [30–32]. Interestingly, a majority (>50%) of individuals harbors the KIR AA genotype in Asian populations [30,33], whereas only 35% of Europeans have this genotype [34,35].

In addition to the definition of the KIR A and B haplotypes, framework KIR genes allow for the delineation of two chromosomal parts: centromeric (cen) (2DS2, 2DL2/3, 2DL5B, 2DS3, 2DP1, 2DL1) and telomeric (tel) KIR genes (3DL1/S1, 2DL5A, 2DS5, 2DS1) [36]. Depending on the KIR2DL2/3/S2 genes, the cenAA (2DL3 only), cenAB (2DL3 with 2DS2 and/or 2DL2), and cenBB (2DL2 and/or 2DS2, no 2DL3) motifs are defined. Depending on



KIR2DS1/S4/3DL1/S1 genes, the telAA (3DL1 and 2DS4 only), telAB (3DL1 and 2DS4 with 3DS1 and/or 2DS1), and telBB (lacking 3DL1 and/or 2DS4) motifs are defined. This subdivision into gene content motifs can increase the diversity of KIR genes. Thus, individuals with a KIR AB genotype could present different cen and tel motifs, whereas individuals with the KIR AA genotype exhibit only the cenAA and telAA motifs. Another parameter of this diversity is linked to the copy number variation (CNV) [37]. The arrangement of KIR genes in a head-to-tail orientation and their high sequence homology allow for a gain or loss of KIR genes with the generation of expanded or contracted KIR haplotypes, as well as the formation of fusion genes [38]. It has been shown that some KIR genes are more affected by CNV than others [33].

Lastly, KIR genes exhibit an allelic diversity; currently, 1110 KIR alleles have been referenced (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) (accessed on 26 July 2021). The allelic polymorphism of KIRs is particularly high for inhibitory KIRs (the strongest being for 3DL3 with 228 alleles) and is limited for activating KIRs (the lowest being for 2DS1 with 33 alleles). To name KIR alleles, a specific nomenclature [39] has been established, which uses an asterisk as a separator after the gene name, before a numerical allele designation (2DL1\*). The next three digits are used to name the different alleles of the same gene that differ in coding sequences (2DL1\*003). The following two digits are used to distinguish alleles that only differ in synonymous (noncoding) substitutions within the coding sequence (2DL1\*00302), and the last two digits are used to distinguish alleles that only differ in substitutions in noncoding regions (2DL1\*0030202). For more than 15 years, specific KIR primers, probes or sequence-based-typing (SBT) methods have been used to assign KIR alleles of limited KIR genes [40]. More recently, next-generation sequencing (NGS) technologies have permitted the assignment of the alleles of all KIR genes [41–43]. As mentioned for KIR genes, KIR allele frequencies vary among populations. Interestingly, although 68 KIR2DL1 alleles have been reported worldwide, only five predominant alleles (\*001, \*002, \*003, \*004, and \*007) are encountered in Europeans [34,44]. Moreover, the non-expressed KIR3DL1\*004 allele [45], which is frequent in Caucasians [46], is absent in the Japanese population [30]. Interestingly, the group of P. Parham was the first to describe that allelic polymorphism of KIRs synergizes with variable gene content, thus making it possible to individualize KIR genotypes [47]. Recently, the KIR A haplotype and cenAA motif were reported to be associated with the 2DL1\*001, \*002, and \*003 alleles, while the B haplotype and cenB+ motif were associated with the 2DL1\*004 and \*007 alleles in European populations [34,48–50]. In addition, different linkage disequilibria (LD) between KIR genes have been described [24,48]. Overall, these population-based genetic studies could help in the prediction of KIR alleles from KIR gene content, including pseudogenes [51].

## 2.2. HLA Class I Genes

The main characteristics of the HLA system correspond to an exhaustive polymorphism and the inheritance of HLA genes from the parental haplotypes in blocks. The HLA system represents the most polymorphic gene locus in humans [52], with 28,938 HLA alleles reported so far [53]. The HLA locus contains more than 200 genes, many of which have immune-related functions [54]. HLA class I genes encode both classical and nonclassical HLA class I molecules. Classical HLA class I genes (HLA-A, -B, -C) are located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3) and are composed of eight exons and seven introns. Most polymorphic exons correspond to exons 2 and 3, which respectively, encode the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains which form the peptide-binding groove of HLA class I molecules that are ubiquitously expressed on nucleated cells. The length of the HLA-A, -B, and -C genes is closed to 3 kb. In terms of allelic polymorphism, HLA-A, -B, and -C are divergent genes with numerous alleles, and all positions in the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains exhibit variations [55]. The polymorphism of HLA-C genes, although extremely diverse, is more limited in terms of the alleles described in comparison with the polymorphism of HLA-B genes. The allele frequencies of HLA-C and the LD of HLA-C/HLA-B are frequently updated through genetic population studies [56–58]. From its phylogeny, HLA-C appears to be more recent

compared to the HLA-A and -B loci, and regulatory elements of transcription differ between the HLA-C and HLA-A/B genes [59]. Today, HLA class I alleles are assigned by using NGS methods [57,60–63], which allow detailed mapping of all polymorphic bases encountered in the exons, introns, and untranslated regions (UTR). Identification of regulatory variants located in UTRs is important because they can influence the expression of HLA class I molecules, as detailed later. In addition to the classical HLA class I genes, the HLA-E and MICA genes, despite their limited polymorphism are of interest in NK cell studies, as they encode for the CD94/NKG2C and NKG2D ligands, respectively [64,65].

### 2.3. KIR/HLA Interactions and the KIR<sup>+</sup> NK Cell Repertoire

The distribution of KIRs on the surface of NK cells is clonal due to the stochastic expression of KIRs [66,67]. Therefore, a heterogeneous repertoire of NK cell subpopulations expressing different combinations of KIRs or a lack thereof is observed. Usually, the expression of KIRs on NK cells is assessed by using commercial (which is limited to some KIRs) and/or in-house anti-KIR mAbs, which make it possible to distinguish the main inhibitory and activating KIR2D [68]. The KIR gene content influences the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire. Thus, KIR AA genotyped individuals show a less diverse NK cell repertoire with higher frequencies of the corresponding KIR<sup>+</sup> NK subpopulations compared to KIR B+ genotyped individuals, who have a broader KIR gene content and lower frequencies of KIR<sup>+</sup> NK subpopulations [69]. In addition to KIR gene content, the expression of KIR allele encoded products (allotypes) on NK cells may differ depending on the allelic polymorphism, as deeply documented for 3DL1 by P. Parham's group [70,71]. We also reported high (3DL1\*001, \*002, \*015, \*008), low (\*005, \*007), or no (\*004, \*019) expression of KIR3DL1 on NK cells depending on the 3DL1 alleles or the 3DL1/S1 allele combinations [46]. The differential expression of KIR3DL1 allotypes could be partially explained by the polymorphisms encountered in the KIR3DL1 promoter [72]. Similarly, three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the recruiting sites of transcriptional factors in the KIR2DL1 promoter induce a higher transcriptional activity of 2DL1 compared to 2DL3 [73]. Similarly to KIR3DL1, the expression level of KIR2DL1 is variable depending on the 2DL1 alleles. In particular, the KIR2DL1\*004 allotype, which carries a cysteine in the intracytoplasmic tail at position 245 (Cys<sup>245</sup>), is poorly expressed on NK cells, with a low frequency of KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells compared to the 2DL1\*002 and \*003 (Arg<sup>245</sup>) allotypes [34,74,75].

KIRs interact with HLA class I molecules. Inhibitory KIR2DL1/2/3 all have HLA-Cw molecules as ligands, which are initially divided into two groups as a function of the 77 and 80 amino acids located in the  $\alpha 2$  domain. KIR2DL1 specifically recognizes the HLA-Cw molecules of group 2 (C2) with Lys<sup>80</sup> [76]. The peptide presented by the HLA-Cw molecule seems to play a role in the binding affinity of KIR2DL1/C2 because a substitution at the P8 position with an acidic residue results in a loss of ligand binding [77,78]. KIR2DL2/3 recognize the HLA-Cw molecules of group C1 (C1) with Asp<sup>80</sup> [79]. However, the recognition of KIR2DL2/3 for C1 is less stringent than the recognition of 2DL1 for C2 because some C2 ligands, such as HLA-Cw4, are also recognized by KIR2DL2/3 [34,80,81]. In addition, the avidity of KIR2DL2 for the C1 ligands is stronger than for 2DL3 [80,82]. Interestingly, the peptide could increase the affinity of KIR2DL2/3 for the C1 ligands, as reported in the context of HCV [83]. KIR2DL4, which is an activating receptor, has the HLA-G molecule as a ligand, which is a nonclassical HLA class I molecule expressed on trophoblast cells during pregnancy [84]. KIR2DS1 recognizes C2 ligands as its inhibitory 2DL1 counterpart, but with a lower affinity [85,86]. KIR2DS2 recognizes C1 ligands and the HLA-A11 molecule [87,88]. As reported for KIR2DL2/3, the recognition of KIR2DS2 of HLA-C molecules is peptide-dependent [88,89]. KIR2DS4 recognizes some HLA-C molecules and the HLA-A11 molecule [90]. To date, the ligands of KIR2DL5 and 2DS3 remain unknown. KIR3DL1 recognizes HLA-B and some HLA-A molecules that bear Bw4 motifs [91,92], while its activating 3DS1 counterpart probably interact with the nonclassical HLA-F molecule [93], although a Bw4 specificity was reported in the context of HIV [94]. KIR3DL2 interacts with HLA-A3/A11 molecules, and this interaction is peptide-dependent,

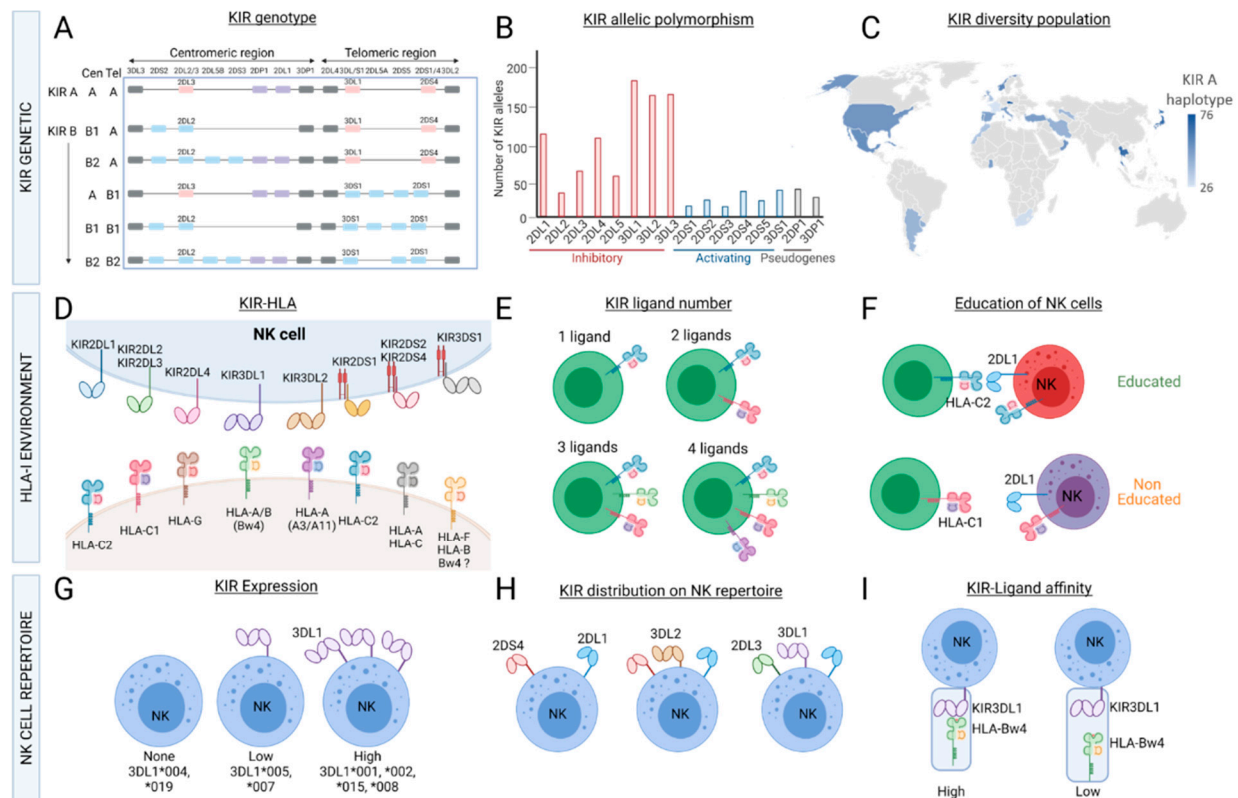
which allows a modulation of receptor ligand interactions [95,96]. In addition to HLA class I ligands, the HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2) molecule, a member of the B7 family that is highly expressed in several solid and hematological cancers, was recently identified as a ligand for KIR3DL3 [97]. HLA class I molecules also play a predominant role in NK cell education or licensing. Four models of NK cell education, which allow for the functional development and tolerance to self in NK cells, have been described [98]. Among them, the “arming” or “licensing” model, which was initially described in mice, involves the engagement of an inhibitory NK receptor with a self-MHC class I molecule, and this engagement educates NK cells to become functionally competent. Conversely, the absence of engagement of the inhibitory NK receptor with its ligand induces so-called “unlicensed” NK cells [99]. The education of KIR<sup>+</sup> NK cells allows these cells to distinguish healthy cells with normal expression levels of HLA class I molecules from those with no or decreased expression of HLA class I molecules, thus referring to the “missing self” theory [7]. Different studies demonstrated the importance of KIR2DL1/2 [7] and 3DL1 [100] in NK cell education. KIR–HLA interactions could also occur in *cis* on NK cells [100]. Overall, NK cell education models are based on inhibitory KIRs, but activating KIRs could also play a role. Indeed, KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells are alloreactive toward C2 targets, but only in C2-individuals [85]. In C2 individuals, KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells become anergic due to the strong and prolonged exposure of 2DS1 to its autologous C2 ligand, which limits the autoreactive immune response [101].

In addition to the phenotype, allelic polymorphisms in KIRs influence the functionality of KIR<sup>+</sup> NK cells. Thus, the lowest recognition of C2 ligands by KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells was observed for the KIR2DL1\*004 allotype [34,74,75]. This decreased recognition was reported to be due to the mutation of Arg<sup>245</sup> to Cys<sup>245</sup>. Indeed, this mutation plays a role in the transduction of inhibitory signals, as KIR2DL1 allotypes carrying Arg<sup>245</sup> recruit SHP-2 and  $\beta$ -arrestin 2 molecules, both of which are important signaling molecules mediated by 2DL1 [74]. Recently, we reported that the KIR2DL1\*002 allotype (Arg<sup>245</sup>) interacts with all C2 targets as observed with the 2DL1\*004 allotype (Cys<sup>245</sup>), suggesting that polymorphic positions other than that of the intracytoplasmic 245 residue may play a crucial role [34]. To a lesser extent, the KIR2DL2/3 allotypes impact the inhibition of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell degranulation, showing a better inhibition with the 2DL2 allotype than with the 2DL3 allotype [102]. The allelic polymorphism of HLA-C could also affect the binding affinity of KIR2DL/HLA-C and the consequent NK cell functionality. Similarly to KIR2D, allelic polymorphisms in KIRs modulate the functionality of KIR3D<sup>+</sup> NK cells, as was found through extensive studies of KIR3DL1 [30,103,104].

HLA-Cw molecules are more specifically dedicated to sensing the level of alteration and/or decreases in HLA class I expression at the surface of tumor cells than to the presentation of peptides to TcR [105]. As described previously, all HLA-Cw molecules are ligands for KIRs in an allele-specific manner [48,106]. In healthy individuals, the expression level of HLA-Cw molecules on fresh PBMCs is lower than that of HLA-A and -B molecules [105]. The differential expression of HLA-Cw molecules according to tissue specificity must be further investigated. The level of HLA-Cw expression varies depending on the HLA-C alleles, HLA haplotypes and polymorphisms encountered in the coding and regulatory regions of the HLA-C gene [107–112]. Genome-wide association studies (GWAS) performed in US blood donors showed a biallelic polymorphism of some SNPs located in the 5'UTR region –800 bp [109] and –35 kb [107] upstream of the initiation codon of the HLA-C gene or in the 3'UTR region [110] that had an effect on the HLA-C expression level. Usually, the expression level of HLA-Cw4 or -Cw6 is higher than that of HLA-Cw2 or -Cw8, but a low expression level was reported for the HLA-Cw7 and -Cw3 molecules. While heterogeneity in the HLA-Cw expression level is observed according to the polymorphisms in the coding and regulatory regions, some discordances remain depending on the population studied (mostly US populations), the methodologies used (e.g., SNPs, evaluation of the HLA-Cw expression level using the HLA-C/HLA-E-specific DT9 mAb, or quantification of mRNA), and the allelic specificities of HLA-C under study.

At present, it is difficult to correlate all HLA-C specificities, SNP polymorphisms, levels of HLA-C transcripts, and the corresponding HLA-Cw expression levels in both healthy individuals and people with diseases.

Overall, the variability in KIR gene content, KIR allele polymorphisms, the HLA class I environment, and the clonal expression of KIRs result in the inter- and intraindividual diversity of the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire (Figure 2).



**Figure 2.** Variability of the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire. KIR genes (7–14) are located in the leucocyte region complex (LRC) on chromosome 19. Depending on the KIR gene content, different KIR haplotypes (A and B) and centromeric/telomeric motifs are defined (A). KIR genes exhibit an allelic polymorphism (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/kir/>) (accessed date: 26 July 2021). (B), and the diversity of KIR haplotypes and/or alleles can be observed worldwide (source provided by Dr J. Hollenbach from the 15th IHWG KIR component) (C). HLA class I molecules are ligands of KIRs (D). Depending on the typing of HLA-A, -B and -C, individuals can present from one to four KIR ligands (E). The HLA class I environment also play a major role in NK cell licensing (F). The allelic polymorphism of KIRs has an impact on the NK cell repertoire, as illustrated for the expression of different KIR3DL1 allotypes (G). KIRs are clonally distributed on NK cells; thus, the heterogeneous repertoire of NK cell subsets is based on the expression of different combinations of KIRs with different frequencies (H). The functions (cytotoxicity, cytokine production) of KIR<sup>+</sup> NK cells and KIR/KIR ligand affinities (I) could be affected by both KIR and HLA class I polymorphisms.

### 3. Impacts of the KIR and HLA Class I Genes on the Antileukemic Effects of NK Cells in Patients with Acute Leukemia

#### 3.1. Expression of HLA Class I Molecules on Leukemic Cells

Impaired recognition of tumor cells is associated with the loss of or decreased HLA expression [15]. This mechanism, which has been described in various solid tumors, could be related to genomic alterations of HLA genes, phenotypic alterations of HLA molecules, or changes in other elements involved in the antigenic presentation machinery. Toffalori et al. elegantly reported an immunological signature of relapse associated with a loss of HLA expression in AML patients [113]. In leukemic patients, the decreased expression of HLA class I molecules may depend on the loci, alleles, tissues, or cells, and it impacts



different HLA molecules, leading to a loss of HLA heterozygosity or a complete HLA haplotype loss [114–116]. The nature of HLA class I downregulation also varies depending on the origin of the leukemia [117]. The decrease in HLA expression occurs most frequently at the time of relapse, thus constituting a potential immunological signature [118]. In 2009, after haplo-identical HLA HSCT, Vago et al. reported a loss of the mismatched HLA haplotype in one-third of the patients (mostly with AML) who relapsed [119]. In a collaborative study, at the time of diagnosis of AML patients, we reported a loss of heterozygosity in the complete HLA region in half of the patients, as well as the loss of the HLA-A, -B, and -C genes—or only the HLA-A gene—in the remaining patients [120].

The impact of the HLA-Cw expression level on clinical outcomes after mismatched HLA-C HSCT remains relatively undocumented. HLA-C mismatches are usually reported to be associated with a higher incidence of acute graft-versus-host disease (GvHD) and higher mortality [121]. However, some frequently encountered HLA-C mismatches, such as HLA-C\*03:03/\*03:04 or HLA-C\*07:01/\*07:02, which correspond to a low HLA-C expression level in recipients and are evaluated using the expected MFI of the corresponding HLA-C specificities, are called permissive in the absence of deleterious effects after unrelated mismatched HLA-C HSCT [122–124]. In contrast, no effects caused by HLA-C level expression, which was evaluated by using the polymorphism of a miRNA in the 3'UTR, were reported after an unrelated HSCT [125]. These discordances could rely on HSCT cohorts or methods to correlate the levels of HLA-C expression according to the HLA-C polymorphism. The level HLA-Cw expression on leukemic cells or on reconstituting immune cells after HSCT is poorly documented due to the lack of specific mAbs available. One could expect that the level of HLA-Cw expression could modulate NK cell functions and their development through their *trans*- and *cis*-interactions with KIRs, respectively.

### 3.2. Antileukemic NK Cell Function in Patients with Acute Leukemia

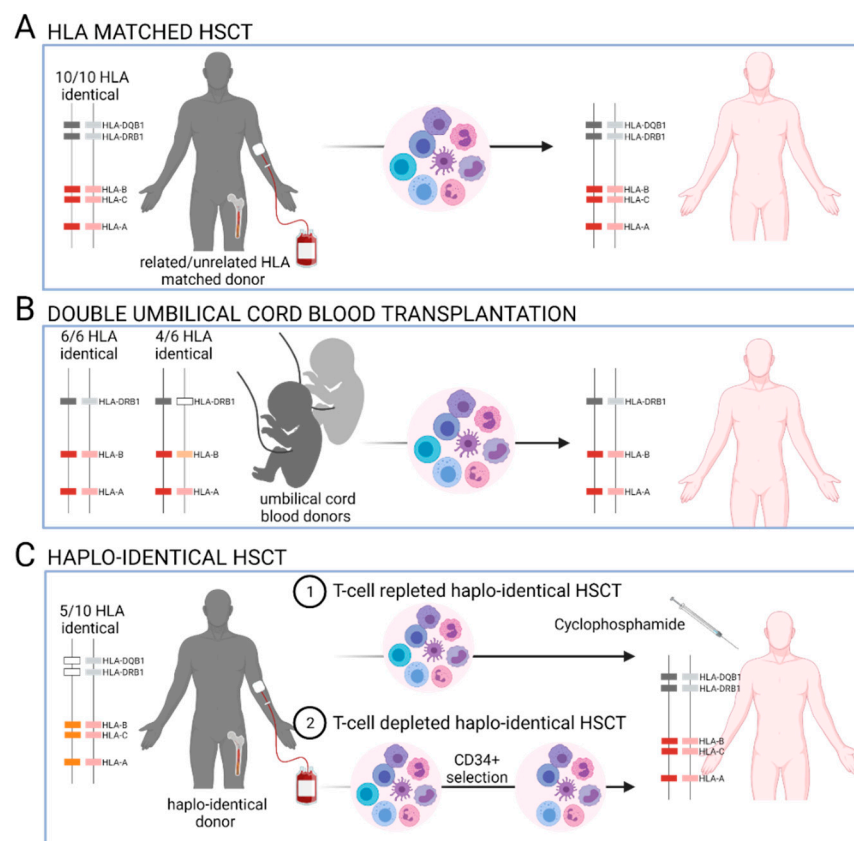
In the context of acute leukemia, NK-cell-mediated immunosurveillance requires the establishment of an immunological synapse between NK cells and the target; this synapse involves the interactions between inhibitory and activating NK receptors and their ligands expressed on leukemic cells. NK cells express a wide range of activating receptors that recognize induced or upregulated molecules on tumor cells [19]. Moreover, cognate ligands are heterogeneously expressed on leukemic cells. In addition to the absence of expression or downregulation of HLA molecules, it was reported that the presence of activating ligands on the surface of leukemic cells was associated with the reduction of relapse incidence and improved overall survival of patients with acute leukemia [126]. We recently reported that ALL targets were better recognized by NK cells than AML targets. However, there is a broad interindividual disparity in NK cell responses against the same leukemic target, which highlights bad and good NK responders. Most effective NK cell subsets against different ALL targets express NKG2A, and these represent the most frequent subset in the NK cell repertoire. In contrast, minority CD57<sup>+</sup> and/or KIR<sup>+</sup> NK cell subsets are more efficient against AML targets [127]. Overall, our data may help to optimize the selection of HSC donors on the basis of immunogenetic KIR/HLA markers and to identify the best NK cell candidates in immunotherapies for AML patients.

## 4. Selection of HSC Donors Based on the HLA and KIR Genes

### 4.1. Selection of HSC Donors Based on HLA Matching

The matching of HLA class I (HLA-A, -B, -C) and class II (HLA-DRB1, -DQB1) genes between the donor and the recipient remains the gold standard [128,129] in order to prevent acute GvHD occurrence, to improve overall survival (OS), and to provide a beneficial GvL effect that is driven by alloreactive T and/or NK cells. The inheritance of HLA genes from the parental haplotypes in blocks results in 25% likelihood of finding a 10/10 HLA-identical donor among a patient's siblings. In the absence of related HLA-identical donors, an unrelated HLA-matched donor is sought in the registries. In an unrelated HSCT, an important feature to consider is that the HLA alleles, haplotype frequencies, and LD

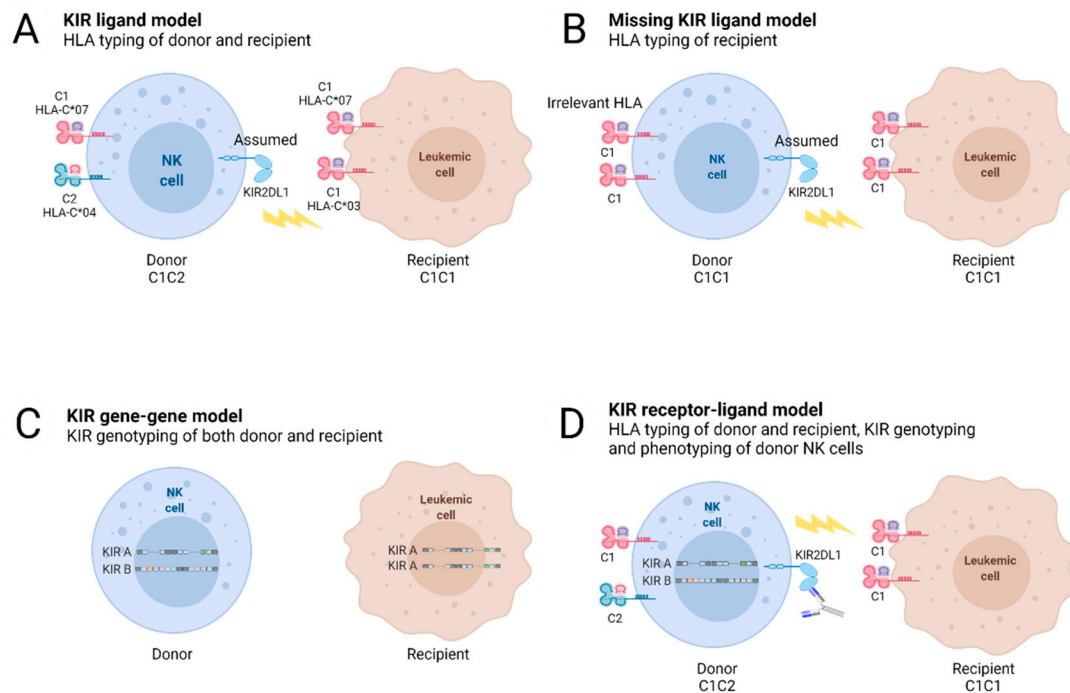
between HLA genes may differ across populations [63]. Although there are more than 30 million potential unrelated HSC donors currently registered worldwide, finding suitably matched donors can be difficult for patients that harbor rare HLA alleles and/or because of the quality of available genotyping information. In the absence of a related or unrelated 10/10 HLA-matched donor, a 9/10 HLA-matched donor with selective mismatches could be selected. From 2010 to 2015, umbilical cord blood donors represented another option. For adult patients, two UCB donors were selected, and the level of HLA matching between the donor and recipient in double umbilical cord blood transplantation (dUCBT) was based on the HLA-A, -B, and -DRB1 genes (4/6 to 6/6 HLA matched). The impact of HLA-C matching remains to be clarified. Over the last 5 years, unmanipulated T-cell-repleted haplo-identical HSCT using cyclophosphamide post-transplantation (haplo-PTCy) as prophylaxis against GvHD has been recommended in the absence of a 10/10 HLA-identical donor. Haplo-PTCy is increasing in use and has shown similar outcomes to those observed after unrelated or even related HLA-matched HSCT [130,131]. Here, donors and recipients share only one HLA haplotype, resulting in a 50% likelihood of finding a haplo-identical donor among one's siblings and, therefore, increasing the number of potential HSC donors. The levels of HLA matching between a HSC donor and a recipient depending on the stem-cell sources are summarized in Figure 3.



**Figure 3.** Donor/recipient HLA matching prior to allogeneic hematopoietic stem-cell transplantations (HSCT). The matching of the HLA-A, -B, -C, -DRB1, and -DQB1 genes between donors and recipients in both haplotypes is usually sought prior to related or unrelated HSCT (A). In the absence of related/unrelated 10/10 HLA-identical donors, double-umbilical cord blood transplantation (dUCBT) could be proposed so that only the matching of the HLA-A, -B, and -DR genes would be considered. In this context, the two UCB units and the recipient usually have 4/6 to 6/6 HLA matches (B). More recently, a donor with a 5/10 HLA-haplo-identical match is sought. The use of cyclophosphamide post-grafting as a prophylaxis against GvHD permits the deletion of the reconstitution of alloreactive T cells from T-repleted grafts (C).

#### 4.2. KIR Models Used to Evaluate NK Cell Alloreactivity and Clinical Outcomes after Allogeneic HSCT

To evaluate the potential alloreactivity of KIR<sup>+</sup> NK cells, the impacts of KIR ligands, KIR genes/genotypes, and KIR/KIR ligand (KIR-L) mismatches have been deeply investigated since 2000 in terms of HSCT outcomes; due to the heterogeneity of the HSCT cohorts and/or the predictive KIR models used, the results were discordant (Figure 4) [132,133].



**Figure 4.** Genetic KIR/KIR ligand models defined to predict potential KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity (adapted from Symons et al. [134]). Genotyping of HLA class I and/or KIR genes permits the establishment of different KIR/KIR ligand models for use in HSCT. Knowledge of the HLA class I typing of donor/recipient pairs permits the identification of KIR ligand mismatches in the graft-versus-host (GvH) direction in HLA-mismatched HSCT, as defined by the KIR ligand model (A) or by the KIR ligands in recipients that show missing KIR ligands (B). In these contexts, the expression of KIR is only predictive. KIR genotyping of donors and recipients permits the assignment of donor and/or recipient KIR genes that impact the HSCT outcome, as defined by the KIR gene/gene model (C). Genotyping of HLA class I genes in donor/recipient pairs and of KIR genes in donors permits the identification of both educated KIR<sup>+</sup> NK cells and missing KIR ligands in recipients (D). In this KIR receptor–ligand model, the expression of KIRs could be assessed using appropriated anti-KIR monoclonal antibodies (mAbs) or could be deduced from the donor’s KIR alleles (D).

The beneficial effect of NK cell alloreactivity based on HLA class I mismatches in terms of KIR ligands in the graft-versus-host direction (GvH) was initially underlined in the context of T-cell-depleted haplo-identical HSCTs, specifically for AML patients without relapse and aGvHD [135,136]. In parallel, the impacts of KIR ligands, donor KIR genes, and KIR-L mismatches on clinical outcomes were investigated after related or unrelated HSCTs, including HLA-matched and HLA-mismatched pairs. Notably, as HLA class I and KIR genes are located on different chromosomes, HLA-matched donor/recipient pairs could present relevant KIR gene mismatches. In related HLA-matched HSCT, the absence of KIR ligands in the recipient (missing KIR ligand, i.e., the absence of Bw4, C1 or C2) for the donor’s inhibitory KIRs was found to either be a beneficial prognostic factor by increasing OS and disease-free survival (DFS) and/or by decreasing relapse incidence for AML patients [137,138] or have no effect [101]. In addition to genetic studies of KIR, different profiles of NK cell reconstitution were reported with the establishment of a donor-like KIR repertoire, showing a gradual reconstitution from 6 to 9 months or longer to 1 year after related HLA-matched HSCT [137]. NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>−</sup> NK cells were shown to

dominate early after HSCT, and NK cells that lacked inhibitory KIRs for self-HLA class I ligands remained tolerant at different points in T-cell-repleted and -depleted HLA-matched sibling HSCTs [101].

In unrelated HSCT, having a missing KIR ligand was found to be a predictive factor for relapse in adult patients with AML in HLA-mismatched pairs [139]. Interestingly, in a large series of unrelated HSCTs, including HLA-matched and single-mismatched pairs, Venstrom et al. reported a reduction in relapses in AML patients that were grafted with KIR2DS1+/C1+ donors [140]. In addition to KIR2DS1, we reported a beneficial impact of KIR3DL1/S1+ grafts in Bw4+ recipients with myeloid diseases on relapse incidence after unrelated HSCT [141]. Venstrom et al. also confirmed the beneficial impact of KIR3DS1+ donors by decreasing treatment-related mortality (TRM) and aGvHD, but found that there was no impact on relapses [142]. More broadly, a specific donor KIR B gene content score that is  $\geq 2$  [143], donor KIR B genotypes [144], or donor KIR CenB02 [145] should be favored for AML patients in order to decrease relapse incidence, which suggests that there is a need to detect the activating KIR genes. Notably, one prospective and multicentric study underlined the feasibility of donor KIR genotyping without delaying grafting [146]. In contrast, the assignment of donor KIR alleles is more time-consuming, and their effect on HSCT outcomes is primarily focused on limited KIR genes with phenotypic and functional characteristics of KIR<sup>+</sup> NK cells, as was reported for KIR2DL1 [147]. Interestingly, a beneficial effect of specific donor KIR3DL1-HLA-B subtypes associated with weak or a lack of inhibition of NK cells was reported in a large series of AML patients that included unrelated 10/10 and 9/10 HLA-matched pairs [148]. Conversely, the genetic combination of donor KIR3DL1+ and patient HLA-A\*24+ is associated with a higher risk of AML relapse following allogeneic HSCT [149]. Schetelig et al. reported that there were no correlations between KIR3DL1/HLA-B combinations and relapse or OS in unrelated HSCTs, which also included 10/10 and 9/10 HLA-matched pairs [150]. Recently, a retrospective study performed on a large cohort of AML patients reported that there was no impact of KIR3DL1/2DS1 or a haplotype-motif-based donor selection algorithm on OS and relapse after unrelated HLA-matched HSCTs [151]. In line with HSCT protocols, the impact of KIR-L mismatches was investigated in adult patients after dUCBTs [152–158]. Once again, conflicting data were reported, which were linked either to the competing KIR models used or the heterogeneity of the patients and treatment modalities.

For the last 5 years, haplo-PTCy has offered a new means of identifying the KIR and/or HLA class I markers that are beneficial in improving the GvL effect driven by NK cells [159,160]. In this context, donors and recipients share only one HLA haplotype; thus, HLA class I mismatches could represent KIR-L mismatches. Donors and recipients could also have different KIR genes. In terms of inhibitory KIR gene mismatches, Symons et al. [134] reported a beneficial effect on the improvement of OS and the decrease in relapse and non-relapse mortality (NRM) after haplo-PTCy in 86 patients with lymphoid and myeloid diseases. Bastos-Oreiro et al. [161] reported the beneficial effect of at least one inhibitory KIR gene mismatch on the improvement of event-free survival (EFS) and the decrease in relapses after haplo-PTCy in 33 patients with various diseases. However, the specificity of the inhibitory KIR gene mismatches was not mentioned. Wanquet et al. [162] reported decreased relapses in patients with active diseases with KIR-L mismatches, but there were no beneficial effects of these mismatches for patients in complete remission after haplo-PTCy. Solomon et al. [163] reported a beneficial effect of KIR-L mismatches on OS and relapses after haplo-PTCy in 208 patients that received either a myeloablative conditioning (MAC) or a reduced-intensity conditioning (RIC) regimen. In 51 patients, which were all treated with an RIC regimen and infused with PBSCs, we reported a beneficial effect of KIR2D/HLA-C mismatches in the GvH direction, by decreasing the relapse incidence while increasing OS, aGvHD, and DFS after haplo-PTCy [164]. In contrast, in AML patients grafted with PBSCs, Shimoni et al. [165] reported a deleterious effect of KIR-L mismatches with increased relapses and decreased OS, after haplo-PTCy. In terms of KIR genotypes, Symons et al. [134] showed in 86 patients that KIR genotype AA recipients

from B<sup>+</sup> KIR donors were associated with fewer relapses. The beneficial effect of donor B<sup>+</sup> KIR was reported in both lymphoid and myeloid diseases and with RIC regimens [134]. Solomon et al. [163] reported a beneficial effect of the donor B<sup>+</sup> KIR genotype on relapse incidence, particularly the presence of the KIR2DS2 gene in 208 patients with various diseases. Mixed bone marrow/PBSCs and both MAC and RIC regimens were used in these series. Lastly, Bastos-Oreiro et al. [161] reported that there was no protective effect of the donor B<sup>+</sup> KIR genotype on relapse incidence after haplo-PTCy in a limited number of patients with mixed conditioning regimens. In terms of KIR gene motifs, we recently reported the impact of the donor KIR cenAA motif on relapse incidence after haplo-PTCy in 39 patients with myeloid diseases, which suggested that the GvL effect could be driven by specific KIR2DL1/3 allotypes [34]. The impact of KIR allele polymorphisms on haplo-PTCy outcomes has not been investigated so far.

Overall, these studies, which were mainly retrospective, demonstrated that the impacts of genetic combinations of KIR ligands, KIR genes, and/or KIR-L differ depending on diseases, immunosuppressive treatments, conditioning regimens, the stem-cell sources, the graft T-cell content, the GvHD prophylaxis, and the degree of HLA matching. However, HLA typing alone is not sufficient for providing the specificities of the donor KIR genes involved. Although the gene frequencies of KIR2DL1/3/3DL1 are close to 100%, allowing speculation about their presence depending on donor KIR ligands, the distinguishing between KIR2DL2 and 2DL3 is essential because their phenotypes and functions in NK cells differ [81]. KIR3DL1 allele typing also permits one to check for the absence of 3DL1\*004, which is frequent in Caucasian people [46]. The reported and divergent effects of KIR/KIR ligand genetic combinations on HSCT outcomes (Table 1) suggest that donor KIR genotyping, including the detection of activating KIR genes, discrimination among KIR gene motifs, KIR allele polymorphisms, and the HLA class I environment, should be considered in order to predict the potential KIR<sup>+</sup> NK cell alloreactivity after HSCT. Given the current literature, it is proposed that an HSC donor with B<sup>+</sup> KIR gene content is selected for HLA-identical HSCTs, and an HSC donor with a KIR cenAA motif is selected for haplo-PTCy in order to limit the relapse incidence in adult patients with AML.

**Table 1.** Impacts of the genetic combinations of KIR/KIR ligands on clinical outcomes for adult AML patients, including selected studies that focused on both HLA-matched and HLA-mismatched HSCTs.

Authors	N	AML <sup>1</sup>	HSCT	HLA	Source <sup>2</sup>	Depletion	Conditioning <sup>3</sup>	Outcome <sup>4</sup>
Hsu et al. [138]	178	32%	Related	Matched	BM	T-cell-depleted	MAC	AML patients with missing KIR ligands (HLA-C or HLA-B ligands): ↗ OS, ↗ DFS, ↘ relapse
Björklund et al. [101]	105	77%	Related	Matched	PBSC (67%) and BM (33%)	T-replete	MAC (72%) and RIC (28%)	No benefit of missing KIR ligand on DFS, relapse, and aGvHD
Hsu et al. [139]	1770	13%	Unrelated	Matched (48%) and mismatched (52%)	unknown	T-replete	MAC	AML patients with missing KIR ligand: ↘ relapse in mismatched HSCT but no impact on matched HSCT



Table 1. Cont.

Authors	N	AML <sup>1</sup>	HSCT	HLA	Source <sup>2</sup>	Depletion	Conditioning <sup>3</sup>	Outcome <sup>4</sup>
Venstrom et al. [140]	1277	100%	Unrelated	Matched (52%) and mismatched (48%)	BM (54%) and PBSC (46%)	T-replete (72%) and T-cell-depleted (28%)	MAC (85%) and RIC (15%)	Donor 2DS1+/C1+: ↘ TRM, ↘ relapse
Gagne et al. [141]	264	52% of acute leukemia	Unrelated	Matched (62%) and mismatched (38%)	BM	T-replete	TBI based (70%)	Donor KIR3DL1/S1+ and recipient Bw4+: ↗ OS, ↘ relapse for HLA-matched and HLA-mismatched HSCTs for malignant diseases
Venstrom et al. [142]	1087	28%	Unrelated	Matched (62%) and mismatched (38%)	BM (97%)	T-replete (80%) and T-cell-depleted (20%)	Unknown	Donor KIR3DS1+: ↘ TRM, ↘ aGvHD, no impact on relapse
Cooley et al. [143]	1409	77%	Unrelated	Matched (50%) and mismatched (50%)	BM (90%) and PBSC (10%)	T-replete	MAC	Donor CenBB or ≥ 2 KIR B gene content: ↗ DFS and ↘ relapse in matched and mismatched HSCTs. Donor TelBB: ↘ relapse
Weisdorf et al. [144]	2662	100%	Unrelated	Matched (89%)	BM (15%) and PBSC (85%)	Unknown	MAC (59%) and RIC (41%)	Donor KIR B haplotype: ↘ relapse only in RIC patients. Donor KIR B genes/ recipient C1+: ↘ relapse
Boudreau et al. [148]	1328	100%	Unrelated	Matched (53%) and mismatched (47%)	BM (54%) and PBSC (46%)	T-replete (92%)	MAC (84%) and RIC (16%)	Donor KIR3DL1/HLA-B subtype combinations linked to weak or non-inhibition: ↘ TRM, ↘ relapse. Distinct beneficial effect of donor KIR2DS1+/C1+
Ploeg et al. [149]	604	100%	Unrelated	Matched (64%) and mismatched (36%)	BM (48%) and PBSC (52%)	T-replete (67%) and T-cell-depleted (33%)	MAC (85%) and RIC (15%)	Donor KIR3DL1+ and recipient HLA-A*24+: ↗ relapse

Table 1. Cont.

Authors	N	AML <sup>1</sup>	HSCT	HLA	Source <sup>2</sup>	Depletion	Conditioning <sup>3</sup>	Outcome <sup>4</sup>
Ruggeri et al. [135]	92	62%	Related	Haplo-identical	unknown	T-cell depleted	Unknown	Donor/recipient KIR ligand mismatches in the GvH direction: no aGvHD and no relapse in AML patients
Symons et al. [134]	86	30%	Related	Haplo-identical	BM	T-replete	RIC, PTCy	Donor/recipient inh.KIR gene MM: ↗ OS, ↘ relapse, donor KIR B/recipient KIR AA ↗ OS, ↘ NRM
Bastos et al. [161]	33	30%	Related	Haplo-identical	unknown	T-replete	RIC (66%) and MAC (34%), PTCy	At least one donor/recipient inh KIR gene MM: ↗ EFS, ↘ relapse. No protective effect of donor B genotype
Wanquet et al. [162]	144	35% of myeloid diseases	Related	Haplo-identical	PBSC (63%) and BM (37%)	T-replete	RIC (87%), MAC (13%), PTCy	Donor/recipient KIR ligand MM in the GvH direction: ↘ relapse, ↗ PFS for patients with active disease but no beneficial effect for patients in complete remission
Solomon et al. [163]	208	34%	Related	Haplo-identical	PBSC and BM	T-replete	MAC (41%), RIC (59%), PTCy	Donor/recipient KIR ligand MM in the GvH direction or donor KIR2DS2+: ↗ OS, ↗ DFS, ↘ relapse. No impact on aGvHD
Shimoni et al. [165]	444	74%	Related	Haplo-identical	BM (53%) and PBSC (47%)	T-replete	MAC (55%) and RIC (45%), PTCy	Donor/recipient KIR ligand MM in the GvH direction: no impact on aGvHD, cGvHD and NRM. In AML patients grafted with PBSCs, ↗ relapse and ↘ OS

Table 1. Cont.

Authors	N	AML <sup>1</sup>	HSCT	HLA	Source <sup>2</sup>	Depletion	Conditioning <sup>3</sup>	Outcome <sup>4</sup>
Willem et al. [164]	51	35%	Related	Haplo-identical	PBSC	T-replete	RIC, PTCy	Donor inh.KIR2D/recipient HLA-C MM: ↗ aGvHD, ↗ OS, ↗ DFS, ↘ relapse
Dubreuil et al. [34]	81	63% myeloid diseases	Related	Haplo-identical	PBSC	T-replete	RIC, PTCy	Donor CenAA: ↘ relapse only in patients with myeloid diseases

<sup>1</sup> AML, acute myeloid leukemia; <sup>2</sup> BM, bone marrow; PBSCs, peripheral blood stem cells; <sup>3</sup> MAC, myeloablative conditioning; PTCy, post-transplant cyclophosphamide; RIC, reduced-intensity regimen; <sup>4</sup> aGvHD, acute graft-versus-host disease; CenAA, centromeric A KIR motif; CenBB, centromeric BB KIR motif; DFS, disease-free survival; HSCT, hematopoietic stem-cell transplantation; inh. KIR, inhibitory KIR; MM, mismatch; NRM, non-relapse mortality; OS, overall survival; PFS, progression-free survival; TRM, treatment-related mortality.

#### 4.3. Reconstitution of NK Cells after T-Replete Haploidentical HSCT

After haplo-PTCy, NK cells rapidly reconstitute the recipient's immune system, as they are the first lymphocytes to mediate a GvL effect, even before T cells [164,166–168]. The prophylaxis against GvHD plays a major role in the modulation of the reconstitution of immune cells and possibly in their function after haplo-HSCT. Recovery of NK cells after haplo-PTCy was reported by Vago's group in 2018 [168]. A similar NK cell recovery was observed in patients who received different PTCy protocols. PTCy first eliminates proliferating donor NK cells; then, an IL15 peak correlated with the kinetics of NK cell recovery appears, and a second wave of reconstituted NK cells with an immature phenotype occurs 2 weeks after HSCT. The development of mature NK cells can take place up to 1 year after HSCT. PTCy decreases NK cell alloreactivity, and the GvL effect is correlated with residual mature NK cells. Overall, there are predictive factors that correspond to the absolute counts of NK cells and the proportion of mature NK cells at day +30. A high expression of KIRs on NK cells at day +30 was correlated with a decreased relapse incidence [168]. Consistently with the data from Russo et al., we evaluated NK cell reconstitution in a cohort of 51 adult patients after haplo-PTCy [164]. KIR2DL2/3<sup>+</sup> and 3DL1<sup>+</sup> NK cell recovery at day +30 was inversely impacted by KIR-L mismatches. The loss of KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cells at day 30 in pairs with inhibitory KIR2D/HLA-C mismatches suggested a deletion of alloreactive KIR<sup>+</sup> NK cells by PTCy [164]. After haplo-PTCy, the reconstitution of T and NK cells revealed increased NK and decreased T-cell frequencies in patients treated with PTCy + ATG compared to PTCy alone [167]. In patients without relapse, the frequency of NKG2A<sup>+</sup> KIR2DL2/3/S2<sup>-</sup> NK cells was increased at day +60 and these cells were more numerous in patients with PTCy + ATG compared to PTCy alone. The use of the NKG2A, CD57, NKG2C, and KIR2DL3 markers expressed on NK cells at day +30 made it possible to define an immature NK cell repertoire (i.e., KIR2DL3<sup>-</sup>NKG2A<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup>) associated with fewer relapses [167]. In contrast, the predominant KIR2DL3<sup>-</sup>NKG2A<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> NK cell subset was associated with a high incidence of relapse [167]. Overall, deciphering the heterogeneity of NK cells is crucial for identifying the NK cell subsets that are efficient against hematological diseases in order to optimize HSC donor selection and, more broadly, NK-cell-based immunotherapies, as discussed below.

#### 5. NK-Cell-Based Immunotherapies Apart from HSCT

In leukemic patients, the functions of NK cells are usually impaired, which is particularly linked to the alteration of their repertoire. Thus, NK-cell-based immunotherapies are devoted to increasing their antileukemic potential in patients by using the addition of specific cytokines, mAbs, and/or the adoptive transfer of unmodified or engineered NK cells [18,19,169–174].



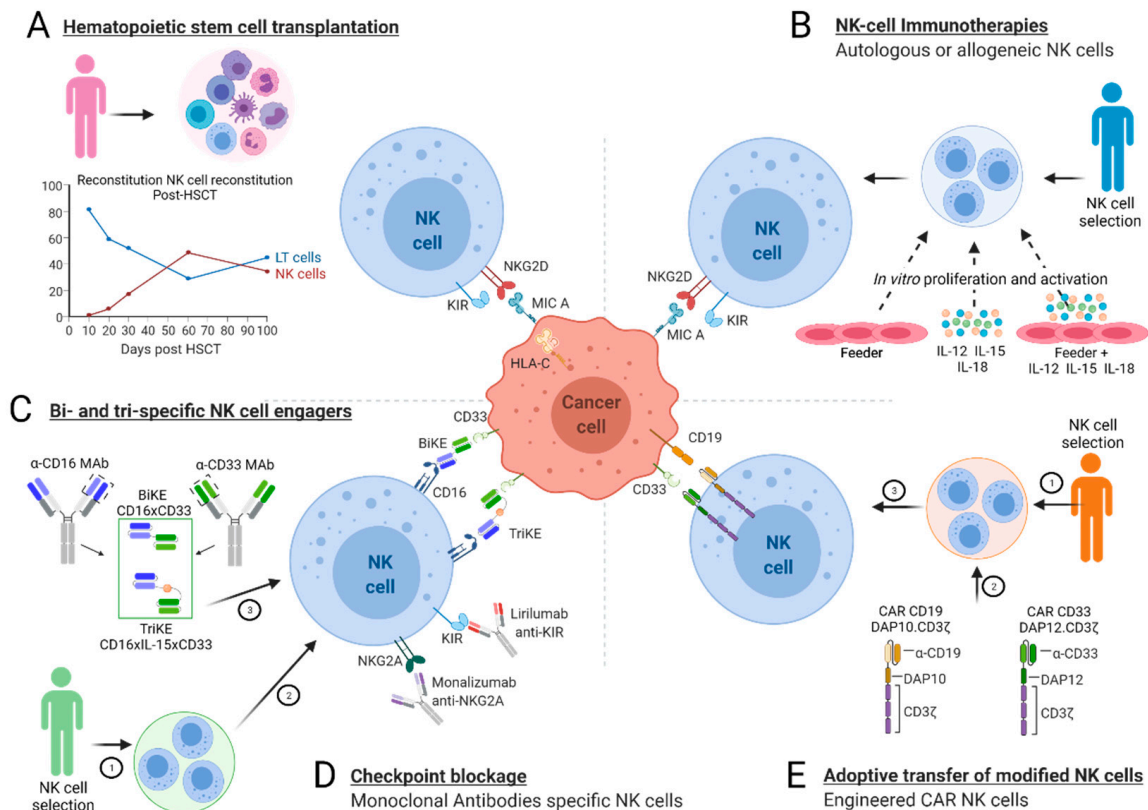
### 5.1. Immune Molecules for Boosting NK Cell Functions in Leukemic Patients

Among the various cytokines, IL-2 and IL-15 are of interest for promoting the survival, proliferation, differentiation, and activation of NK cells. In particular, ALT-803, a superagonist of IL-15 that was administered to 33 patients who relapsed after HSCT, showed a clinical benefit in 19 patients in a phase I trial [175]. In clinical studies that combined ALT-803 with adoptive transfer of NK cells, ALT-803 was expected to enhance the activation, survival, and expansion of donor-derived NK cells. Moreover, the cocktail of IL-12, IL-15, and IL-18 used *in vitro* to promote NK cell proliferation and activation unleashes tumor killing of NK cells via KIR downregulation [176]. Apart from cytokines, mAbs that are specific for tumor antigens could be used to enhance the ADCC function of NK cells through the binding of the IgG Fc fragment with the CD16 receptor. In particular, an Fc-engineered CD133 mAb showed an improved affinity to NK cells and potent NK cell degranulation against AML [177]. Among mAbs, bi- or tri-specific killer engagers (BiKEs, TriKEs) are used to modulate NK cell activity. They are designed to contain variable single-chain fragments that function against both tumor-associated antigens and NK-activating receptors in order to create an immunological synapse between NK cells and tumor cells [178]. In particular, it has been reported that the CD16x33 BiKE targets the CD33 myeloid antigen and triggers the lytic activity of NK cells and the release of cytotoxic granules against AML cells [179] *in vitro*. Moreover, the 161533 TriKE, which consists of an anti-CD16 scFv, a modified IL-15 linker, and an anti-CD33 scFv, could trigger ADCC while increasing both NK cell survival and proliferation against AML targets *in vivo* [180]. NK-cell-based immunotherapies using mAbs could also target immune checkpoints to raise the inhibition driven by NK cells. Interestingly, lirulimab and monalizumab target the pan-KIR and NKG2A inhibitory NK cell receptors, respectively [181]. PD-1 could also represent an interesting target [171]. KIR/HLA interactions could also have an impact on the ADCC function of NK cells, as we recently reported in lymphoma patients who received a rituximab-based anticancer immunotherapy [182].

### 5.2. Adoptive NK Cell Immunotherapies

Infusions of allogeneic NK cells that are activated *ex vivo* or CAR-modified NK cells represent promising immunotherapies against hematologic malignancies. In contrast to T lymphocytes, allogeneic NK cells are not HLA-restricted and can be more safely used. Another advantage is the wide range of NK cell sources such as PB, UCB, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, and NK cell lines [183,184]. In several clinical trials of NK-cell-based immunotherapies, patients received chemotherapy prior to NK cell infusion. Interestingly, the drugs used could stimulate the expression of activating ligands or either downregulate the expression of inhibitory ligands on tumor cell [185] or promote the recruitment of NK cells to the tumor sites by increasing the secretion of selected chemokines. In addition to the adoptive transfer of unmodified NK cells, CAR NK cells could be used. Similarly to CAR T cells, CAR NK cells are composed of an extracellular signaling domain that recognizes specific antigens on tumors, a transmembrane region, and an intracellular domain that activates pathways to enhance the lysis of target cells. CAR NK cells eliminate tumors not only through the ability of CAR to specifically recognize antigen-expressing tumors, but also through NK cell receptors themselves [20]. Preclinical trials of NK cells demonstrated their clinical benefits in AML patients after HSCT. However, the clinical activity of NK cells remains modest at best, which limits their current therapeutic use. CAR-modified NK92 and primary NK cells are currently used against hematological cancers. The tumor antigen that is targeted is often CD19 or CD20, which makes it possible to target B-cell malignancies, such as B-ALL or CD33, in order to target AML [19]. However, some issues related to the survival rate and cytotoxicity of NK cells after thawing need to be solved in order to expand the use of CAR NK cells in clinical applications. New strategies, including the integration of suicide genes into CAR constructs and bispecific CAR molecules, are being developed to increase both the safety and the efficacy of CAR

NK cell therapy [20]. The NK-cell-based immunotherapies used for the treatment of acute leukemia are summarized in Figure 5.



**Figure 5.** NK-cell-based immunotherapies for acute leukemia patients. Because of their antileukemic (GvL) effects, NK cells play a major role, as they are the first cells to reconstitute the recipient's immune system after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (HSCT) (A). Apart from HSCT, the efficiency of NK-cell based immunotherapies could be enhanced with the infusion of autologous or allogeneic NK cells that are activated in vitro using a feeder and/or specific cytokines (B). The use of bi- or tri-specific killer engagers (BiKEs, TriKEs) (C) or specific anti-NK cell receptor monoclonal antibodies (mAbs) (D) could also enhance the GvL function of NK cells. Adoptive transfer of engineered NK cells armed with chimeric antigen receptors (CARs) (E) is another emerging alternative.

Overall, NK-cell-based immunotherapies could be combined to boost the efficacy of NK cells against leukemia, depending on the patients. However, given the heterogeneity of NK cells, the source of NK cells is still a key element, and allogeneic donors should be carefully selected by using specific KIR/HLA markers.

## 6. Conclusions

Polymorphic KIR and HLA class I genes play a major role in the structuration of the functional NK cell repertoire. In the context of HSCT, they are of special interest for the promotion of a beneficial GvL effect in leukemic patients. Haplo-PTCy makes it possible to choose the best HSC donor among different ones. Until now, few studies have focused on the relevance of polymorphic KIR/KIR ligands to the outcomes of haplo-PTCy. One could expect that the consideration of the KIR gene content or specific KIR alleles could help to refine the scores used for HSC donor selection, as well as to evaluate their influence on haplo-PTCy outcomes in patients with high-risk and acute leukemia. The ultimate goal is to define the best KIR and/or HLA markers during HSC donor selection with respect to a beneficial GvL effect and a reduced GvHD incidence after haplo-PTCy. More broadly, the inclusion of KIR/HLA markers should improve the efficiency of allogeneic NK-cell-based immunotherapies, such as treatment with CAR NK cells.

**Author Contributions:** Writing—original draft preparation, L.D. and K.G.; review and editing, L.D., P.C., C.R. and K.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by EFS Centre-Pays de la Loire and by grants from the International Research Group on unrelated Hematopoietic Stem-Cell Transplantation (IRGHET), Etablissement Français du Sang (EFS), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF), and La Ligue contre le Cancer and Agence de la Biomédecine (ABM). L.D. is a PhD student supported by la Région Pays de la Loire/EFS Centre Pays de la Loire (N°2018-09766).

**Acknowledgments:** The authors acknowledge MDPI for English language editing. The figures were created using the BioRender software ([www.BioRender.com](http://www.BioRender.com)).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cooper, M.; Fehniger, T.; Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 633–640. [[CrossRef](#)]
2. Vivier, E.; Artis, D.; Colonna, M.; Dieffenbach, A.; Di Santo, J.P.; Eberl, G.; Koyasu, S.; Locksley, R.M.; McKenzie, A.N.; Mebius, R.E.; et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **2018**, *174*, 1054–1066. [[CrossRef](#)]
3. Schwane, V.; Huynh-Tran, V.H.; Vollmers, S.; Yakup, V.M.; Sauter, J.; Schmidt, A.H.; Peine, S.; Altfeld, M.; Richert, L.; Körner, C. Distinct Signatures in the Receptor Repertoire Discriminate CD56bright and CD56dim Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 568927. [[CrossRef](#)]
4. Kärre, K. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 477–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ljunggren, H.-G.; Kärre, K. In search of the ‘missing self’: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* **1990**, *11*, 237–244. [[CrossRef](#)]
6. Djaoud, Z.; Parham, P. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. *Annu. Rev. Biochem.* **2020**, *89*, 717–739. [[CrossRef](#)]
7. Anfossi, N.; André, P.; Guia, S.; Falk, C.S.; Roetync, S.; Stewart, C.A.; Bresó, V.; Frassati, C.; Reviron, D.; Middleton, D.; et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* **2006**, *25*, 331–342. [[CrossRef](#)]
8. Valiante, N.M.; Uhrberg, M.; Shilling, H.G.; Lienert-Weidenbach, K.; Arnett, K.; D’Andrea, A.; Phillips, J.H.; Lanier, L.L.; Parham, P. Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. *Immunity* **1997**, *7*, 739–751. [[CrossRef](#)]
9. Horowitz, A.; Strauss-Albee, D.; Leipold, M.; Kubo, J.; Nemat-Gorgani, N.; Dogan, O.C.; Dekker, C.L.; Mackey, S.; Maecker, H.; Swan, G.E.; et al. Genetic and Environmental Determinants of Human NK Cell Diversity Revealed by Mass Cytometry. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 208ra145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Parham, P. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 1–5. [[CrossRef](#)]
11. Björkström, N.; Riese, P.; Heuts, F.; Andersson, S.; Fauriat, C.; Ivarsson, M.A.; Björklund, A.T.; Tullberg, M.F.; Michaëlsson, J.; Rottenberg, M.; et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **2010**, *116*, 3853–3864. [[CrossRef](#)]
12. Djaoud, Z.; David, G.; Bressollette, C.; Willem, C.; Rettman, P.; Gagne, K.; Legrand, N.; Mehlal, S.; Cesbron, A.; Imbert-Marcille, B.-M.; et al. Amplified NKG2C+NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 2708–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Malmberg, K.-J.; Béziat, V.; Ljunggren, H.-G. Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *Eur. J. Immunol.* **2012**, *42*, 3141–3145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ljunggren, H.-G.; Malmberg, K.-J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 329–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zeiser, R.; Vago, L. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* **2019**, *133*, 1290–1297. [[CrossRef](#)]
16. Vacca, P.; Montaldo, E.; Croxatto, D.; Moretta, F.; Bertina, A.; Vitale, C.; Locatelli, F.; Mingari, M.C.; Moretta, L. NK Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 188. [[CrossRef](#)]
17. Triplett, B.M.; Horwitz, E.M.; Iyengar, R.; Turner, V.; Holladay, M.S.; Gan, K.; Behm, F.G.; Leung, W. Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* **2009**, *23*, 1278–1287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Hu, W.; Wang, G.; Huang, D.; Sui, M.; Xu, Y. Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1205. [[CrossRef](#)]
19. Shimasaki, N.; Jain, A.; Campana, D. NK cells for cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 200–218. [[CrossRef](#)]
20. Wang, W.; Jiang, J.; Wu, C. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects. *Cancer Lett.* **2020**, *472*, 175–180. [[CrossRef](#)]
21. Chen, S. Releasing the brake in CAR natural killer cells. *Blood* **2021**, *137*, 579–581. [[CrossRef](#)]

22. Borrego, F.; Kabat, J.; Kim, D.-K.; Lieto, L.; Maasho, K.; Peña, J.; Solana, R.; Coligan, J.E. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol. Immunol.* **2002**, *38*, 637–660. [[CrossRef](#)]
23. Trowsdale, J.; Barten, R.; Haude, A.; Stewart, C.A.; Beck, S.; Wilson, M.J. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunol. Rev.* **2001**, *181*, 20–38. [[CrossRef](#)]
24. Hsu, K.C.; Chida, S.; Geraghty, D.E.; Dupont, B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: Gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* **2002**, *190*, 40–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Abraham, J.P.; Barker, D.J.; Robinson, J.; Maccari, G.; Marsh, S.G.E. The IPD Databases: Cataloguing and Understanding Allele Variants. *Methods Mol. Biol.* **2018**, *1802*, 31–48. [[CrossRef](#)]
26. O'Connor, G.M.; McVicar, D.W. The Yin-Yang of KIR3DL1/S1: Molecular Mechanisms and Cellular Function. *Crit. Rev. Immunol.* **2013**, *33*, 203–218. [[CrossRef](#)]
27. Vilches, C.; Pando, M.J.; Parham, P. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* **2000**, *51*, 639–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wilson, M.J.; Torkar, M.; Trowsdale, J. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* **1997**, *49*, 574–579. [[CrossRef](#)]
29. Uhrberg, M.; Valiante, N.M.; Shum, B.P.; Shilling, H.G.; Lienert-Weidenbach, K.; Corliss, B.; Tyan, D.; Lanier, L.L.; Parham, P. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity* **1997**, *7*, 753–763. [[CrossRef](#)]
30. Yawata, M.; Yawata, N.; Draghi, M.; Little, A.-M.; Partheniou, F.; Parham, P. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 633–645. [[CrossRef](#)]
31. Augusto, D.; Norman, P.J.; Dandekar, R.; Hollenbach, J.A. Fluctuating and Geographically Specific Selection Characterize Rapid Evolution of the Human KIR Region. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 989. [[CrossRef](#)]
32. Hollenbach, J.A.; Augusto, D.; Alaez, C.; Bubnova, L.N.; Fae, I.; Fischer, G.; Gonzalez-Galarza, F.F.; Gorodezky, C.; Karabon, L.; Kuśnierczyk, P.; et al. 16thIHIW: Population Global Distribution of Killer Immunoglobulin-like Receptor (KIR) and Ligands. *Int. J. Immunogenet.* **2012**, *40*, 39–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Jiang, W.; Johnson, C.; Jayaraman, J.; Simecek, N.; Noble, J.; Moffatt, M.F.; Cookson, W.O.; Trowsdale, J.; Traherne, J.A. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Res.* **2012**, *22*, 1845–1854. [[CrossRef](#)]
34. Dubreuil, L.; Manianguou, B.; Chevallier, P.; Quémener, A.; Legrand, N.; Béné, M.C.; Willem, C.; David, G.; Alizadeh, M.; Makanga, D.R.; et al. Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers* **2020**, *12*, 3595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Middleton, D.; Meenagh, A.; Gourraud, P.-A. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* **2007**, *59*, 145–158. [[CrossRef](#)]
36. Pyo, C.-W.; Guethlein, L.A.; Vu, Q.; Wang, R.; Abi-Rached, L.; Norman, P.; Marsh, S.G.E.; Miller, J.S.; Parham, P.; Geraghty, D.E. Different Patterns of Evolution in the Centromeric and Telomeric Regions of Group A and B Haplotypes of the Human Killer Cell Ig-Like Receptor Locus. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Vendelbosch, S.; De Boer, M.; Gouw, R.A.T.W.; Ho, C.K.Y.; Geissler, J.; Swelsen, W.T.N.; Moorhouse, M.J.; Lardy, N.M.; Roos, D.; Berg, T.K.V.D.; et al. Extensive Variation in Gene Copy Number at the Killer Immunoglobulin-Like Receptor Locus in Humans. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e67619. [[CrossRef](#)]
38. Traherne, J.A.; Martin, M.; Ward, R.; Ohashi, M.; Pellett, F.; Gladman, D.; Middleton, D.; Carrington, M.; Trowsdale, J. Mechanisms of copy number variation and hybrid gene formation in the KIR immune gene complex. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *19*, 737–751. [[CrossRef](#)]
39. Robinson, J.; Halliwell, J.A.; McWilliam, H.; López, R.; Marsh, S.G.E. IPD—The Immuno Polymorphism Database. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D1234–D1240. [[CrossRef](#)]
40. Schellekens, J.; Gagne, K.; Marsh, S.G.E. Natural Killer Cells and Killer-Cell Immunoglobulin-Like Receptor Polymorphisms: Their Role in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *1109*, 139–158. [[CrossRef](#)]
41. Manianguou, B.; Legrand, N.; Alizadeh, M.; Guyet, U.; Willem, C.; David, G.; Charpentier, E.; Walencik, A.; Retière, C.; Gagne, K.; et al. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 547. [[CrossRef](#)]
42. Wagner, I.; Schefzyk, D.; Pruschke, J.; Schöfl, G.; Schöne, B.; Gruber, N.; Lang, K.; Hofmann, J.; Gnahn, C.; Heyn, B.; et al. Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2843. [[CrossRef](#)]
43. Norman, P.J.; Hollenbach, J.A.; Nemat-Gorgani, N.; Marin, W.M.; Norberg, S.J.; Ashouri, E.; Jayaraman, J.; Wroblewski, E.E.; Trowsdale, J.; Rajalingam, R.; et al. Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *99*, 375–391. [[CrossRef](#)]
44. Meenagh, A.; Gonzalez, A.; Sleator, C.; McQuaid, S.; Middleton, D. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity, KIR2DL1 and KIR2DS1. *Tissue Antigens* **2008**, *72*, 383–391. [[CrossRef](#)]
45. Pando, M.J.; Gardiner, C.; Gleimer, M.; McQueen, K.L.; Parham, P. The Protein Made from a Common Allele of KIR3DL1(3DL1\*004) Is Poorly Expressed at Cell Surfaces due to Substitution at Positions 86 in Ig Domain 0 and 182 in Ig Domain 1. *J. Immunol.* **2003**, *171*, 6640–6649. [[CrossRef](#)]



46. Gagne, K.; Willem, C.; Legrand, N.; Djaoud, Z.; David, G.; Rettman, P.; Bressollette-Bodin, C.; Senitzer, D.; Esbelin, J.; Cesbron-Gautier, A.; et al. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43*, 1085–1098. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Shilling, H.G.; Guethlein, L.A.; Cheng, N.W.; Gardiner, C.M.; Rodriguez, R.; Tyan, D.; Parham, P. Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 2307–2315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hilton, H.; Guethlein, L.A.; Goyos, A.; Nemat-Gorgani, N.; Bushnell, D.A.; Norman, P.; Parham, P. Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3160–3170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Huhn, O.; Chazara, O.; Ivarsson, M.A.; Retière, C.; Venkatesan, T.C.; Norman, P.J.; Hilton, H.G.; Jayaraman, J.; Traherne, J.A.; Trowsdale, J.; et al. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 2593–2601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Vargas, L.D.B.; Dourado, R.M.; Amorim, L.M.; Ho, B.; Calonga-Solís, V.; Issler, H.C.; Marin, W.M.; Beltrame, M.H.; Petzl-Erler, M.L.; Hollenbach, J.A.; et al. Single Nucleotide Polymorphism in KIR2DL1 Is Associated With HLA-C Expression in Global Populations. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 1881. [[CrossRef](#)]
51. Bono, M.; Pende, D.; Bertaina, A.; Moretta, A.; Della Chiesa, M.; Sivori, S.; Zecca, M.; Locatelli, F.; Moretta, L.; Bottino, C.; et al. Analysis of KIR3DP1 Polymorphism Provides Relevant Information on Centromeric KIR Gene Content. *J. Immunol.* **2018**, *201*, 1460–1467. [[CrossRef](#)]
52. Spierings, E.; Fleischhauer, K. Histocompatibility. In *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*; Carreras, E., Dufour, C., Mohty, M., Kröger, N., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; ISBN 978-3-030-02277-8.
53. Robinson, J.; Barker, D.J.; Georgiou, X.; Cooper, M.A.; Flicek, P.; Marsh, S.G.E. IPD-IMGT/HLA Database. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *48*, D948–D955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Trowsdale, J.; Knight, J.C. Major Histocompatibility Complex Genomics and Human Disease. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* **2013**, *14*, 301–323. [[CrossRef](#)]
55. Robinson, J.; Guethlein, L.A.; Cereb, N.; Yang, S.Y.; Norman, P.J.; Marsh, S.G.E.; Parham, P. Distinguishing functional polymorphism from random variation in the sequences of >10,000 HLA-A, -B and -C alleles. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006862. [[CrossRef](#)]
56. Dos Santos, E.J.M.; McCabe, A.; Gonzalez-Galarza, F.F.; Jones, A.; Middleton, D. Allele Frequencies Net Database: Improvements for storage of individual genotypes and analysis of existing data. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 238–248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Creary, L.E.; Gangavarapu, S.; Mallempati, K.C.; Montero-Martín, G.; Caillier, S.J.; Santaniello, A.; Hollenbach, J.A.; Oksenberg, J.R.; Fernández-Viña, M.A. Next-generation sequencing reveals new information about HLA allele and haplotype diversity in a large European American population. *Hum. Immunol.* **2019**, *80*, 807–822. [[CrossRef](#)]
58. Osogawa, K.; Mallempati, K.C.; Gangavarapu, S.; Oki, A.; Gendzekhadze, K.; Marino, S.R.; Brown, N.K.; Bettinotti, M.P.; Weimer, E.; Montero-Martín, G.; et al. HLA alleles and haplotypes observed in 263 US families. *Hum. Immunol.* **2019**, *80*, 644–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Li, H.; Ivarsson, M.A.; Walker-Sperling, V.E.; Subleski, J.; Johnson, J.; Wright, P.W.; Carrington, M.; Björkström, N.K.; McVicar, D.W.; Anderson, S.K. Identification of an elaborate NK-specific system regulating HLA-C expression. *PLoS Genet.* **2018**, *14*, e1007163. [[CrossRef](#)]
60. Mayor, N.P.; Robinson, J.; McWhinnie, A.J.M.; Ranade, S.; Eng, K.; Midwinter, W.; Bultitude, W.; Chin, C.-S.; Bowman, B.; Marks, P.; et al. HLA Typing for the Next Generation. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127153. [[CrossRef](#)]
61. Schöfl, G.; Lang, K.; Quenzel, P.; Böhme, I.; Sauter, J.; Hofmann, J.A.; Pingel, J.; Schmidt, A.H.; Lange, V. 2.7 million samples genotyped for HLA by next generation sequencing: Lessons learned. *BMC Genom.* **2017**, *18*, 161. [[CrossRef](#)]
62. Carapito, R.; Radosavljevic, M.; Bahram, S. Next-Generation Sequencing of the HLA locus: Methods and impacts on HLA typing, population genetics and disease association studies. *Hum. Immunol.* **2016**, *77*, 1016–1023. [[CrossRef](#)]
63. Sanchez-Mazas, A.; Nunes, J.M.; Middleton, D.; Sauter, J.; Buhler, S.; McCabe, A.; Hofmann, J.; Baier, D.M.; Schmidt, A.H.; Nicoloso, G.; et al. Common and well-documented HLA alleles over all of Europe and within European sub-regions: A catalogue from the European Federation for Immunogenetics. *HLA* **2017**, *89*, 104–113. [[CrossRef](#)]
64. Carapito, R.; Bahram, S. Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 88–116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Braud, V.M.; Allan, D.S.; McMichael, A.J. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* **1999**, *11*, 100–108. [[CrossRef](#)]
66. Manser, A.R.; Weinhold, S.; Uhrberg, M. Human KIR repertoires: Shaped by genetic diversity and evolution. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 178–196. [[CrossRef](#)]
67. Uhrberg, M. Shaping the human NK cell repertoire: An epigenetic glance at KIR gene regulation. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 471–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. David, G.; Morvan, M.; Gagne, K.; Kerdudou, N.; Willem, C.; Devys, A.; Bonneville, M.; Folléa, G.; Bignon, J.-D.; Retière, C. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* **2009**, *128*, 172–184. [[CrossRef](#)]
69. Schönberg, K.; Sribar, M.; Enczmann, J.; Fischer, J.C.; Uhrberg, M. Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. *Blood* **2011**, *117*, 98–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

70. Gardiner, C.M.; Guethlein, L.A.; Shilling, H.G.; Pando, M.; Carr, W.H.; Rajalingam, R.; Vilches, C.; Parham, P. Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *J. Immunol.* **2001**, *166*, 2992–3001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Parham, P.; Norman, P.J.; Abi-Rached, L.; Guethlein, L.A. Variable NK Cell Receptors Exemplified by Human KIR3DL1/S1. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 11–19. [[CrossRef](#)]
72. Li, H.; Pascal, V.; Martin, M.P.; Carrington, M.; Anderson, S.K. Genetic Control of Variegated KIR Gene Expression: Polymorphisms of the Bi-Directional KIR3DL1 Promoter Are Associated with Distinct Frequencies of Gene Expression. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e1000254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Li, H.; Wright, P.W.; McCullen, M.; Anderson, S.K. Characterization of KIR intermediate promoters reveals four promoter types associated with distinct expression patterns of KIR subtypes. *Genes Immun.* **2015**, *17*, 66–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Bari, R.; Bell, T.; Leung, W.-H.; Vong, Q.P.; Chan, W.K.; Das Gupta, N.; Holladay, M.; Rooney, B.; Leung, W. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood* **2009**, *114*, 5182–5190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Le Luduec, J.-B.; Boudreau, J.E.; Freiberg, J.C.; Hsu, K.C. Novel Approach to Cell Surface Discrimination Between KIR2DL1 Subtypes and KIR2DS1 Identifies Hierarchies in NK Repertoire, Education, and Tolerance. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Fan, Q.R.; Long, E.O.; Wiley, D.C. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1–HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 452–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Rajagopalan, S.; Long, E.O. The Direct Binding of a p58 Killer Cell Inhibitory Receptor to Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-Cw4 Exhibits Peptide Selectivity. *J. Exp. Med.* **1997**, *185*, 1523–1528. [[CrossRef](#)]
78. Saunders, P.M.; Vivian, J.; O’Connor, G.; Sullivan, L.; Pymm, P.G.; Rossjohn, J.; Brooks, A.G. A bird’s eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 148–166. [[CrossRef](#)]
79. Boyington, J.C.; Motyka, S.A.; Schuck, P.; Brooks, A.; Sun, P.D. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* **2000**, *405*, 537–543. [[CrossRef](#)]
80. Moesta, A.; Norman, P.; Yawata, M.; Yawata, N.; Gleimer, M.; Parham, P. Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-Binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C Than KIR2DL3. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 3969–3979. [[CrossRef](#)]
81. David, G.; Djaoud, Z.; Willem, C.; Legrand, N.; Rettman, P.; Gagne, K.; Cesbron, A.; Retière, C. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4778–4788. [[CrossRef](#)]
82. Frazier, W.R.; Steiner, N.; Hou, L.; Dakshnamurthy, S.; Hurley, C.K. Allelic Variation in KIR2DL3 Generates a KIR2DL2-like Receptor with Increased Binding to its HLA-C Ligand. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 6198–6208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Lunemann, S.; Martus, G.; Hölzemer, A.; Chapel, A.; Ziegler, M.; Körner, C.; Beltran, W.G.; Carrington, M.; Wedemeyer, H.; Altfeld, M. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C\*03:04 and modulate NK cell function. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, 252–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Eragopalan, S.; Long, E.O. KIR2DL4 (CD158d): An activation receptor for HLA-G. *Front. Immunol.* **2012**, *3*, 258. [[CrossRef](#)]
85. Morvan, M.; David, G.; Sébille, V.; Perrin, A.; Gagne, K.; Willem, C.; Kerdudou, N.; Denis, L.; Clemenceau, B.; Folléa, G.; et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 3474–3486. [[CrossRef](#)]
86. Moretta, A.; Sivori, S.; Vitale, M.; Pende, D.; Morelli, L.; Augugliaro, R.; Bottino, C.; Moretta, L. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **1995**, *182*, 875–884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Liu, J.; Xiao, Z.; Ko, H.L.; Shen, M.; Ren, E.C. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A\*11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 2662–2667. [[CrossRef](#)]
88. Naiyer, M.M.; Cassidy, S.A.; Magri, A.; Cowton, V.; Chen, K.; Mansour, S.; Kranidioti, H.; Mbirbindi, B.; Rettman, P.; Harris, S.; et al. KIR2DS2 recognizes conserved peptides derived from viral helicases in the context of HLA-C. *Sci. Immunol.* **2017**, *2*, eaal5296. [[CrossRef](#)]
89. Rettman, P.; Blunt, M.D.; Fulton, R.J.; Vallejo, A.F.; Bastidas-Legarda, L.Y.; España-Serrano, L.; Polak, M.E.; Al-Shamkhani, A.; Retiere, C.; Khakoo, S.I. Peptide: MHC-based DNA vaccination strategy to activate natural killer cells by targeting killer cell immunoglobulin-like receptors. *J. Immunother. Cancer* **2021**, *9*, e001912. [[CrossRef](#)]
90. Graef, T.; Moesta, A.; Norman, P.; Abi-Rached, L.; Vago, L.; Aguilar, A.M.O.; Gleimer, M.; Hammond, J.; Guethlein, L.A.; Bushnell, D.A.; et al. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 2557–2572. [[CrossRef](#)]
91. Vitale, M.; Sivori, S.; Pende, D.; Augugliaro, R.; Di Donato, C.; Amoroso, A.; Malnati, M.; Bottino, C.; Moretta, L. Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: Their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 1453–1457. [[CrossRef](#)]
92. Stern, M.; Ruggeri, L.; Capanni, M.; Mancusi, A.; Velardi, A. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* **2008**, *112*, 708–710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Burian, A.; Wang, K.L.; Finton, K.A.K.; Lee, N.; Ishitani, A.; Strong, R.K.; Geraghty, D.E. HLA-F and MHC-I Open Conformers Bind Natural Killer Cell Ig-Like Receptor KIR3DS1. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0163297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

94. Martin, M.P.; Gao, X.; Lee, J.-H.; Nelson, G.W.; Detels, R.; Goedert, J.J.; Buchbinder, S.; Hoots, K.; Vlahov, D.; Trowsdale, J.; et al. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat. Genet.* **2002**, *31*, 429–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Döhning, C.; Scheidegger, D.; Samaridis, J.; Cella, M.; Colonna, M. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A12. *J. Immunol.* **1996**, *156*, 3098–3101. [[PubMed](#)]
96. Hansasuta, P.; Dong, T.; Thananchai, H.; Weekes, M.; Willberg, C.; Aldemir, H.; Rowland-Jones, S.; Braud, V.M. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1673–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Bhatt, R.S.; Berjis, A.; Konge, J.C.; Mahoney, K.M.; Klee, A.N.; Freeman, S.S.; Chen, C.-H.; Jegede, O.A.; Catalano, P.J.; Pignon, J.-C.; et al. KIR3DL3 Is an Inhibitory Receptor for HHLA2 that Mediates an Alternative Immunoinhibitory Pathway to PD1. *Cancer Immunol. Res.* **2021**, *9*, 156–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Höglund, P.; Brodin, P. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 724–734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Yokoyama, W.M.; Kim, S. Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I. *Immunol. Rev.* **2006**, *214*, 143–154. [[CrossRef](#)]
100. Boudreau, J.; Mulrooney, T.J.; LE Ludeuc, J.-B.; Barker, E.; Hsu, K.C. KIR3DL1 and HLA-B Density and Binding Calibrate NK Education and Response to HIV. *J. Immunol.* **2016**, *196*, 3398–3410. [[CrossRef](#)]
101. Björklund, A.T.; Schaffer, M.; Fauriat, C.; Ringdén, O.; Remberger, M.; Hammarstedt, C.; Barrett, A.J.; Ljungman, P.; Ljunggren, H.-G.; Malmberg, K.-J. NK cells expressing inhibitory KIR for non-self-ligands remain tolerant in HLA-matched sibling stem cell transplantation. *Blood* **2010**, *115*, 2686–2694. [[CrossRef](#)]
102. Winter, C.C.; Gumperz, J.E.; Parham, P.; Long, E.O.; Wagtmann, N. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J. Immunol.* **1998**, *161*, 571–577. [[PubMed](#)]
103. Carr, W.H.; Pando, M.J.; Parham, P. KIR3DL1 Polymorphisms That Affect NK Cell Inhibition by HLA-Bw4 Ligand. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 5222–5229. [[CrossRef](#)]
104. O'Connor, G.M.; Guinan, K.; Cunningham, R.T.; Middleton, D.; Parham, P.; Gardiner, C.M. Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells. *J. Immunol.* **2006**, *178*, 235–241. [[CrossRef](#)]
105. Anderson, S.K. Molecular evolution of elements controlling HLA-C expression: Adaptation to a role as a killer-cell immunoglobulin-like receptor ligand regulating natural killer cell function. *HLA* **2018**, *92*, 271–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Hilton, H.G.; Parham, P. Missing or altered self: Human NK cell receptors that recognize HLA-C. *Immunogenetics* **2017**, *69*, 567–579. [[CrossRef](#)]
107. Apps, R.; Qi, Y.; Carlson, J.M.; Chen, H.; Gao, X.; Thomas, R.; Yuki, Y.; Del Prete, G.Q.; Goulder, P.; Brumme, Z.L.; et al. Influence of HLA-C Expression Level on HIV Control. *Science* **2013**, *340*, 87–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Eisraeli, M.; Roelen, D.L.; Ecarrington, M.; Petersdorf, E.W.; Claas, F.H.J.; Haasnoot, G.W.; Eoudshoorn, M. Association between CTL Precursor Frequency to HLA-C Mismatches and HLA-C Antigen Cell Surface Expression. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 547. [[CrossRef](#)]
109. Vince, N.; Li, H.; Ramsuran, V.; Naranbhai, V.; Duh, F.-M.; Fairfax, B.P.; Saleh, B.; Knight, J.; Anderson, S.; Carrington, M. HLA-C Level Is Regulated by a Polymorphic Oct1 Binding Site in the HLA-C Promoter Region. *Am. J. Hum. Genet.* **2016**, *99*, 1353–1358. [[CrossRef](#)]
110. Kulkarni, S.; Qi, Y.; O'Huigin, C.; Pereyra, F.; Ramsuran, V.; McLaren, P.; Fellay, J.; Nelson, G.; Chen, H.; Liao, W.; et al. Genetic interplay between HLA-C and MIR148A in HIV control and Crohn disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 20705–20710. [[CrossRef](#)]
111. Kaur, G.; Gras, S.; Mobbs, J.; Vivian, J.; Cortes, A.; Barber, T.; Kuttikkatte, S.B.; Jensen, L.T.; Attfield, K.; Dendrou, C.; et al. Structural and regulatory diversity shape HLA-C protein expression levels. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15924. [[CrossRef](#)]
112. René, C.; Lozano, C.; Eliaou, J.-F. Expression of classical HLA class I molecules: Regulation and clinical impacts: Julia Bodmer Award Review 2015. *HLA* **2016**, *87*, 338–349. [[CrossRef](#)]
113. Toffalori, C.; Zito, L.; Gambacorta, V.; Riba, M.; Oliveira, G.; Bucci, G.; Barcella, M.; Spinelli, O.; Greco, R.; Crucitti, L.; et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 603–611. [[CrossRef](#)]
114. Verheyden, S.; Demanet, C. NK cell receptors and their ligands in leukemia. *Leukemia* **2007**, *22*, 249–257. [[CrossRef](#)]
115. Verheyden, S.; Ferrone, S.; Mulder, A.; Claas, F.H.; Schots, R.; De Moerloose, B.; Benoit, Y.; Demanet, C. Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *58*, 855–865. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Varbanova, V.; Naumova, E.; Mihaylova, A. Killer-cell immunoglobulin-like receptor genes and ligands and their role in hematologic malignancies. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 427–440. [[CrossRef](#)]
117. Masuda, K.; Hiraki, A.; Fujii, N.; Watanabe, T.; Tanaka, M.; Matsue, K.; Ogama, Y.; Ouchida, M.; Shimizu, K.; Ikeda, K.; et al. Loss or down-regulation of HLA class I expression at the allelic level in freshly isolated leukemic blasts. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 102–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Ahci, M.; Toffalori, C.; Bouwmans, E.; Crivello, P.; Brambati, C.; Pultrone, C.; Stempelmann, K.; Bost, D.; Mazzi, B.; Beelen, D.W.; et al. A new tool for rapid and reliable diagnosis of HLA loss relapses after HSCT. *Blood* **2017**, *130*, 1270–1273. [[CrossRef](#)]



119. Vago, L.; Perna, S.K.; Zanussi, M.; Mazzi, B.; Barlassina, C.; Lupo-Stanghellini, M.T.; Perrelli, N.F.; Cosentino, C.; Torri, F.; Angius, A.; et al. Loss of Mismatched HLA in Leukemia after Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 478–488. [[CrossRef](#)]
120. Dubois, V.; Sloan-Béna, F.; Cesbron, A.; Hepkema, B.G.; Gagne, K.; Gimelli, S.; Heim, D.; Tichelli, A.; Delaunay, J.; Drouet, M.; et al. Pretransplant HLA mistyping in diagnostic samples of acute myeloid leukemia patients due to acquired uniparental disomy. *Leukemia* **2012**, *26*, 2079–2085. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Etiercy, J.-M. HLA-C Incompatibilities in Allogeneic Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 216. [[CrossRef](#)]
122. Petersdorf, E.W.; Gooley, T.A.; Malkki, M.; Bacigalupo, A.P.; Cesbron, A.; Du Toit, E.; Ehninger, G.; Egeland, T.; Fischer, G.F.; Gervais, T.; et al. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood* **2014**, *124*, 3996–4003. [[CrossRef](#)]
123. Fernandez-Viña, M.A.; Wang, T.; Lee, S.J.; Haagenson, M.; Aljurf, M.; Askar, M.; Battiwalla, M.; Baxter-Lowe, L.-A.; Gajewski, J.; Jakubowski, A.A.; et al. Identification of a permissible HLA mismatch in hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2014**, *123*, 1270–1278. [[CrossRef](#)]
124. Fernández-Viña, M.A. HLA allotype expressivity in transplantation. *Blood* **2014**, *124*, 3839–3840. [[CrossRef](#)]
125. Hoff, G.A.; Fischer, J.C.; Hsu, K.; Cooley, S.; Miller, J.S.; Wang, T.; Haagenson, M.; Spellman, S.; Lee, S.J.; Uhrberg, M.; et al. Recipient HLA-C Haplotypes and microRNA 148a/b Binding Sites Have No Impact on Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2017**, *23*, 153–160. [[CrossRef](#)]
126. Mastaglio, S.; Wong, E.; Perera, T.; Ripley, J.; Blombery, P.; Smyth, M.J.; Koldej, R.; Ritchie, D. Natural killer receptor ligand expression on acute myeloid leukemia impacts survival and relapse after chemotherapy. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 335–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Makanga, D.R.; Da Rin de Lorenzo, F.; David, G.; Willem, C.; Dubreuil, L.; Legrand, N.; Guillaume, T.; Peterlin, P.; LeBourgeois, A.; Béné, M.C.; et al. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers* **2020**, *12*, 1927. [[CrossRef](#)]
128. Lee, S.J.; Klein, J.; Haagenson, M.; Baxter-Lowe, L.A.; Confer, D.L.; Eapen, M.; Fernandez-Vina, M.; Flomenberg, N.; Horowitz, M.; Hurley, C.K.; et al. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood* **2007**, *110*, 4576–4583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Petersdorf, E.W. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **2008**, *20*, 588–593. [[CrossRef](#)]
130. Nagler, A.; Ruggeri, A. Haploidentical stem cell transplantation (HaploSCT) for patients with acute leukemia—an update on behalf of the ALWP of the EBMT. *Bone Marrow Transpl.* **2019**, *54*, 713–718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Mohty, M. Haploidentical transplantation: Finally, some light. *Blood* **2021**, *137*, 296–297. [[CrossRef](#)]
132. Bignon, J.-D.; Gagne, K. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* **2005**, *17*, 553–559. [[CrossRef](#)]
133. Leung, W. Use of NK cell activity in cure by transplant. *Br. J. Haematol.* **2011**, *155*, 14–29. [[CrossRef](#)]
134. Symons, H.J.; Leffell, M.S.; Rossiter, N.D.; Zahurak, M.; Jones, R.J.; Fuchs, E.J. Improved Survival with Inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) Gene Mismatches and KIR Haplotype B Donors after Nonmyeloablative, HLA-Haploidentical Bone Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transpl. J. Am. Soc. Blood Marrow Transpl.* **2010**, *16*, 533–542. [[CrossRef](#)]
135. Ruggeri, L.; Capanni, M.; Urbani, E.; Perruccio, K.; Shlomchik, W.D.; Tosti, A.; Posati, S.; Rogaia, D.; Frassoni, F.; Aversa, F.; et al. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* **2002**, *295*, 2097–2100. [[CrossRef](#)]
136. Locatelli, F.; Pende, D.; Falco, M.; Della Chiesa, M.; Moretta, A.; Moretta, L. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends Immunol.* **2018**, *39*, 577–590. [[CrossRef](#)]
137. Shilling, H.G.; McQueen, K.L.; Cheng, N.W.; Shizuru, J.A.; Negrin, R.S.; Parham, P. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* **2003**, *101*, 3730–3740. [[CrossRef](#)]
138. Hsu, K.C.; Keever-Taylor, C.; Wilton, A.; Pinto, C.; Heller, G.; Arkun, K.; O’Reilly, R.J.; Horowitz, M.M.; Dupont, B. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* **2005**, *105*, 4878–4884. [[CrossRef](#)]
139. Hsu, K.C.; Gooley, T.; Malkki, M.; Pinto-Agnello, C.; Dupont, B.; Bignon, J.-D.; Bornhäuser, M.; Christiansen, F.; Gratwohl, A.; Morishima, Y.; et al. KIR Ligands and Prediction of Relapse after Unrelated Donor Hematopoietic Cell Transplantation for Hematologic Malignancy. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2006**, *12*, 828–836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Venstrom, J.M.; Pittari, G.; Gooley, T.A.; Cheurning, J.H.; Spellman, S.; Haagenson, M.; Gallagher, M.M.; Malkki, M.; Petersdorf, E.; Dupont, B.; et al. HLA-C-Dependent Prevention of Leukemia Relapse by Donor Activating KIR2DS1. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *367*, 805–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
141. Gagne, K.; Busson, M.; Bignon, J.-D.; Balère-Appert, M.-L.; Loiseau, P.; Dormoy, A.; Dubois, V.; Perrier, P.; Jollet, I.; Bois, M.; et al. Donor KIR3DL1/3DS1 Gene and Recipient Bw4 KIR Ligand as Prognostic Markers for Outcome in Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2009**, *15*, 1366–1375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Venstrom, J.M.; Gooley, T.A.; Spellman, S.; Pring, J.; Malkki, M.; Dupont, B.; Petersdorf, E.; Hsu, K.C. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2010**, *115*, 3162–3165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



143. Cooley, S.; Weisdorf, D.J.; Guethlein, L.A.; Klein, J.P.; Wang, T.; Le, C.T.; Marsh, S.G.E.; Geraghty, D.; Spellman, S.; Haagenson, M.D.; et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* **2010**, *116*, 2411–2419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Weisdorf, D.; Cooley, S.; Wang, T.; Trachtenberg, E.; Vierra-Green, C.; Spellman, S.; Sees, J.A.; Spahn, A.; Vogel, J.; Fehniger, T.A.; et al. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 740–754. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Guethlein, L.A.; Beyzaie, N.; Nemat-Gorgani, N.; Wang, T.; Ramesh, V.; Marin, W.M.; Hollenbach, J.A.; Schetelig, J.; Spellman, S.R.; Marsh, S.G.E.; et al. Following Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia, Donor KIR Cen B02 Better Protects against Relapse than KIR Cen B01. *J. Immunol.* **2021**, *206*, ji2100119. [[CrossRef](#)]
146. Weisdorf, D.; Cooley, S.; Wang, T.; Trachtenberg, E.; Haagenson, M.D.; Vierra-Green, C.; Spellman, S.; Spahn, A.; Vogel, J.; Kobusingye, H.; et al. KIR Donor Selection: Feasibility in Identifying better Donors. *Biol. Blood Marrow Transpl.* **2019**, *25*, e28–e32. [[CrossRef](#)]
147. Bari, R.; Rujkijyanont, P.; Sullivan, E.; Kang, G.; Turner, V.; Gan, K.; Leung, W. Effect of Donor KIR2DL1 Allelic Polymorphism on the Outcome of Pediatric Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3782–3790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Boudreau, J.E.; Giglio, F.; Gooley, T.A.; Stevenson, P.A.; LE Luduec, J.-B.; Shaffer, B.C.; Rajalingam, R.; Hou, L.; Hurley, C.K.; Noreen, H.; et al. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 2268–2278. [[CrossRef](#)]
149. Van Der Ploeg, K.; Le Luduec, J.-B.; Stevenson, P.A.; Park, S.; Gooley, T.A.; Petersdorf, E.W.; Shaffer, B.C.; Hsu, K.C. HLA-A alleles influencing NK cell function impact AML relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Adv.* **2020**, *4*, 4955–4964. [[CrossRef](#)]
150. Schetelig, J.; Baldauf, H.; Heidenreich, F.; Massalski, C.; Frank, S.; Sauter, J.; Stelljes, M.; Ayuk, F.A.; Bethge, W.A.; Bug, G.; et al. External validation of models for KIR2DS1/KIR3DL1-informed selection of hematopoietic cell donors fails. *Blood* **2020**, *135*, 1386–1395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Schetelig, J.; Baldauf, H.; Koster, L.; Kuxhausen, M.; Heidenreich, F.; de Wreede, L.C.; Spellman, S.; van Gelder, M.; Bruno, B.; Onida, F.; et al. Haplotype Motif-Based Models for KIR-Genotype Informed Selection of Hematopoietic Cell Donors Fail to Predict Outcome of Patients With Myelodysplastic Syndromes or Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 584520. [[CrossRef](#)]
152. Willemze, R.; Ebmt, P.; Rodrigues, C.A.; Labopin, M.; Sanz, G.; Michel, G.; Socié, G.; Rio, B.; Sirvent, A.; Renaud, M.; et al. KIR-ligand incompatibility in the graft-versus-host direction improves outcomes after umbilical cord blood transplantation for acute leukemia. *Leukemia* **2009**, *23*, 492–500. [[CrossRef](#)]
153. Brunstein, C.G.; Wagner, J.E.; Weisdorf, D.J.; Cooley, S.; Noreen, H.; Barker, J.N.; DeFor, T.; Verneris, M.R.; Blazar, B.R.; Miller, J.S. Negative effect of KIR alloreactivity in recipients of umbilical cord blood transplant depends on transplantation conditioning intensity. *Blood* **2009**, *113*, 5628–5634. [[CrossRef](#)]
154. Garfall, A.; Kim, H.T.; Sun, L.; Ho, V.T.; Armand, P.; Koreth, J.; Alyea, E.P.; Soiffer, R.J.; Antin, J.H.; Ritz, J.; et al. KIR ligand incompatibility is not associated with relapse reduction after double umbilical cord blood transplantation. *Bone Marrow Transpl.* **2013**, *48*, 1000–1002. [[CrossRef](#)]
155. Guillaume, N.; Loiseau, P.; Gagne, K.; Teisserenc, H.M.; Cayuela, J.-M.; Henry, G.; Robin, M.; De Latour, R.P.; Gluckman, E.; Socié, G.; et al. Natural killer cell licensing after double cord blood transplantation is driven by the self-HLA class I molecules from the dominant cord blood. *Haematologica* **2016**, *101*, e209–e212. [[CrossRef](#)]
156. Rettman, P.; Legrand, N.; Willem, C.; Lode, L.; Chevallier, P.; Cesbron, A.; Senitzer, D.; Retière, C.; Gagne, K. Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* **2015**, *100*, e475–e479. [[CrossRef](#)]
157. Rettman, P.; Willem, C.; Volteau, C.; Legrand, N.; Chevallier, P.; Lodé, L.; Esbelin, J.; Cesbron, A.; Bonneville, M.; Moreau, P.; et al. Impact of Graft-Versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Transplantation* **2017**, *101*, 2092–2101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Rettman, P.; Malard, F.; Legrand, N.; Avinens, O.; Eliaou, J.-F.; Picard, C.; Dormoy, A.; Lafarge, X.; De Matteis, M.; Kennel, A.; et al. Impact of KIR/HLA genetic combinations on double umbilical cord blood transplantation outcomes. Results of a French multicentric retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and the Société Francophone d’Histocompatibilité et d’Immunogénétique (SFHI). *Bone Marrow Transpl.* **2016**, *51*, 1499–1503. [[CrossRef](#)]
159. Baumeister, S.H.C.; Rambaldi, B.; Shapiro, R.M.; Romee, R. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 191. [[CrossRef](#)]
160. Dubois, V.; Amokrane, K.; Beguin, Y.; Bruno, B.; Chevallier, P.; Delbos, F.; Devillier, R.; Giannoli, C.; Guidicelli, G.; Harif, M.; et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant: How to choose the best donor? Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC). *Bull. Cancer* **2020**, *107*, S72–S84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Bastos-Oreiro, M.; Anguita, J.; Martínez-Laperche, C.; Fernández, L.; Buces, E.; Navarro-Bailón, A.; Pascual, C.; Pérez-Corral, A.M.; Balsalobre, P.; Muñoz, C.; et al. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur. J. Haematol.* **2016**, *96*, 483–491. [[CrossRef](#)]

162. Wanquet, A.; Bramanti, S.; Harbi, S.; Fürst, S.; Legrand, F.; Faucher, C.; Granata, A.; Calmels, B.; Lemarie, C.; Picard, C.; et al. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor–Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell–Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transpl.* **2018**, *24*, 549–554. [[CrossRef](#)]
163. Solomon, S.R.; Aubrey, M.T.; Zhang, X.; Piluso, A.; Freed, B.M.; Brown, S.; Jackson, K.C.; Morris, L.E.; Holland, H.K.; Solh, M.M.; et al. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other Clinical Variables. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transpl.* **2018**, *24*, 789–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Willem, C.; Makanga, D.R.; Guillaume, T.; Maniangu, B.; Legrand, N.; Gagne, K.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Béné, M.C.; Cesbron, A.; et al. Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell–Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 2141–2152. [[CrossRef](#)]
165. Shimoni, A.; Labopin, M.; Finke, J.; Ciceri, F.; Deconinck, E.; Kröger, N.; Gramatzki, M.; Stelljes, M.; Blaise, D.; Stoelzel, F.; et al. Donor selection for a second allogeneic stem cell transplantation in AML patients relapsing after a first transplant: A study of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood Cancer J.* **2019**, *9*, 88. [[CrossRef](#)]
166. Retière, C.; Willem, C.; Guillaume, T.; Vié, H.; Gautreau-Rolland, L.; Scotet, E.; Saulquin, X.; Gagne, K.; Béné, M.C.; Imbert, B.-M.; et al. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* **2018**, *9*, 11451–11464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Makanga, D.R.; Guillaume, T.; Willem, C.; Legrand, N.; Gagne, K.; Cesbron, A.; Gendzekhadze, K.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Le Bourgeois, A.; et al. Posttransplant Cyclophosphamide and Antithymocyte Globulin versus Posttransplant Cyclophosphamide as Graft-versus-Host Disease Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cell Haploidentical Transplants: Comparison of T Cell and NK Effector Reconstitution. *J. Immunol.* **2020**, *205*, 1441–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Russo, A.; Oliveira, G.; Berglund, S.; Greco, R.; Gambacorta, V.; Cieri, N.; Toffalori, C.; Zito, L.; Lorentino, F.; Piemontese, S.; et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: Dynamics and clinical implications. *Blood* **2018**, *131*, 247–262. [[CrossRef](#)]
169. Davis, Z.B.; Vallera, D.A.; Miller, J.S.; Felices, M. Natural killer cells unleashed: Checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin. Immunol.* **2017**, *31*, 64–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
170. Daher, M.; Rezvani, K. Next generation natural killer cells for cancer immunotherapy: The promise of genetic engineering. *Curr. Opin. Immunol.* **2018**, *51*, 146–153. [[CrossRef](#)]
171. Hodgins, J.J.; Khan, S.T.; Park, M.M.; Auer, R.C.; Ardolino, M. Killers 2.0: NK cell therapies at the forefront of cancer control. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 3499–3510. [[CrossRef](#)]
172. Rafei, H.; Daher, M.; Rezvani, K. Chimeric antigen receptor (CAR) natural killer (NK)-cell therapy: Leveraging the power of innate immunity. *Br. J. Haematol.* **2021**, *193*, 216–230. [[CrossRef](#)]
173. Lupo, K.B.; Matosevic, S. Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers* **2019**, *11*, 769. [[CrossRef](#)]
174. Gurney, M.; O’Dwyer, M. Realizing Innate Potential: CAR-NK Cell Therapies for Acute Myeloid Leukemia. *Cancers* **2021**, *13*, 1568. [[CrossRef](#)]
175. Romeo, R.; Cooley, S.; Berrien-Elliott, M.M.; Westervelt, P.; Verneris, M.R.; Wagner, J.E.; Weisdorf, D.J.; Blazar, B.R.; Ustun, C.; DeFor, T.E.; et al. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* **2018**, *131*, 2515–2527. [[CrossRef](#)]
176. Ewen, E.-M.; Pahl, J.H.; Miller, M.; Watzl, C.; Cerwenka, A. KIR downregulation by IL-12/15/18 unleashes human NK cells from KIR/HLA-I inhibition and enhances killing of tumor cells. *Eur. J. Immunol.* **2018**, *48*, 355–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
177. Koerner, S.P.; André, M.C.; Leibold, J.S.; Kousis, P.C.; Kübler, A.; Pal, M.; Haen, S.; Bühring, H.-J.; Grosse-Hovest, L.; Jung, G.; et al. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* **2017**, *31*, 459–469. [[CrossRef](#)]
178. Smits, N.C.; Coupet, T.A.; Godbersen, C.; Sentman, C.L. Designing multivalent proteins based on natural killer cell receptors and their ligands as immunotherapy for cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2016**, *16*, 1105–1112. [[CrossRef](#)]
179. Wiernik, A.; Foley, B.; Zhang, B.; Verneris, M.R.; Warlick, E.D.; Gleason, M.K.; Ross, J.A.; Luo, X.; Weisdorf, D.J.; Walcheck, B.; et al. Targeting Natural Killer Cells to Acute Myeloid Leukemia In Vitro with a CD16 × 33 Bispecific Killer Cell Engager and ADAM17 Inhibition. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 3844–3855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Vallera, D.A.; Felices, M.; McElmurry, R.; McCullar, V.; Zhou, X.; Schmohl, J.U.; Zhang, B.; Lenvik, A.J.L.; Panoskaltis-Mortari, A.; Verneris, M.R.; et al. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3440–3450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
181. André, P.; Denis, C.; Soulas, C.; Bourbon-Caillet, C.; Lopez, J.; Arnoux, T.; Bléry, M.; Bonnafous, C.; Gauthier, L.; Morel, A.; et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell* **2018**, *175*, 1731–1743.e13. [[CrossRef](#)]

182. Makanga, D.R.; Jullien, M.; David, G.; Legrand, N.; Willem, C.; Dubreuil, L.; Walencik, A.; Touzeau, C.; Gastinne, T.; Tessoulin, B.; et al. Low Number of KIR Ligands in Lymphoma Patients Favors a Good Rituximab-Dependent NK Cell Response. *Oncoimmunology* **2021**, *10*, 1936392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Becker, P.S.A.; Suck, G.; Nowakowska, P.; Ullrich, E.; Seifried, E.; Bader, P.; Tonn, T.; Seidl, C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 477–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Guillerey, C.; Huntington, N.D.; Smyth, M. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 1025–1036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Shi, J.; Tricot, G.J.; Garg, T.K.; Malaviarachchi, P.A.; Szmania, S.M.; Kellum, R.E.; Storrie, B.; Mulder, A.; Shaughnessy, J.J.D.; Barlogie, B.; et al. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood* **2008**, *111*, 1309–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

# **CONCLUSION /DISCUSSION**

Les cellules NK sont des effecteurs cytotoxiques clés de l'immunité innée contre les cellules tumorales ou infectées par un virus. Le contenu en gènes KIR, l'environnement HLA de classe I et certaines infections virales telles que celles liées au CMV impactent la structuration du répertoire NK au niveau quantitatif (fréquence des sous-populations NK) et qualitatif (phénotype des sous-populations NK). En effet, les gènes KIR et HLA constituent la paire récepteur/ligand la plus polymorphe et polygénique chez l'homme, et leurs interactions structurent le répertoire NK et modulent les fonctions des cellules NK. Cependant, le polymorphisme génétique et allélique des marqueurs KIR et HLA de classe I complexifient fortement les règles de structuration du répertoire NK. Bien que certaines études aient souligné l'impact du polymorphisme allélique KIR sur le phénotype et la fonction des cellules NK comme rapportées pour le récepteur KIR3DL1 (Gagne et al., 2013; Gardiner et al., 2001) et pour le récepteur KIR2DL1 (Bari et al., 2009; Dunphy et al., 2015; Le Luduec et al., 2019), l'absence de méthodes à haute résolution a limité les investigations du répertoire des cellules NK KIR<sup>+</sup>.

Au cours de ce travail, notre premier objectif était d'évaluer l'impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 sur la structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK. Pour ce faire, nous sommes donc intéressés au polymorphisme allélique des récepteurs inhibiteurs KIR2DL1/2/3 car leur fréquence génique est proche de 100% et qu'ils reconnaissent toutes les molécules HLA-Cw (**Article 1**). Dans cette étude, nous avons mis en évidence pour la première fois la prédominance des allèles KIR2DL1\*003 et 2DL3\*001 chez les individus CenAA. Les allotypes KIR2DL1/2/3 confèrent différentes caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles aux cellules NK basées sur les motifs KIR Cen. Les individus CenAA présentent une fréquence, un niveau d'expression (Dunphy et al., 2015; Le Luduec et al., 2019; Vargas et al., 2020b) et une force d'interactions KIR/HLA-C plus élevée par rapport aux individus CenAB et CenBB. En particulier, la reconnaissance plus forte des ligands C2 par les cellules NK KIR2DL1<sup>+</sup> a été observée pour l'allotype KIR2DL1\*003.

Cependant dans cette étude, nous ne pouvons exclure une influence des peptides chargés, qui sont probablement différents dans notre modèle cellulaire *in vitro* et dans la modélisation *in silico*. Bien qu'un rôle minime du peptide ait été déduit de la structure cristallographique du complexe KIR2DL1/HLA-Cw4 (Fan et al., 2001), des études avec des analogues peptidiques synthétiques ont montré que la

substitution du résidu Lys8 du peptide par un résidu acide entraîne une perte de liaison aux KIR (Rajagopalan and Long, 1997; Saunders et al., 2015). D'autre part, contrairement au récepteur KIR2DL1, le peptide module la liaison des récepteurs KIR2DL2/3 à la molécule HLA-Cw3 par des interactions directes (Boyington et al., 2000; Saunders et al., 2015). Des études ont également montré que KIR2DL2/3 a une affinité avec l'allotype HLA-C\*03:04 qui varie en fonction du peptides chargé dérivés du virus de l'hépatite chronique (VHC) (Lunemann et al., 2016) ou du VIH (Vollmers et al., 2021; Ziegler et al., 2020). En outre, nous nous sommes intéressées ici qu'au polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3. Il serait intéressant d'inclure dans une prochaine étude d'autres KIR inhibiteurs tels que KIR3DL1 (Gagne et al., 2013; Gardiner et al., 2001; Thomas et al., 2008), qui pourrait avoir un impact sur le répertoire des cellules NK KIR et plus précisément sur le répertoire NK KIR2DL. Ainsi, nous étudions actuellement l'impact du polymorphisme allélique KIR3DL1 sur le répertoire des cellules NK KIR. Nous observons que les allèles KIR3DL1 non exprimés, fortement représentés, ont un impact sur les fréquences des cellules NK KIR2DL1/S1+ avec une augmentation de la fréquence de ces cellules (données non montrées). Des investigations supplémentaires sur une cohorte plus large de donneurs de sang seraient également nécessaires pour inclure les allèles rares KIR2DL non documentés dans notre étude.

Enfin, nos résultats fonctionnels soulèvent des questions supplémentaires concernant l'influence du polymorphisme HLA-C. En effet, nous avons observé un large spectre de reconnaissance des molécules HLA-Cw par les récepteurs KIR2DL plus ou moins marqué en fonction de la nature du KIR2DL et de l'allotype HLA-C. Le polymorphisme allélique HLA-C pourrait affecter l'affinité KIR2DL2/3/HLA-C et la fonctionnalité des cellules NK, tant au niveau de la conformation que du niveau d'expression de ce ligand (Charoudeh et al., 2012; Sips et al., 2016). L'étude fonctionnelle ayant été établie avec des transfectants HLA-C exprimant un niveau équivalent de molécules HLA-Cw quel que soit l'allotype, la question de l'impact du polymorphisme HLA-C s'est imposée. Ces résultats ont notamment soulevé la question de la validité de la classification C1/C2 établie sur la base du polymorphisme HLA-C en position 80.

Suite à cette première étude et aux questions soulevées, nous avons dans un second axe évalué l'impact du polymorphisme allélique des gènes HLA-C sur le niveau d'expression des molécules HLA-Cw, sur la structuration phénotypique et fonctionnelle et l'éducation des cellules NK KIR<sup>+</sup>. Afin de faciliter l'analyse du polymorphisme HLA-C, nous avons constitué une cohorte de donneurs de sang HLA-C homozygotes (**Article 2**). A partir de cette cohorte, nous montrons une expression hiérarchique des molécules HLA-Cw en fonction des allotypes HLA-C (Apps et al., 2013; Bachtel et al., 2018; Thomas et al., 2009) et des populations lymphocytaires (Horowitz et al., 2015). Nous rapportons une corrélation positive entre les transcrits HLA-C et l'expression des molécules HLA-Cw pour les allotypes HLA-Cw3, -Cw4, -Cw5, -Cw6 et -Cw7 au niveau des LB. En revanche, l'absence de corrélation entre les transcrits HLA-C et l'expression HLA-Cw au niveau des LT et NK suggère des modifications post-transcriptionnelles et/ou post-traductionnelles. Ceci est particulièrement intéressant puisqu'un promoteur spécifique aux cellules NK régulant l'expression des molécules HLA-Cw, impliqué à la fois dans le développement et la fonction des cellules NK, a été décrit (Li et al., 2018). Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur des donneurs HLA-C homozygotes afin d'évaluer l'impact du polymorphisme allélique HLA-C sur l'expression des molécules HLA-Cw et la quantité des transcrits HLA-C. Cependant, cette cohorte de donneurs HLA-C homozygotes est non représentative de la réalité. Dans un contexte HLA-C hétérozygote, le niveau d'expression des molécules HLA-Cw pourrait être modulé par l'interaction entre 2 produits d'allèles HLA-C différents. Il serait donc intéressant d'étudier l'impact du second allèle HLA-C sur la quantité de transcrits du premier allèle et son expression protéique. Afin d'évaluer l'impact des combinaisons d'allèles HLA-C sur la quantité de transcrits HLA-C, nous avons mis au point certaines qPCR avec des amorces HLA-C allèles spécifiques nous permettant d'étudier l'impact du second allèle sur la quantité de transcrits HLA-C au sein d'une cohorte déjà établie de près de 200 donneurs HLA-C hétérozygotes. Une série de premiers tests a déjà été réalisée sur des donneurs hétérozygotes C2 (HLA-C\*04, -C\*06 et -C\*02) tandis que des mises au point sont en cours pour les allèles C1 (HLA-C\*07:01, HLA-C\*07:02 et HLA-C\*03) et un allèle C2 (HLA-C\*05). Pour évaluer l'expression des molécules HLA-Cw, les seuls anticorps disponibles actuellement reconnaissent d'autres molécules HLA de classe I. Ainsi, le DT9 qui est spécifique des molécules HLA-Cw et HLA-E est le plus utilisé mais l'expression HLA-E, bien que faible, peut biaiser les études

d'expression des molécules HLA-Cw. Pour pallier à ce problème, nous avons développé un projet d'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques des molécules HLA-Cw. Cet outil doit permettre de mieux documenter l'expression HLA-Cw au niveau des cellules normales ou dans des conditions pathologiques, virales ou tumorales. Le développement des AcM anti-HLA-Cw spécifiques s'inscrit dans une collaboration avec le Pr Xavier Saulquin, membre de notre équipe 1 de l'UMR1232. Cette collaboration permet de partager les compétences technologiques développées par son équipe (Legoux et al., 2013). Cette technique a notamment permis d'isoler les LT naïfs spécifiques des Ag du soi, viraux et tumoraux présentés par la molécule HLA-A2. Dans le cadre de notre projet collaboratif d'obtention d'AcM anti-HLA-C spécifiques, nous avons sélectionné en lien avec le laboratoire HLA de l'EFS de Nantes et le service de néphrologie du CHU de Nantes, des patients greffés rénaux présentant des DSA anti-HLA-C (anti-C1 ou anti-C2) spécifiques et stables. Ainsi, nous espérons pouvoir isoler des AcM spécifiques des molécules HLA-Cw du groupe C1 et vis-à-vis du groupe C2 à partir des PBMC congelés de ces patients greffés rénaux avec DSA anti-HLA-C. La méthode de production d'AcM humain anti-C1 et anti-C2 reposera sur deux étapes principales. La première étape consiste à isoler les LB exprimant un BCR spécifique de l'Ag d'intérêt à sa surface à l'aide de tétramères HLA-C/peptides déjà produits. Les LB d'intérêt sont enrichis et isolés au niveau d'une seule cellule à l'aide d'un trieur. La seconde étape est constituée de plusieurs manipulations de biologie moléculaire permettant la production d'AcM humain. Les gènes codant la chaîne lourde et la chaîne légère du BCR spécifique sont clonés par RT-PCR. L'ADNc est ensuite séquencé et transfecté dans un système eucaryote (cellules rénales humaines). Les Ac recombinants produits seront ensuite screenés par Elisa à l'aide des complexes peptide/CMH.

L'étude du répertoire NK KIR sur la cohorte de donneurs HLA-C homozygotes nous permet de confirmer l'impact délétère du gène KIR2DL2 sur la fréquence des cellules NK KIR2DL1+ et NK KIR2DL3+ (**Article n°1**). Par ailleurs, l'expression du KIR2DL1 sur les cellules NK est plus élevée chez les donneurs C1 par rapport aux donneurs C2. Nous montrons une meilleure interaction fonctionnelle entre les allotypes KIR2DL1\*003 et les ligands C2 par rapport aux allotypes 2DL1\*002 et 2DL1\*004. Ce gain est également favorisé par la spécificité des allotypes HLA-C. Cependant, le polymorphisme HLA-C ne semble pas impacter le potentiel de dégranulation des cellules NK



KIR2DL2/3+. De plus, la nature de l'allèle KIR2DL2/3 joue un rôle seulement dans un environnement HLA-Cw7. Le faible impact du polymorphisme allélique KIR2DL2/3 et HLA-C sur l'éducation des cellules NK KIR2DL2/3+ peut être expliqué par la moindre force des interactions KIR2DL2/3 avec les molécules HLA-Cw. Nous avons précédemment observé une inhibition plus faible de la dégranulation des cellules NK KIR2DL1+ avec la lignée cellulaire 221-HLA-Cw6 par rapport aux cellules cibles 221-HLA-Cw2 et -Cw4 (**Article n°1**). La forte expression membranaire des molécules HLA-Cw6 au niveau des LB, LT, NK par rapport aux autres allotypes HLA-C (**Article n°2**) peut expliquer le fait que HLA-Cw6 constitue un bon ligand pour éduquer les cellules NK KIR2DL1+. Cependant, un plus grand nombre de donneurs de sang homozygotes HLA-C\*06 est nécessaire pour comprendre la disparité observée dans l'éducation des cellules NK KIR2DL1+. La même analyse peut être faite pour l'allotype HLA-Cw15 qui présente une interaction inhibitrice plus faible avec KIR2DL1 et semble être mieux exprimé que les molécules HLA-Cw2 et -Cw4. En lien avec l'**Article N°1**, nous avons soulevé l'hypothèse d'un rôle modulateur du peptide dans les interactions KIR/HLA. Le peptide présenté par les molécules HLA-Cw pourrait être un facteur important pour l'expression des molécules HLA-Cw correspondantes à la surface des cellules (Cresswell, 2019; Del Val et al., 2020). En effet, Kaur et al. suggèrent que les différences dans la fente de liaison au niveau des molécules HLA-Cw affectent sa stabilité de surface par une plus grande affinité pour le peptide (Kaur et al., 2017). Cela permet une plus grande disponibilité des peptides possibles, conduisant à un chargement et à une navette plus rapide vers la surface cellulaire, entraînant une expression de surface plus élevée. Plus particulièrement, l'étude montre que les molécules HLA-Cw5, avec une fente de liaison large et facilement accessible, peuvent contenir environ trois fois plus de peptides distincts et se trouvent en plus grande abondance à la surface, par rapport aux molécules HLA-Cw7 qui présentent une fente étroite (Kaur et al., 2017).

D'autres paramètres génétiques et biologiques indépendants de la nomenclature C1/C2 sont à prendre en compte dans l'éducation des cellules NK KIR2DL+. Plus particulièrement, nous montrons que l'absence du gène KIR2DL5 est particulièrement bénéfique pour améliorer l'éducation des cellules NK KIR2DL1 et KIR2DL2/3+ dans les environnements HLA-Cw3 et -Cw4. Des observations récentes en GCSH corroborent l'impact bénéfique du génotype KIR CenB02 marqué par l'absence de KIR2DL5

par rapport au CenB01 (Guethlein et al., 2021). A contrario, Weisdorf et al. rapportent que les deux gènes KIR2DS3 et 2DL5, présents chez les donneurs CenB01, assurent une protection contre les rechutes après une GSCH avec un conditionnement d'intensité réduite uniquement chez des patients avec des LAM et possédant des ligands C1+ (Weisdorf et al., 2020). Ces données contradictoires probablement liées au régime de conditionnement et à la faible connaissance des ligands KIR2DL5 complexifient la signification biologique de nos observations. Ces données nous confortent dans l'idée qu'il serait pertinent d'intégrer d'autres récepteurs KIR tels que KIR3DL1 et KIR2DL5 dans les futures études impliquant les marqueurs KIR sur la structuration du répertoire NK dans des contextes physiologiques et cliniques. La présence ou non du CMV constitue un autre paramètre déterminant qui impacte l'éducation des cellules NK KIR2DL+. En effet, nous montrons que le statut CMV limite l'éducation des cellules NK KIR2DL1+ dans un environnement HLA-Cw4 bien que cet allotype soit un ligand C2. Le CMV régule à la baisse les molécules HLA de classe I sur les cellules infectées afin d'échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T. Cependant, ce mécanisme d'échappement semble être sélectif et moins rigoureux pour les molécules HLA-Cw. En effet, les molécules HLA-Cw ne sont pas affectées par l'endocytose induite par les virus, ce qui pourrait expliquer le rôle crucial que joue HLA-C dans la protection contre le VIH (Ziegler et al., 2020) et d'autres infections virales comme le VHC (Apps et al., 2013; Legrand et al., 2021; Thomas et al., 2009). De plus, les peptides chargés sur les molécules HLA de classe I modulent l'immunoévasion du CMV (Holtappels et al., 2009). Il est possible que les immunoévasines du CMV impactent différemment les molécules HLA-Cw3 et HLA-Cw4 impliquant ou non la nature des peptides chargés.

Les gènes polymorphes KIR et HLA de classe I jouent un rôle majeur dans la structuration du répertoire fonctionnel des cellules NK. Dans l'étude présentée en **Annexe 1**, nous avons montré une large disparité interindividuelle des réponses NK contre une même cible leucémique, mettant en évidence des mauvais et des bons répondeurs NK. Nous avons observé que la diversité des réponses des cellules NK contre les cellules leucémiques LAL ou LAM était inter et intra-individuelle. En effet, uniquement sur la base des marqueurs NKG2A, KIR2DL2/3, CD57 et NKG2C, nous avons identifié différents groupes d'individus partageant un répertoire de cellules NK commun lié au profil

immunogénétique KIR/HLA et au statut CMV. Du côté fonctionnel, les sous-populations de cellules NK les plus efficaces contre différentes cibles LAL exprimaient le récepteur NKG2A et représentaient les sous-populations NK les plus fréquentes tandis, que les sous-populations minoritaires de cellules NK CD57+ et/ou/KIRDL2/3+ étaient plus efficaces contre les LAM. Seulement, dans cette étude, seuls les récepteurs KIR2DL2/3 ont été pris en compte et sans prise en compte de leur polymorphisme allélique. En conséquence, nous avons documenté la structuration du répertoire des cellules NK en fonction du polymorphisme HLA-C au sein de la cohorte de donneurs HLA-C homozygotes. Nous avons ainsi déterminé les fréquences des sous-populations NK selon le modèle de différenciation des cellules NK (KIR, NKG2A et CD57) décrites précédemment (Björkström et al., 2010) en incluant les principaux KIR (KIR2DL1/S1, KIR2DL2/3/S2 et KIR3DL1) qui reconnaissent respectivement les ligands C2, C1 et Bw4 (**Article 2**). Dans cette étude, l'analyse de clustering hiérarchique réalisée à partir de 32 sous-ensembles de cellules NK et 73 donneurs de sang HLA-C homozygotes nous a conduits à diviser le répertoire NK en 3 clusters principaux définis par l'expression ou non de NKG2A. De plus, notre étude révèle une dichotomie structurelle entre les compartiments de cellules NK KIR2DL1/2/3+ et KIR3DL1+. Le regroupement des donneurs de sang HLA-C homozygotes oriente la compréhension des règles génétiques imprimant la structuration du répertoire des cellules NK. En effet, les sous-ensembles de cellules NK KIR2DL2/3+ sont favorisés par les environnements C1. Inversement, les sous-ensembles de cellules NK KIR2DL1+ sont prédominants chez les donneurs de sang C2. Enfin, les sous-ensembles de cellules NK KIR3DL1+ sont prédominants chez les donneurs de sang Bw4+. Dans cette étude, nous nous sommes contentés d'étudier la fréquence des sous-populations NK en lien avec l'article **en Annexe 1**. Cependant, chaque sous-ensemble de cellules NK abrite une signature transcriptomique spécifique, comme l'a récemment confirmé le séquençage de l'ARN unicellulaire (Smith et al., 2020). À l'avenir, il serait donc intéressant d'inclure une étude transcriptomique afin de mettre en évidence les différentes signatures transcriptomiques avec les 32 populations NK étudiées en cellulaire. L'analyse des réponses NK anti-leucémiques avec une prise en compte de l'ensemble des récepteurs NK (NKG2A, CD57, NKG2C, KIR2DL1/2/3, KIR3DL1) est actuellement en cours à la fois au sein de la population de donneurs HLA-C homozygotes et plus largement en intégrant de nombreux donneurs HLA-C hétérozygotes. Plus largement, le polymorphisme d'autres marqueurs NK tels que celui des ILT ou

ligands HLA de classe I non classiques (Di Cristofaro et al., 2016) pourrait jouer un rôle sur la structuration du répertoire NK même si ce polymorphisme est plus réduit comparativement aux marqueurs KIR et HLA de classe I classiques.

Sur le plan clinique, les cellules NK par leur activité GvL jouent un rôle central post-GCSH. Les greffes haplo-PTCy sont devenues un traitement curatif pour la plupart des hémopathies malignes, en particulier contre les leucémies aiguës en l'absence d'un donneur apparenté ou non-apparenté HLA identique. Dans une récente étude (Willem et al., 2019a), nous avons montré que les cellules NK KIR+ allogéniques sont éliminées rapidement après GCSH haplo-PTCy. Ce contexte alloréactif favorise la production de cytokines dont l'IL-15 qui à son tour favorise la maturation des cellules NK CD57+. Nous observons chez les paires D/R présentant des incompatibilités KIR2D/HLA-Cw dans le sens GvH, une incidence augmentée de GvH aigüe et moins de rechute post-haplo PTCy comparativement aux paires D/R sans incompatibilité KIR/KIR ligands. Nous émettons l'hypothèse que le contexte alloréactif favorise le développement et la maturation des cellules NK plus compétentes pour éliminer les cellules leucémiques. Dans le contexte des GSCH haplo-PTCy, certaines études ont également rapporté un impact bénéfique (Solomon et al., 2018; Symons et al., 2010a) ou aucun impact (Bastos-Oreiro et al., 2016) des génotypes KIR B des donneurs sur l'incidence des rechutes après haplo-PTCY montrant l'importance d'autres KIR. Le rôle des motifs KIR et/ou allèles KIR n'a pas été documenté dans le contexte des GSCH haplo-PTCy jusqu'à présent. Ainsi, nous avons évalué l'impact des motifs KIR Cen chez les donneurs de CSH sur le devenir des greffes haplo-PTCy. Dans cette étude (**Article 1**), nous rapportons en analyse multivariée que les patients avec des pathologies myéloïdes greffés avec des donneurs de CSH présentant un motif KIR CenAA ont une incidence plus faible de rechute par rapport aux donneurs CenB+ après GSCH haplo-PTCY. Cet effet n'est pas retrouvé chez les patients avec des pathologies lymphoïdes. L'effet protecteur des donneurs de CSH avec des motifs KIR CenAA que nous rapportons ici est donc observé uniquement chez les patients avec des pathologies myéloïdes, dont 59% de patients atteints de LAM. Dans l'ensemble, ces données cliniques suggèrent que l'effet GvL observé après GSCH haplo-PTCy pourrait être induit par certains allotypes KIR2DL1 ou 2DL3 spécifiques des motifs KIR CenAA présents à la surface des cellules NK. Ceci est en accord avec nos travaux récents

montrant que les sous-populations de cellules NK KIR<sup>+</sup> avec des profils spécifiques en fonction de l'environnement immunogénétique KIR et HLA et du statut CMV étaient préférentiellement engagées contre des cibles LAM (**Annexe 1**). Tandis que les sous-populations de cellules NK NKG2A<sup>+</sup> étaient préférentiellement engagées contre des cibles LAL. Ces données sont également en accord avec les travaux de Ruggieri et al., dans lesquelles le rôle des cellules NK KIR alloréactives dans un contexte de GCSH haplo-identiques T-déplétées n'était observé que chez des patients atteints de LAM. L'analyse multivariée montre aussi que le statut de la maladie est un facteur important affectant l'incidence de rechute chez les patients avec pathologies myéloïdes après GSCH haplo-PTCY, comme indiqué précédemment (Cieri et al., 2015). Les hétérogénéités concernant la proportion de patients atteints de LAM, le régime de conditionnement, la source de cellules souches (Bastos-Oreiro et al., 2016; Symons et al., 2010b) ainsi que de la génétique KIR entre les études publiées et celles rapportées ici pourraient expliquer ces discordances. En collaboration avec le service d'hématologie du CHU de Nantes, nous pourrions évaluer rétrospectivement l'impact du polymorphisme allélique KIR et HLA-C sur le devenir des GSCH haplo-PTCY à partir de 170 paires D/R stockées dont les génotypages KIR des donneurs ont déjà été réalisés. Une évaluation fine du niveau d'expression des molécules HLA-Cw en fonction des populations lymphocytaires pourra également être suivie prospectivement en reconstitution post-GSCH haplo-PTCy. Ces données seront mises en lien avec les travaux récents de l'équipe de Minguela (Martínez-Sánchez et al., 2021) montrant une altération du niveau d'expression des molécules HLA-Cw et du répertoire NK post-GSCH chez des enfants atteints de LAL. Plus largement, le rôle anti-leucémique des cellules NK post-GSCH haplo-PTCy pourra être mis en lien avec celui des LT  $\gamma\delta$  non-conventionnels (Stocker et al., 2020). Jusqu'à présent, nous nous sommes concentrés dans nos études cliniques sur les récepteurs KIR2DL et les ligands HLA-C. D'autres paramètres que les récepteurs KIR, l'environnement HLA-A, B et le statut CMV impactent le répertoire NK. Récemment, des études ont montré que le polymorphisme KIR3DL1 et la molécule HLA-A peuvent jouer un rôle sur l'incidence de rechute post-greffe de CSH (Shaffer et al., 2021; van der Ploeg et al., 2020). En particulier, l'allèle HLA-A\*24 est associé à une augmentation de la rechute post-greffe chez les patients LAM. Il serait donc intéressant d'étudier l'ensemble de ces différents facteurs dans un contexte de greffes de CSH haplo-identiques.

Nos études nous montrent l'importance des marqueurs génétiques KIR/HLA et du statut CMV dans le devenir des GCSH allogéniques. Cependant, nos études multi-paramétriques non supervisées nécessitent des représentations simplifiées (par réduction de dimensions) des données de patients qui comprennent les informations génétiques (typages HLA et KIR), le statut CMV, l'expression des récepteurs KIR et de leurs ligands et des données fonctionnelles (réponse des cellules NK face à différentes cibles). Ces représentations simplifiées de nos études multi-paramétriques vont être initiées en collaboration avec le Dr Nicolas Vince du CRTI de Nantes. Dans un objectif plus lointain, nos travaux doivent nous permettre d'envisager un algorithme qui pourrait aider à la sélection d'un donneur de CSH haplo-identique. Par ailleurs, dans l'optique du développement d'immunothérapies basées sur les cellules NK, ces analyses seront essentielles pour mieux cibler le bon donneur de cellules NK qui pourront être modifiées par ingénierie. En effet, la sélection d'un donneur ayant une(des) sous-population(s) NK avec un fort potentiel anti-leucémique pour un type de leucémie donné serait importante. Sur les bases de l'alloréactivité NK et de leur éducation fonctionnelle médiée par les interactions KIR/HLA, un donneur ayant tous les ligands KIR serait probablement identifié (C1C2Bw4). La nature de ces ligands KIR pourrait être optimisée grâce à nos connaissances sur le polymorphisme HLA-C et ses implications sur les fonctions NK. Les immunothérapies CAR-NK sont en plein essor (Leivas et al., 2021; Liu et al., 2020; Pan et al., 2021; Tang et al., 2018) avec actuellement 24 essais en cours sur les CAR-NK contre 1047 essais en cours pour le CAR-T cell. Les essais précliniques des cellules NK-CAR ont démontré des avantages cliniques chez les patients atteints de LAM après GCSH (Liu et al., 2020; Tang et al., 2018). Actuellement, les cellules NK92 et les cellules NK primaires sont utilisées pour produire des CAR-NK utilisées dans les cancers hématologiques. En collaboration avec le service de Recherche de l'EFS de Besançon, nous avons pour projet de développer des CAR-NK à partir de cellules NK amplifiées. Dans un contexte de patients atteints de LAM, nous pourrions sélectionner des cellules NK présentant les allotypes KIR2DL1\*003 et KIR2DL3\*001 associés aux motifs CenAA. Pour un patient atteint de LAL, nous pourrions sélectionner des cellules NK NKG2A<sup>+</sup>. Cependant, plusieurs leviers doivent être levés comme l'amplification *in vitro*, la conservation et la survie des cellules NK après infusion chez le patient. Plusieurs approches de gene editing sont envisagées notamment en ciblant l'IL-15 (Liu et al., 2018) qui permettrait de maintenir ces cellules NK

et de renforcer leur effet anti-leucémique. Des gènes peuvent être éteints par l'approche CrisPR/Cas9 par exemple. Par ailleurs, le transfert d'un CAR peut aussi être associé à d'autres gènes d'intérêt pour renforcer les fonctions NK. Nous envisageons notamment d'utiliser un gène suicide afin de contrôler les CAR-NK *in vivo*.

Nos données sur le polymorphisme KIR/HLA permettent de mieux comprendre le répertoire fonctionnel des cellules NK dans le contexte des immunothérapies, dont les GCSH, peuvent également être utiles dans d'autres contextes tels que les problématiques associées à la grossesse comme la pré-éclampsie, les fausses-couches ou le don d'ovocytes. Plusieurs études génétiques ont démontré des associations entre des combinaisons KIR/HLA de classe I avec certains GSO dont la pré-éclampsie suggérant que ces gènes peuvent avoir un rôle dans la grossesse (Hiby et al., 2004; Huhn et al., 2018a). Plus particulièrement, Hiby et al. ont découvert que les génotypes KIR AA maternels associés aux molécules HLA-C2 fœtales étaient plus fréquents chez les femmes avec pré-éclampsie (Hiby et al., 2004). Une étude a récemment montré que les allèles inhibiteurs KIR2DL1\*001, KIR2DL1\*002 et KIR2DL1\*003 confèrent un gros risque de pré-éclampsie lorsque le gène activateur KIR2DS1 est absent (Huhn et al., 2018a). La connaissance des allèles KIR2DL1 impliqués dans les fausses couches spontanées pourrait aider dans la sélection des donneurs de spermes et d'ovocytes pour les fécondations *in vitro*. L'application d'un algorithme aux infections virales pourrait permettre d'identifier des combinaisons d'allèles KIR/HLA classe I protectrices contre une infection (virale ou bactérienne). Dans le contexte de l'infection par le VIH, différentes combinaisons génétiques HLA/KIR ont été associées au rythme de progression de la maladie (Martin et al., 2007, 2002) ou à l'absence de contamination (Boulet et al., 2008). En particulier, le polymorphisme allélique KIR3DL1/Bw4 et la présence de son homologue KIR3DS1 associé aux motifs Bw4 auraient un effet protecteur sur l'avancement de la maladie. La prise en compte de l'immunogénétique KIR/HLA pourrait également être d'un intérêt majeur dans le cadre de la pandémie liée au COVID-19 (Aguar et al., 2021). En effet, la fréquence de cellules NK KIR2DL2/3<sup>+</sup> est en corrélation avec la gravité de la maladie. De plus, les patients COVID-19 présentent une expression accrue de NKG2A par rapport aux témoins, ainsi que des caractéristiques d'épuisement fonctionnel des lymphocytes cytotoxiques (Zheng et al., 2020). Les

récepteurs KIR et NKG2A sont essentiels pour l'éducation des cellules NK aux premiers stades du développement (Boudreau and Hsu, 2018; Fauriat et al., 2010; Zhang et al., 2019) et le polymorphisme de ces récepteurs ainsi que de leurs ligands HLA pourrait être responsable de réponses immunitaires différentielles contre le SRAS-CoV-2. A l'heure actuelle, peu d'études ont abordé l'immunogénétique KIR dans le contexte du COVID-19 et beaucoup de travaux supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si certains haplotypes, génotypes, allèles KIR, et/ou combinaisons KIR/HLA sont impliqués dans le risque d'infection par le SRAS-CoV-2. Dans le contexte des maladies auto-immunes, plusieurs études ont corrélé l'incidence et la progression des maladies avec l'expression de récepteurs KIR et de certaines combinaisons KIR-HLA (Lünemann et al., 2009; Martin et al., 2003; Nelson et al., 2004; Sun et al., 2019; Toubi and Vadasz, 2019). Par exemple, chez les patients atteints de psoriasis et de rhumatisme psoriasique, il a été rapporté que la fréquence des cellules NK KIR2DS1 et/ou KIR2DS2 est plus élevée chez les patients comparativement aux témoins sains (Martin et al., 2003; Nelson et al., 2004). Autre exemple, chez les patients atteints d'arthrite réactive, la fréquence des cellules NK KIR2DL2 et KIR2DL5 est significativement inférieure à celle de témoins sains (Sun et al., 2019). Ces données indiquent que le déséquilibre de liaison entre les KIR inhibiteurs et activateurs peut affecter les fonctions des cellules NK et T et donc affecter les réponses immunitaires innées dans les maladies auto-immunes.

Dans leur ensemble, nos travaux ont permis d'amorcer une démarche visant une meilleure lecture de l'immunogénétique KIR/HLA dans notre compréhension des cellules NK. Ils doivent être poursuivis et intensifiés pour optimiser la sélection des donneurs de CSH et proposer des approches d'immunothérapies innovantes basées sur ces lymphocytes de l'immunité innée. Plus largement, nos travaux doivent aider à une meilleure compréhension de l'immunobiologie des cellules NK dans les contextes pathologiques (cancers solides, pathogènes et maladies auto-immunes) et dans le contexte de grossesse.



# BIBLIOGRAPHIE

- Abel, A.M., Yang, C., Thakar, M.S., Malarkannan, S., 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 9, 1869. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Adams, S.D., Barracchini, K.C., Chen, D., Robbins, F., Wang, L., Larsen, P., Luhm, R., Stroncek, D.F., 2004. Ambiguous allele combinations in HLA Class I and Class II sequence-based typing: when precise nucleotide sequencing leads to imprecise allele identification. *J Transl Med* 2, 30. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-2-30>
- Aguiar, V.R.C., Augusto, D.G., Castelli, E.C., Hollenbach, J.A., Meyer, D., Nunes, K., Petzl-Erler, M.L., 2021. An immunogenetic view of COVID-19. *Genet Mol Biol* 44, e20210036. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2021-0036>
- Akira, S., Takeda, K., 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol* 327, 581–589. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2004.04.002>
- Al-Ali, H., Cross, M., Lange, T., Freund, M., Dölken, G., Niederwieser, D., 2009. Low-dose total body irradiation-based regimens as a preparative regimen for allogeneic haematopoietic cell transplantation in acute myelogenous leukaemia. *Curr Opin Oncol* 21 Suppl 1, S17-22. <https://doi.org/10.1097/01.cco.0000357470.91584.62>
- Alvarez, R.A., Hamlin, R.E., Monroe, A., Moldt, B., Hotta, M.T., Rodriguez Caprio, G., Fierer, D.S., Simon, V., Chen, B.K., 2014. HIV-1 Vpu antagonism of tetherin inhibits antibody-dependent cellular cytotoxic responses by natural killer cells. *J Virol* 88, 6031–6046. <https://doi.org/10.1128/JVI.00449-14>
- Amorim, L.M., Augusto, D.G., Nemat-Gorgani, N., Montero-Martin, G., Marin, W.M., Shams, H., Dandekar, R., Caillier, S., Parham, P., Fernández-Viña, M.A., Oksenberg, J.R., Norman, P.J., Hollenbach, J.A., 2021. High-Resolution Characterization of KIR Genes in a Large North American Cohort Reveals Novel Details of Structural and Sequence Diversity. *Front Immunol* 12, 674778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.674778>
- Anegón, I., Cuturi, M.C., Trinchieri, G., Perussia, B., 1988. Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med* 167, 452–472. <https://doi.org/10.1084/jem.167.2.452>
- Anfossi, N., André, P., Guia, S., Falk, C.S., Roetyneck, S., Stewart, C.A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagné, F., Ugolini, S., Vivier, E., 2006. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 25, 331–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.013>
- Angelini, D.F., Borsellino, G., Poupot, M., Diamantini, A., Poupot, R., Bernardi, G., Poccia, F., Fournié, J.-J., Battistini, L., 2004. FcγRIII discriminates between 2 subsets of Vγ9Vδ2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood* 104, 1801–1807. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0331>
- Apps, R., Gardner, L., Moffett, A., 2008. A critical look at HLA-G. *Trends Immunol* 29, 313–321. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.02.012>
- Apps, R., Meng, Z., Del Prete, G.Q., Lifson, J.D., Zhou, M., Carrington, M., 2015. Relative expression levels of the HLA class-I proteins in normal and HIV-infected cells. *J Immunol* 194, 3594–3600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403234>
- Apps, R., Qi, Y., Carlson, J.M., Chen, H., Gao, X., Thomas, R., Yuki, Y., Del Prete, G.Q., Goulder, P., Brumme, Z.L., Brumme, C.J., John, M., Mallal, S., Nelson, G., Bosch, R., Heckerman, D., Stein, J.L., Soderberg, K.A., Moody, M.A., Denny, T.N., Zeng, X., Fang, J., Moffett, A., Lifson, J.D., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Fellay, J., McLaren, P., Deeks, S.G., Pereyra, F., Walker, B., Michael, N.L., Weintrob, A., Wolinsky, S., Liao, W., Carrington, M., 2013. Influence of HLA-C expression level on HIV control. *Science* 340, 87–91. <https://doi.org/10.1126/science.1232685>

- Apps, R., Sharkey, A., Gardner, L., Male, V., Kennedy, P., Masters, L., Farrell, L., Jones, D., Thomas, R., Moffett, A., 2011. Ex vivo functional responses to HLA-G differ between blood and decidual NK cells. *Mol Hum Reprod* 17, 577–586. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar022>
- Arima, N., Kanda, J., Tanaka, J., Yabe, T., Morishima, Y., Kim, S.-W., Najima, Y., Ozawa, Y., Eto, T., Kanamori, H., Mori, T., Kobayashi, N., Kondo, T., Nakamae, H., Uchida, N., Inoue, M., Fukuda, T., Ichinohe, T., Atsuta, Y., Kanda, Y., 2018. Homozygous HLA-C1 is Associated with Reduced Risk of Relapse after HLA-Matched Transplantation in Patients with Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 717–725. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.029>
- Arima, N., Kanda, J., Yabe, T., Morishima, Y., Tanaka, J., Kako, S., Sakaguchi, H., Kato, M., Ohashi, K., Ozawa, Y., Fukuda, T., Ota, S., Tachibana, T., Onizuka, M., Ichinohe, T., Atsuta, Y., Kanda, Y., 2020. Increased Relapse Risk of Acute Lymphoid Leukemia in Homozygous HLA-C1 Patients after HLA-Matched Allogeneic Transplantation: A Japanese National Registry Study. *Biol Blood Marrow Transplant* 26, 431–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.10.032>
- Artis, D., Spits, H., 2015. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* 517, 293–301. <https://doi.org/10.1038/nature14189>
- Atanackovic, D., Luetkens, T., Kröger, N., 2014. Coinhibitory molecule PD-1 as a potential target for the immunotherapy of multiple myeloma. *Leukemia* 28, 993–1000. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.310>
- Augusto, D.G., Norman, P.J., Dandekar, R., Hollenbach, J.A., 2019. Fluctuating and Geographically Specific Selection Characterize Rapid Evolution of the Human KIR Region. *Front Immunol* 10, 989. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00989>
- Bachanova, V., Weisdorf, D.J., Wang, T., Marsh, S.G.E., Trachtenberg, E., Haagenson, M.D., Spellman, S.R., Ladner, M., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S., Cooley, S.A., 2016. Donor KIR B Genotype Improves Progression-Free Survival of Non-Hodgkin Lymphoma Patients Receiving Unrelated Donor Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 22, 1602–1607. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.05.016>
- Bachiller, M., Battram, A.M., Perez-Amill, L., Martín-Antonio, B., 2020. Natural Killer Cells in Immunotherapy: Are We Nearly There? *Cancers (Basel)* 12, E3139. <https://doi.org/10.3390/cancers12113139>
- Bachtel, N.D., Umvilighozo, G., Pickering, S., Mota, T.M., Liang, H., Prete, G.Q.D., Chatterjee, P., Lee, G.Q., Thomas, R., Brockman, M.A., Neil, S., Carrington, M., Bwana, B., Bangsberg, D.R., Martin, J.N., Kallas, E.G., Donini, C.S., Cerqueira, N.B., O’Doherty, U.T., Hahn, B.H., Jones, R.B., Brumme, Z.L., Nixon, D.F., Apps, R., 2018. HLA-C downregulation by HIV-1 adapts to host HLA genotype. *PLOS Pathogens* 14, e1007257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007257>
- Bacigalupo, A., Ballen, K., Rizzo, D., Giralt, S., Lazarus, H., Ho, V., Apperley, J., Slavin, S., Pasquini, M., Sandmaier, B.M., Barrett, J., Blaise, D., Lowski, R., Horowitz, M., 2009. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 1628–1633. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.07.004>
- Bailey, C.P., Budak-Alpdogan, T., Sauter, C.T., Panis, M.M., Buyukgoz, C., Jeng, E.K., Wong, H.C., Flomenberg, N., Alpdogan, O., 2017. New interleukin-15 superagonist (IL-15SA) significantly enhances graft-versus-tumor activity. *Oncotarget* 8, 44366–44378. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17875>
- Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T.A., 1994. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4940–4944. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4940>
- Bari, R., Bell, T., Leung, W.-H., Vong, Q.P., Chan, W.K., Gupta, N.D., Holladay, M., Rooney, B., Leung, W., 2009. Significant functional heterogeneity among KIR2DL1 alleles and a pivotal role of arginine245. *Blood* 114, 5182–5190. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-231977>
- Barnes, D.W., Corp, M.J., Loutit, J.F., Neal, F.E., 1956. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J* 2, 626–627. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4993.626>

- Baron, F., Labopin, M., Niederwieser, D., Vigouroux, S., Cornelissen, J.J., Malm, C., Vindelov, L.L., Blaise, D., Janssen, J.J.W.M., Petersen, E., Socié, G., Nagler, A., Rocha, V., Mohty, M., 2012. Impact of graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: a report from the Acute Leukemia Working Party of the European group for blood and marrow transplantation. *Leukemia* 26, 2462–2468. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.135>
- Bassan, R., Bourquin, J.-P., DeAngelo, D.J., Chiaretti, S., 2018. New Approaches to the Management of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* JCO2017773648. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.3648>
- Bastos-Oreiro, M., Anguita, J., Martínez-Laperche, C., Fernández, L., Buces, E., Navarro, A., Pascual, C., Pérez-Corral, A., Balsalobre, P., Muñoz, C., Kwon, M., Serrano, D., Perez-Martinez, A., Buño, I., Gayoso, J., Díez-Martín, J.L., 2016. Inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor (iKIR) mismatches improve survival after T-cell-repleted haploidentical transplantation. *Eur J Haematol* 96, 483–491. <https://doi.org/10.1111/ejh.12616>
- Baumeister, S.H.C., Rambaldi, B., Shapiro, R.M., Romee, R., 2020. Key Aspects of the Immunobiology of Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00191>
- Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C., Caligiuri, M.A., 2010. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–2294. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-271874>
- Benson, D.M., Cohen, A.D., Jagannath, S., Munshi, N.C., Spitzer, G., Hofmeister, C.C., Efebera, Y.A., Andre, P., Zerbib, R., Caligiuri, M.A., 2015. A Phase I Trial of the Anti-KIR Antibody IPH2101 and Lenalidomide in Patients with Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 21, 4055–4061. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0304>
- Benson, D.M., Hofmeister, C.C., Padmanabhan, S., Suvannasankha, A., Jagannath, S., Abonour, R., Bakan, C., Andre, P., Efebera, Y., Tiollier, J., Caligiuri, M.A., Farag, S.S., 2012. A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 120, 4324–4333. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-438028>
- Bernard, N.F., 2017. Natural killer (NK) cell receptor-HLA ligand genotype combinations associated with protection from HIV infection: investigation of how protective genotypes influence anti HIV NK cell functions. *AIDS Res Ther* 14, 38. <https://doi.org/10.1186/s12981-017-0172-9>
- Bettens, F., Brunet, L., Tiercy, J.-M., 2014. High-allelic variability in HLA-C mRNA expression: association with HLA-extended haplotypes. *Genes Immun.* 15, 176–181. <https://doi.org/10.1038/gene.2014.1>
- Béziat, V., Hilton, H.G., Norman, P.J., Traherne, J.A., 2017. Deciphering the killer-cell immunoglobulin-like receptor system at super-resolution for natural killer and T-cell biology. *Immunology* 150, 248–264. <https://doi.org/10.1111/imm.12684>
- Béziat, V., Liu, L.L., Malmberg, J.-A., Ivarsson, M.A., Sohlberg, E., Björklund, A.T., Retière, C., Sverremark-Ekström, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D.A., Trowsdale, J., Michaëlsson, J., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2013a. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* 121, 2678–2688. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-459545>
- Béziat, V., Traherne, J.A., Liu, L.L., Jayaraman, J., Enqvist, M., Larsson, S., Trowsdale, J., Malmberg, K.-J., 2013b. Influence of KIR gene copy number on natural killer cell education. *Blood* 121, 4703–4707. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-10-461442>
- Bhardwaj, S., Ahmad, F., Wedemeyer, H., Cornberg, M., Schulze Zur Wiesch, J., van Lunzen, J., Sarin, S.K., Schmidt, R.E., Meyer-Olson, D., 2016. Increased CD56(bright) NK cells in HIV-HCV co-infection and HCV mono-infection are associated with distinctive alterations of their phenotype. *Virology* 13, 67. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0507-5>
- Bignon, J.-D., Gagne, K., 2005. KIR matching in hematopoietic stem cell transplantation. *Current Opinion in Immunology* 17, 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.07.014>

- Biron, C.A., Byron, K.S., Sullivan, J.L., 1989. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med* 320, 1731–1735. <https://doi.org/10.1056/NEJM198906293202605>
- Björkström, N.K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Björklund, A.T., Flodström-Tullberg, M., Michaëlsson, J., Rottenberg, M.E., Guzmán, C.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., 2010. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* 116, 3853–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281675>
- Blázquez-Moreno, A., Park, S., Im, W., Call, M.J., Call, M.E., Reyburn, H.T., 2017. Transmembrane features governing Fc receptor CD16A assembly with CD16A signaling adaptor molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E5645–E5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706483114>
- Bonilla, F.A., Bernstein, I.L., Khan, D.A., Ballas, Z.K., Chinen, J., Frank, M.M., Kobrynski, L.J., Levinson, A.I., Mazer, B., Nelson, R.P., Orange, J.S., Routes, J.M., Shearer, W.T., Sorensen, R.U., American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology, Joint Council of Allergy, Asthma and Immunology, 2005. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol* 94, S1-63. [https://doi.org/10.1016/s1081-1206\(10\)61142-8](https://doi.org/10.1016/s1081-1206(10)61142-8)
- Bonilla, F.A., Oettgen, H.C., 2010. Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2010 Primer on Allergic and Immunologic Diseases 125, S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borrego, F., Kabat, J., Kim, D.-K., Lieto, L., Maasho, K., Peña, J., Solana, R., Coligan, J.E., 2002. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol Immunol* 38, 637–660. [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(01\)00107-9](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(01)00107-9)
- Borst, L., Burg, S.H. van der, Hall, T. van, 2020. The NKG2A–HLA-E Axis as a Novel Checkpoint in the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res* 26, 5549–5556. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-2095>
- Bortin, M.M., 1970. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* 9, 571–587. <https://doi.org/10.1097/00007890-197006000-00006>
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., Moretta, A., 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198, 557–567. <https://doi.org/10.1084/jem.20030788>
- Boudreau, J.E., Giglio, F., Gooley, T.A., Stevenson, P.A., Le Luduec, J.-B., Shaffer, B.C., Rajalingam, R., Hou, L., Hurley, C.K., Noreen, H., Reed, E.F., Yu, N., Vierra-Green, C., Haagensohn, M., Malkki, M., Petersdorf, E.W., Spellman, S., Hsu, K.C., 2017. KIR3DL1/HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J Clin Oncol* 35, 2268–2278. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7059>
- Boudreau, J.E., Hsu, K.C., 2018. Natural killer cell education in human health and disease. *Curr Opin Immunol* 50, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.11.003>
- Boudreau, J.E., Liu, X.-R., Zhao, Z., Zhang, A., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Dupont, B., Hsu, K.C., 2016. Cell-extrinsic MHC class I molecule engagement augments human NK cell education programmed by cell-intrinsic MHC class I. *Immunity* 45, 280–291. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.005>
- Boukouaci, W., Busson, M., Fortier, C., Amokrane, K., de Latour, R.P., Robin, M., Krishnamoorthy, R., Toubert, A., Charron, D., Socié, G., Tamouza, R., 2011. Association of HLA-G low expressor genotype with severe acute graft-versus-host disease after sibling bone marrow transplantation. *Front Immunol* 2, 74. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00074>
- Boulanger, M.J., Garcia, K.C., 2004. Shared cytokine signaling receptors: structural insights from the gp130 system. *Adv Protein Chem* 68, 107–146. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(04\)68004-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(04)68004-1)
- Boulet, S., Kleyman, M., Kim, J.Y., Kamyra, P., Sharafi, S., Simic, N., Bruneau, J., Routy, J.-P., Tsoukas, C.M., Bernard, N.F., 2008. A combined genotype of KIR3DL1 high expressing alleles and

- HLA-B\*57 is associated with a reduced risk of HIV infection. *AIDS* 22, 1487–1491. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282ffde7e>
- Bower, H., Andersson, T.M.-L., Björkholm, M., Dickman, P.W., Lambert, P.C., Derolf, Å.R., 2016. Continued improvement in survival of acute myeloid leukemia patients: an application of the loss in expectation of life. *Blood Cancer J* 6, e390. <https://doi.org/10.1038/bcj.2016.3>
- Boyington, J.C., Motyka, S.A., Schuck, P., Brooks, A.G., Sun, P.D., 2000. Crystal structure of an NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. *Nature* 405, 537–543. <https://doi.org/10.1038/35014520>
- Braud, V.M., Allan, D.S., McMichael, A.J., 1999. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Current Opinion in Immunology* 11, 100–108. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(99\)80018-1](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(99)80018-1)
- Braud, V.M., Biton, J., Becht, E., Knockaert, S., Mansuet-Lupo, A., Cosson, E., Damotte, D., Alifano, M., Validire, P., Anjuère, F., Cremer, I., Girard, N., Gossot, D., Seguin-Givelet, A., Dieu-Nosjean, M.-C., Germain, C., 2018. Expression of LLT1 and its receptor CD161 in lung cancer is associated with better clinical outcome. *Oncoimmunology* 7, e1423184. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1423184>
- Brodin, P., Höglund, P., 2008. Beyond licensing and disarming: a quantitative view on NK-cell education. *Eur J Immunol* 38, 2934–2937. <https://doi.org/10.1002/eji.200838760>
- Brosens, I., Pijnenborg, R., Vercruyse, L., Romero, R., 2011. The “Great Obstetrical Syndromes” are associated with disorders of deep placentation. *Am J Obstet Gynecol* 204, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.08.009>
- Brown, D., Trowsdale, J., Allen, R., 2004. The LILR family: modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64, 215–225. <https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00290.x>
- Bunce, M., Passey, B., 2013. HLA typing by sequence-specific primers. *Methods Mol Biol* 1034, 147–159. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-493-7_8)
- Burian, A., Wang, K.L., Finton, K.A.K., Lee, N., Ishitani, A., Strong, R.K., Geraghty, D.E., 2016. HLA-F and MHC-I Open Conformers Bind Natural Killer Cell Ig-Like Receptor KIR3DS1. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163297>
- Burnett, A., Wetzler, M., Löwenberg, B., 2011. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 29, 487–494. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1820>
- Cai, M.-Y., Xu, Y.-F., Qiu, S.-J., Ju, M.-J., Gao, Q., Li, Y.-W., Zhang, B.-H., Zhou, J., Fan, J., 2009. Human leukocyte antigen-G protein expression is an unfavorable prognostic predictor of hepatocellular carcinoma following curative resection. *Clin Cancer Res* 15, 4686–4693. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0463>
- Cantoni, C., Ponassi, M., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M., Bordo, D., 2003. The three-dimensional structure of the human NK cell receptor NKp44, a triggering partner in natural cytotoxicity. *Structure* 11, 725–734. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(03\)00095-9](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(03)00095-9)
- Cao, K., Chopek, M., Fernández-Viña, M.A., 1999. High and intermediate resolution DNA typing systems for class I HLA-A, B, C genes by hybridization with sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). *Rev Immunogenet* 1, 177–208.
- Cardozo, D.M., Marangon, A.V., da Silva, R.F., Aranha, F.J.P., Visentainer, J.E.L., Bonon, S.H.A., Costa, S.C.B., Miranda, E.C.M., de Souza, C.A., Guimarães, F., 2016. Synergistic effect of KIR ligands missing and cytomegalovirus reactivation in improving outcomes of haematopoietic stem cell transplantation from HLA-matched sibling donor for treatment of myeloid malignancies. *Hum Immunol* 77, 861–868. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.07.003>
- Carey, B.S., Poulton, K.V., Poles, A., 2019. Factors affecting HLA expression: A review. *International Journal of Immunogenetics* 46, 307–320. <https://doi.org/10.1111/iji.12443>
- Carlomagno, S., Falco, M., Bono, M., Alicata, C., Garbarino, L., Mazzocco, M., Moretta, L., Moretta, A., Sivori, S., 2017. KIR3DS1-Mediated Recognition of HLA-\*B51: Modulation of KIR3DS1 Responsiveness by Self HLA-B Allotypes and Effect on NK Cell Licensing. *Front Immunol* 8, 581. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00581>
- Carlsten, M., Korde, N., Kotecha, R., Reger, R., Bor, S., Kazandjian, D., Landgren, O., Childs, R.W., 2016. Checkpoint Inhibition of KIR2D with the Monoclonal Antibody IPH2101 Induces

- Contraction and Hyporesponsiveness of NK Cells in Patients with Myeloma. *Clin Cancer Res* 22, 5211–5222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1108>
- Carr, W.H., Pando, M.J., Parham, P., 2005. KIR3DL1 Polymorphisms That Affect NK Cell Inhibition by HLA-Bw4 Ligand. *The Journal of Immunology* 175, 5222–5229. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.8.5222>
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J.J., Moretta, L., Moretta, A., López-Botet, M., 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27, 563–567. <https://doi.org/10.1002/eji.1830270230>
- Castelli, R., Cannavò, A., Conforti, F., Grava, G., Cortelezzi, A., 2012. Immunomodulatory drugs in multiple myeloma: from molecular mechanisms of action to clinical practice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 34, 740–753. <https://doi.org/10.3109/08923973.2012.658921>
- Chalifour, A., Scarpellino, L., Back, J., Brodin, P., Devèvre, E., Gros, F., Lévy, F., Leclercq, G., Höglund, P., Beermann, F., Held, W., 2009. A Role for cis Interaction between the Inhibitory Ly49A receptor and MHC class I for natural killer cell education. *Immunity* 30, 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.12.019>
- Chan, A.C., Neeson, P., Leeansyah, E., Tainton, K., Quach, H., Prince, H.M., Harrison, S.J., Godfrey, D.I., Ritchie, D., Berzins, S.P., 2014. Natural killer T cell defects in multiple myeloma and the impact of lenalidomide therapy. *Clin Exp Immunol* 175, 49–58. <https://doi.org/10.1111/cei.12196>
- Chan, H.-W., Miller, J.S., Moore, M.B., Lutz, C.T., 2005. Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles. *J Immunol* 175, 5966–5974. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5966>
- Chapman, T.L., Heikeman, A.P., Bjorkman, P.J., 1999. The inhibitory receptor LIR-1 uses a common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity* 11, 603–613. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80135-1](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80135-1)
- Charoudeh, H.N., Schmied, L., Gonzalez, A., Terszowski, G., Czaja, K., Schmitter, K., Infanti, L., Buser, A., Stern, M., 2012. Quantity of HLA-C surface expression and licensing of KIR2DL+ natural killer cells. *Immunogenetics* 64, 739–745. <https://doi.org/10.1007/s00251-012-0633-1>
- Chen, C., Busson, M., Rocha, V., Appert, M.-L., Lepage, V., Dulphy, N., Haas, P., Socié, G., Toubert, A., Charron, D., Loiseau, P., 2006. Activating KIR genes are associated with CMV reactivation and survival after non-T-cell depleted HLA-identical sibling bone marrow transplantation for malignant disorders. *Bone Marrow Transplant* 38, 437–444. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705468>
- Chen, D.-F., Prasad, V.K., Broadwater, G., Reinsmoen, N.L., DeOliveira, A., Clark, A., Sullivan, K.M., Chute, J.P., Horwitz, M.E., Gasparetto, C., Long, G.D., Yang, Y., Chao, N.J., Rizzieri, D.A., 2012. Differential impact of inhibitory and activating Killer Ig-Like Receptors (KIR) on high-risk patients with myeloid and lymphoid malignancies undergoing reduced intensity transplantation from haploidentical related donors. *Bone Marrow Transplant* 47, 817–823. <https://doi.org/10.1038/bmt.2011.181>
- Chen, X.-Y., Yan, W.-H., Lin, A., Xu, H.-H., Zhang, J.-G., Wang, X.-X., 2008. The 14 bp deletion polymorphisms in HLA-G gene play an important role in the expression of soluble HLA-G in plasma. *Tissue Antigens* 72, 335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01107.x>
- Chen, Y., Lu, D., Churov, A., Fu, R., 2020. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators Inflamm* 2020, 6437057. <https://doi.org/10.1155/2020/6437057>
- Chewning, J.H., Gudme, C.N., Hsu, K.C., Selvakumar, A., Dupont, B., 2007. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol* 179, 854–868. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.854>
- Chigbu, D.I., Loonawat, R., Sehgal, M., Patel, D., Jain, P., 2019. Hepatitis C Virus Infection: Host–Virus Interaction and Mechanisms of Viral Persistence. *Cells* 8, 376. <https://doi.org/10.3390/cells8040376>
- Chklovskaya, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M., Wodnar-Filipowicz, A., 2004. Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell

- transplantation: effects of endogenous flt3 ligand. *Blood* 103, 3860–3868. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1200>
- Christopher, M.J., Petti, A.A., Rettig, M.P., Miller, C.A., Chendamarai, E., Duncavage, E.J., Klco, J.M., Helton, N.M., O’Laughlin, M., Fronick, C.C., Fulton, R.S., Wilson, R.K., Wartman, L.D., Welch, J.S., Heath, S.E., Baty, J.D., Payton, J.E., Graubert, T.A., Link, D.C., Walter, M.J., Westervelt, P., Ley, T.J., DiPersio, J.F., 2018. Immune Escape of Relapsed AML Cells after Allogeneic Transplantation. *N Engl J Med* 379, 2330–2341. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1808777>
- Cichocki, F., Hanson, R.J., Lenvik, T., Pitt, M., McCullar, V., Li, H., Anderson, S.K., Miller, J.S., 2009. The transcription factor c-Myc enhances KIR gene transcription through direct binding to an upstream distal promoter element. *Blood* 113, 3245–3253. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-166389>
- Cieri, N., Greco, R., Crucitti, L., Morelli, M., Giglio, F., Levati, G., Assanelli, A., Carrabba, M.G., Bellio, L., Milani, R., Lorentino, F., Stanghellini, M.T.L., De Freitas, T., Markt, S., Bernardi, M., Corti, C., Vago, L., Bonini, C., Ciceri, F., Peccatori, J., 2015. Post-transplantation Cyclophosphamide and Sirolimus after Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using a Treosulfan-based Myeloablative Conditioning and Peripheral Blood Stem Cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 21, 1506–1514. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.04.025>
- Cirulli, V., Zalatan, J., McMaster, M., Prinsen, R., Salomon, D.R., Ricordi, C., Torbett, B.E., Meda, P., Crisa, L., 2006. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. *Diabetes* 55, 1214–1222. <https://doi.org/10.2337/db05-0731>
- Ciurea, S.O., Mulanovich, V., Saliba, R.M., Bayraktar, U.D., Jiang, Y., Bassett, R., Wang, S.A., Konopleva, M., Fernandez-Vina, M., Montes, N., Bosque, D., Chen, J., Rondon, G., Alatrash, G., Alousi, A., Bashir, Q., Korbling, M., Qazilbash, M., Parmar, S., Shpall, E., Nieto, Y., Hosing, C., Kebriaei, P., Khouri, I., Popat, U., de Lima, M., Champlin, R.E., 2012. Improved early outcomes using a T cell replete graft compared with T cell depleted haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 18, 1835–1844. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.07.003>
- Clausen, J., Kircher, B., Auberger, J., Schumacher, P., Ulmer, H., Hetzenauer, G., Wolf, D., Gastl, G., Nachbaur, D., 2010. The role of missing killer cell immunoglobulin-like receptor ligands in T cell replete peripheral blood stem cell transplantation from HLA-identical siblings. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.10.021>
- Clausen, J., Wolf, D., Petzer, A.L., Gunsilius, E., Schumacher, P., Kircher, B., Gastl, G., Nachbaur, D., 2007. Impact of natural killer cell dose and donor killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genotype on outcome following human leucocyte antigen-identical haematopoietic stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol* 148, 520–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03360.x>
- Clémenceau, B., Vivien, R., Berthomé, M., Robillard, N., Garand, R., Gallot, G., Vollant, S., Vié, H., 2008. Effector memory alpha beta T lymphocytes can express Fc gamma RIIIa and mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol* 180, 5327–5334. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5327>
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., Moreno, M., 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320–2328. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19970615\)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19970615)79:12<2320::aid-cnrcr5>3.0.co;2-p)
- Colonna, M., 1997. Specificity and function of immunoglobulin superfamily NK cell inhibitory and stimulatory receptors. *Immunol Rev* 155, 127–133. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb00945.x>
- Colonna, M., Brooks, E.G., Falco, M., Ferrara, G.B., Strominger, J.L., 1993. Generation of allospecific natural killer cells by stimulation across a polymorphism of HLA-C. *Science* 260, 1121–1124. <https://doi.org/10.1126/science.8493555>
- Comeau, E.M., Holder, K.A., Fudge, N.J., Grant, M.D., 2019. Cytomegalovirus-Driven Adaption of Natural Killer Cells in NKG2Cnull Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *Viruses* 11, E239. <https://doi.org/10.3390/v11030239>

- Cook, M., Briggs, D., Craddock, C., Mahendra, P., Milligan, D., Fegan, C., Darbyshire, P., Lawson, S., Boxall, E., Moss, P., 2006. Donor KIR genotype has a major influence on the rate of cytomegalovirus reactivation following T-cell replete stem cell transplantation. *Blood* 107, 1230–1232. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1039>
- Cooley, S., McCullar, V., Wangen, R., Bergemann, T.L., Spellman, S., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2005. KIR reconstitution is altered by T cells in the graft and correlates with clinical outcomes after unrelated donor transplantation. *Blood* 106, 4370–4376. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1644>
- Cooley, S., Parham, P., Miller, J.S., 2018. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 131, 1053–1062. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-08-752170>
- Cooley, S., Trachtenberg, E., Bergemann, T.L., Saeteurn, K., Klein, J., Le, C.T., Marsh, S.G.E., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S., Weisdorf, D.J., 2009. Donors with group B KIR haplotypes improve relapse-free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 113, 726–732. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-171926>
- Cooley, S., Weisdorf, D.J., Guethlein, L.A., Klein, J.P., Wang, T., Le, C.T., Marsh, S.G.E., Geraghty, D., Spellman, S., Haagenson, M.D., Ladner, M., Trachtenberg, E., Parham, P., Miller, J.S., 2010. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 116, 2411–2419. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-283051>
- Cooper, M.A., Bush, J.E., Fehniger, T.A., VanDeusen, J.B., Waite, R.E., Liu, Y., Aguila, H.L., Caligiuri, M.A., 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 100, 3633–3638. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0293>
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633–640. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(01\)02060-9](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(01)02060-9)
- Corat, M.A.F., Schlums, H., Wu, C., Theorell, J., Espinoza, D.A., Sellers, S.E., Townsley, D.M., Young, N.S., Bryceson, Y.T., Dunbar, C.E., Winkler, T., 2017. Acquired somatic mutations in PNH reveal long-term maintenance of adaptive NK cells independent of HSPCs. *Blood* 129, 1940–1946. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-734285>
- Cornelissen, J.J., Blaise, D., 2016. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* 127, 62–70. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-07-604546>
- Correia, D.V., Fogli, M., Hudspeth, K., da Silva, M.G., Mavilio, D., Silva-Santos, B., 2011. Differentiation of human peripheral blood V $\delta$ 1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood* 118, 992–1001. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-339135>
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J., 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–133. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00095-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00095-4)
- Cresswell, P., 2019. A personal retrospective on the mechanisms of antigen processing. *Immunogenetics* 71, 141–160. <https://doi.org/10.1007/s00251-018-01098-2>
- Cuellar-Rodriguez, J., Gea-Banacloche, J., Freeman, A.F., Hsu, A.P., Zerbe, C.S., Calvo, K.R., Wilder, J., Kurlander, R., Olivier, K.N., Holland, S.M., Hickstein, D.D., 2011. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. *Blood* 118, 3715–3720. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-365049>
- da Silva, G.B.R.F., Silva, T.G.A., Duarte, R.A., Neto, N.L., Carrara, H.H.A., Donadi, E.A., Gonçalves, M.A.G., Soares, E.G., Soares, C.P., 2013. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. *Int J Breast Cancer* 2013, 250435. <https://doi.org/10.1155/2013/250435>
- Dalva, K., Beksac, M., 2007. Sequence-specific primed PCR (PCR-SSP) typing of HLA Class I and Class II alleles. *Methods Mol Med* 134, 51–60. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-223-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-223-6_4)
- Danzer, M., Polin, H., Pröll, J., Haunschmid, R., Hofer, K., Stabentheiner, S., Hackl, C., Kasparu, H., König, J., Hauser, H., Binder, M., Weiss, R., Gabriel, C., Krieger, O., 2009. Clinical significance of HLA-E\*0103 homozygosity on survival after allogeneic hematopoietic stem-



- cell transplantation. *Transplantation* 88, 528–532. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181b0e79e>
- David, G., Djaoud, Z., Willem, C., Legrand, N., Rettman, P., Gagne, K., Cesbron, A., Retière, C., 2013. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *The Journal of Immunology* 191, 4778–4788. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301580>
- David, G., Morvan, M., Gagne, K., Kerdudou, N., Willem, C., Devys, A., Bonneville, M., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C., 2009. Discrimination between the main activating and inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptor positive natural killer cell subsets using newly characterized monoclonal antibodies. *Immunology* 128, 172–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03085.x>
- de Vries, E., Koene, H.R., Vossen, J.M., Gratama, J.-W., von dem Borne, A.E.G.Kr., Waaijer, J.L.M., Haraldsson, A., de Haas, M., van Tol, M.J.D., 1996. Identification of an Unusual Fcγ Receptor IIIa (CD16) on Natural Killer Cells in a Patient With Recurrent Infections. *Blood* 88, 3022–3027. <https://doi.org/10.1182/blood.V88.8.3022.bloodjournal8883022>
- Del Val, M., Antón, L.C., Ramos, M., Muñoz-Abad, V., Campos-Sánchez, E., 2020. Endogenous TAP-independent MHC-I antigen presentation: not just the ER lumen. *Current Opinion in Immunology* 64, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2019.12.003>
- Della Chiesa, M., Falco, M., Podestà, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F., Moretta, A., 2012. Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood* 119, 399–410. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-372003>
- Derré, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F., Gervois, N., 2006. Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. *J Immunol* 177, 3100–3107. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3100>
- Di Cristofaro, J., Pelardy, M., Loundou, A., Basire, A., Gomez, C., Chiaroni, J., Thomas, P., Reynaud-Gaubert, M., Picard, C., 2016. HLA-E\*01:03 Allele in Lung Transplant Recipients Correlates with Higher Chronic Lung Allograft Dysfunction Occurrence. *J Immunol Res* 2016, 1910852. <https://doi.org/10.1155/2016/1910852>
- Di Santo, J.P., Vosshenrich, C.A.J., 2006. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunol Rev* 214, 35–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00461.x>
- Diefenbach, A., Jensen, E.R., Jamieson, A.M., Raulet, D.H., 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165–171. <https://doi.org/10.1038/35093109>
- Djaoud, Z., David, G., Bressollette, C., Willem, C., Rettman, P., Gagne, K., Legrand, N., Mehlal, S., Cesbron, A., Imbert-Marcille, B.-M., Retière, C., 2013. Amplified NKG2C+ NK cells in cytomegalovirus (CMV) infection preferentially express killer cell Ig-like receptor 2DL: functional impact in controlling CMV-infected dendritic cells. *J Immunol* 191, 2708–2716. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301138>
- Djaoud, Z., Parham, P., 2020. HLAs, TCRs, and KIRs, a Triumvirate of Human Cell-Mediated Immunity. *Annu. Rev. Biochem.* 89, 717–739. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011520-102754>
- Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L., Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.-F., Wei, A.H., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D., 2017. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* 129, 424–447. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-08-733196>
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D., European LeukemiaNet, 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453–474. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-235358>

- Döhning, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M., Colonna, M., 1996. A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2. *J Immunol* 156, 3098–3101.
- Dranoff, G., 2004. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4, 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc1252>
- Du, Z., Sharma, S.K., Spellman, S., Reed, E.F., Rajalingam, R., 2008. KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes. *Genes Immun* 9, 470–480. <https://doi.org/10.1038/gene.2008.39>
- Dubois, S., Mariner, J., Waldmann, T.A., Tagaya, Y., 2002. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity* 17, 537–547. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(02\)00429-6](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(02)00429-6)
- Dubois, V., Amokrane, K., Beguin, Y., Bruno, B., Chevallier, P., Delbos, F., Devillier, R., Giannoli, C., Guidicelli, G., Harif, M., Loiseau, P., Rouzaire, P.-O., Varlet, P., Yakoub-Agha, I., Nguyen, S., 2020. [Haploidentical hematopoietic stem cell transplant: How to choose the best donor? Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)]. *Bull Cancer* 107, S72–S84. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2019.07.011>
- Dubreuil, L., Manianguou, B., Chevallier, P., Quémener, A., Legrand, N., Béné, M.C., Willem, C., David, G., Alizadeh, M., Makanga, D.R., Cesbron, A., Gendzekhadze, K., Gagne, K., Retière, C., 2020. Centromeric KIR AA Individuals Harbor Particular KIR Alleles Conferring Beneficial NK Cell Features with Implications in Haplo-Identical Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancers* 12, 3595. <https://doi.org/10.3390/cancers12123595>
- Duev-Cohen, A., Bar-On, Y., Glasner, A., Berhani, O., Ophir, Y., Levi-Schaffer, F., Mandelboim, M., Mandelboim, O., 2016. The human 2B4 and NTB-A receptors bind the influenza viral hemagglutinin and co-stimulate NK cell cytotoxicity. *Oncotarget* 7, 13093–13105. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7597>
- Dulberger, C.L., McMurtrey, C.P., Hölzemer, A., Neu, K.E., Liu, V., Steinbach, A.M., Garcia-Beltran, W.F., Sulak, M., Jabri, B., Lynch, V.J., Altfeld, M., Hildebrand, W.H., Adams, E.J., 2017. Human Leukocyte Antigen F Presents Peptides and Regulates Immunity through Interactions with NK Cell Receptors. *Immunity* 46, 1018–1029.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.002>
- Dunckley, H., 2012. HLA typing by SSO and SSP methods. *Methods Mol Biol* 882, 9–25. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-842-9_2)
- Dunphy, S.E., Guinan, K.J., Chorcora, C.N., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Pende, D., Middleton, D., Gardiner, C.M., 2015. 2DL1, 2DL2 and 2DL3 all contribute to KIR phenotype variability on human NK cells. *Genes and Immunity* 16, 301–310. <https://doi.org/10.1038/gene.2015.15>
- Eapen, M., Rocha, V., Sanz, G., Scaradavou, A., Zhang, M.-J., Arcese, W., Sirvent, A., Champlin, R.E., Chao, N., Gee, A.P., Isola, L., Laughlin, M.J., Marks, D.I., Nabhan, S., Ruggeri, A., Soiffer, R., Horowitz, M.M., Gluckman, E., Wagner, J.E., Center for International Blood and Marrow Transplant Research, Acute Leukemia Working Party Eurocord (the European Group for Blood Marrow Transplantation), National Cord Blood Program of the New York Blood Center, 2010. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 11, 653–660. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70127-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70127-3)
- Eckl, J., Buchner, A., Prinz, P.U., Riesenberger, R., Siegert, S.I., Kammerer, R., Nelson, P.J., Noessner, E., 2012. Transcript signature predicts tissue NK cell content and defines renal cell carcinoma subgroups independent of TNM staging. *J Mol Med (Berl)* 90, 55–66. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0806-7>
- Eissens, D.N., Schaap, N.P.M., Preijers, F.W.M.B., Dolstra, H., van Cranenbroek, B., Schattenberg, A.V.M., Joosten, I., van der Meer, A., 2010. CD3+/CD19+-depleted grafts in HLA-matched allogeneic peripheral blood stem cell transplantation lead to early NK cell cytolytic responses and reduced inhibitory activity of NKG2A. *Leukemia* 24, 583–591. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.269>
- El Costa, H., Casemayou, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Berrebi, A., Parant, O., Clouet-Delannoy, M., Lombardelli, L., Jabrane-Ferrat, N., Rukavina, D., Bensussan, A., Piccini, M.-P., Le

- Bouteiller, P., Tabiasco, J., 2008. Critical and differential roles of NKp46- and NKp30-activating receptors expressed by uterine NK cells in early pregnancy. *J Immunol* 181, 3009–3017. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.5.3009>
- Elmaagacli, A.H., Ottinger, H., Koldehoff, M., Peceny, R., Steckel, N.K., Trensche, R., Biersack, H., Grosse-Wilde, H., Beelen, D.W., 2005. Reduced risk for molecular disease in patients with chronic myeloid leukemia after transplantation from a KIR-mismatched donor. *Transplantation* 79, 1741–1747. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000164500.16052.3c>
- Elmaagacli, A.H., Steckel, N.K., Koldehoff, M., Hegerfeldt, Y., Trensche, R., Ditschkowski, M., Christoph, S., Gromke, T., Kordelas, L., Ottinger, H.D., Ross, R.S., Horn, P.A., Schnittger, S., Beelen, D.W., 2011. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 118, 1402–1412. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304121>
- El-Sherbiny, Y.M., Meade, J.L., Holmes, T.D., McGonagle, D., Mackie, S.L., Morgan, A.W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S.J., Davies, F.E., Morgan, G.J., Cook, G.P., 2007. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res* 67, 8444–8449. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4230>
- Etzioni, A., Eidenschenk, C., Katz, R., Beck, R., Casanova, J.L., Pollack, S., 2005. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr* 146, 423–425. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.11.022>
- Fan, Q.R., Long, E.O., Wiley, D.C., 2001. Crystal structure of the human natural killer cell inhibitory receptor KIR2DL1-HLA-Cw4 complex. *Nat. Immunol.* 2, 452–460. <https://doi.org/10.1038/87766>
- Farid, N.R., Barnard, J.M., Sampson, L., Noel, E.P., Marshall, W.H., 1978. The HLA B w4/w6 diallelic system in Graves' disease. *Tissue Antigens* 11, 394–398. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1978.tb01273.x>
- Fauci, A.S., Desrosiers, R.C., 1997. Pathogenesis of HIV and SIV, in: Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E. (Eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Fauriat, C., Ivarsson, M.A., Ljunggren, H.-G., Malmberg, K.-J., Michaëlsson, J., 2010. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood* 115, 1166–1174. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-245746>
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M.A., 2003. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052–3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2876>
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., Münz, C., 2004. 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, 16606–16611. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407522101>
- Fernandez, N.C., Treiner, E., Vance, R.E., Jamieson, A.M., Lemieux, S., Raulet, D.H., 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105, 4416–4423. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3156>
- Filipovich, A.H., Weisdorf, D., Pavletic, S., Socie, G., Wingard, J.R., Lee, S.J., Martin, P., Chien, J., Przepiorcka, D., Couriel, D., Cowen, E.W., Dinndorf, P., Farrell, A., Hartzman, R., Henslee-Downey, J., Jacobsohn, D., McDonald, G., Mittleman, B., Rizzo, J.D., Robinson, M., Schubert, M., Schultz, K., Shulman, H., Turner, M., Vogelsang, G., Flowers, M.E.D., 2005. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. Diagnosis and Staging Working Group Report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11, 945–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2005.09.004>
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Anasetti, C., Weisdorf, D., Miller, J.S., 2012a. Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol* 189, 5082–5088. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201964>

- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E.K., Weisdorf, D.J., Miller, J.S., 2011. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood* 118, 2784–2792. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347070>
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M.R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Vergès, S., Lanier, L.L., Weisdorf, D., Miller, J.S., 2012b. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C<sup>+</sup> natural killer cells with potent function. *Blood* 119, 2665–2674. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>
- Folgiero, V., Goffredo, B.M., Filippini, P., Masetti, R., Bonanno, G., Caruso, R., Bertaina, V., Mastronuzzi, A., Gaspari, S., Zecca, M., Torelli, G.F., Testi, A.M., Pession, A., Locatelli, F., Rutella, S., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget* 5, 2052–2064. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1504>
- Frazier, W.R., Steiner, N., Hou, L., Dakshnamurthy, S., Hurley, C.K., 2013. Allelic Variation in KIR2DL3 Generates a KIR2DL2-like Receptor with Increased Binding to its HLA-C Ligand. *J.I.* 190, 6198–6208. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300464>
- Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2006. Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214, 56–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>
- Fuchs, A., Colonna, M., 2006. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin Cancer Biol* 16, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.07.002>
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Bronte, V., 2012. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253–268. <https://doi.org/10.1038/nri3175>
- Gagne, K., Brizard, G., Gueglio, B., Milpied, N., Herry, P., Bonneville, F., Chéneau, M.-L., Schleinitz, N., Cesbron, A., Folléa, G., Harrousseau, J.-L., Bignon, J.-D., 2002. Relevance of KIR gene polymorphisms in bone marrow transplantation outcome. *Human Immunology* 63, 271–280. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(02\)00373-7](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(02)00373-7)
- Gagne, K., Busson, M., Balere-Appert, M.L., Absi, L., Jollet, I., Bignon, J.-D., Bois, M., Dormoy, A., Dubois, V., Gebuhrer, L., Loiseau, P., Masson, D., Moine, A., Perrier, P., Reviron, D., Charron, D., Raffoux, C., 2007. Relevance of KIR gene matching in unrelated hematopoietic stem cell transplantations. *Tissue Antigens* 69, 118–122. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2006.76210.x>
- Gagne, K., Busson, M., Bignon, J.-D., Balère-Appert, M.-L., Loiseau, P., Dormoy, A., Dubois, V., Perrier, P., Jollet, I., Bois, M., Masson, D., Moine, A., Absi, L., Blaise, D., Charron, D., Raffoux, C., ARS2000 FRM and FGM group, 2009. Donor KIR3DL1/3DS1 gene and recipient Bw4 KIR ligand as prognostic markers for outcome in unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 1366–1375. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.06.015>
- Gagne, K., Loiseau, P., Dubois, V., Dufossé, F., Perrier, P., Dormoy, A., Jollet, I., Renac, V., Masson, D., Picard, C., Lafarge, X., Hanau, D., Quainon, F., Delbos, F., Coeffic, B., Absi, L., Eliaou, J.-F., Moalic, V., Fort, M., de Matteis, M., Theodorou, I., Hau, F., Batho, A., Pedron, B., Caillat-Zucman, S., Marry, E., Raus, N., Yakoub-Agha, I., Cesbron, A., 2015. Is there any impact of HLA-DPB1 disparity in 10/10 HLA-matched unrelated hematopoietic SCT? Results of a French multicentric retrospective study. *Bone Marrow Transplant* 50, 232–236. <https://doi.org/10.1038/bmt.2014.253>
- Gagne, K., Willem, C., Legrand, N., Djaoud, Z., David, G., Rettman, P., Bressollette-Bodin, C., Senitzer, D., Esbelin, J., Cesbron-Gautier, A., Schneider, T., Retière, C., 2013. Both the nature of KIR3DL1 alleles and the KIR3DL1/S1 allele combination affect the KIR3DL1 NK-cell repertoire in the French population. *European Journal of Immunology* 43, 1085–1098. <https://doi.org/10.1002/eji.201243007>
- Gallez-Hawkins, G.M., Franck, A.E., Li, X., Thao, L., Oki, A., Gendzekhadze, K., Dagis, A., Palmer, J., Nakamura, R., Forman, S.J., Senitzer, D., Zaia, J.A., 2011. Expression of activating KIR2DS2 and KIR2DS4 genes after hematopoietic cell transplantation: relevance to cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant* 17, 1662–1672. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.04.008>

- Gao, F., Ye, Y., Gao, Y., Huang, H., Zhao, Y., 2020. Influence of KIR and NK Cell Reconstitution in the Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 11, 2022. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02022>
- Garcia-Beltran, W.F., Hölzemer, A., Martrus, G., Chung, A.W., Pacheco, Y., Simoneau, C.R., Rucevic, M., Lamothe-Molina, P.A., Pertel, T., Kim, T.-E., Dugan, H., Alter, G., Dechanet-Merville, J., Jost, S., Carrington, M., Altfeld, M., 2016. Open conformers of HLA-F are high-affinity ligands of the activating NK-cell receptor KIR3DS1. *Nat Immunol* 17, 1067–1074. <https://doi.org/10.1038/ni.3513>
- Gardiner, C.M., Guethlein, L.A., Shilling, H.G., Pando, M., Carr, W.H., Rajalingam, R., Vilches, C., Parham, P., 2001. Different NK Cell Surface Phenotypes Defined by the DX9 Antibody Are Due to KIR3DL1 Gene Polymorphism. *The Journal of Immunology* 166, 2992–3001. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.2992>
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., Raulet, D.H., 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186–1190. <https://doi.org/10.1038/nature03884>
- Gasteiger, G., Hemmers, S., Bos, P.D., Sun, J.C., Rudensky, A.Y., 2013. IL-2-dependent adaptive control of NK cell homeostasis. *J Exp Med* 210, 1179–1187. <https://doi.org/10.1084/jem.20122571>
- Geraghty, D.E., Pei, J., Lipsky, B., Hansen, J.A., Taillon-Miller, P., Bronson, S.K., Chaplin, D.D., 1992. Cloning and physical mapping of the HLA class I region spanning the HLA-E-to-HLA-F interval by using yeast artificial chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2669–2673. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.7.2669>
- Geraghty, D.E., Wei, X.H., Orr, H.T., Koller, B.H., 1990. Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J Exp Med* 171, 1–18. <https://doi.org/10.1084/jem.171.1.1>
- Gersuk, V.H., Nepom, G.T., 2006. A real-time PCR approach for rapid high resolution subtyping of HLA-DRB1\*04. *J Immunol Methods* 317, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.09.003>
- Gineau, L., Cognet, C., Kara, N., Lach, F.P., Dunne, J., Veturi, U., Picard, C., Trouillet, C., Eidenschenk, C., Aoufouchi, S., Alcaïs, A., Smith, O., Geissmann, F., Feighery, C., Abel, L., Smogorzewska, A., Stillman, B., Vivier, E., Casanova, J.-L., Jouanguy, E., 2012. Partial MCM4 deficiency in patients with growth retardation, adrenal insufficiency, and natural killer cell deficiency. *J Clin Invest* 122, 821–832. <https://doi.org/10.1172/JCI61014>
- Giuliani, M., Janji, B., Berchem, G., 2017. Activation of NK cells and disruption of PD-L1/PD-1 axis: two different ways for lenalidomide to block myeloma progression. *Oncotarget* 8, 24031–24044. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15234>
- Giuliani, M., Poggi, A., 2020. Checkpoint Inhibitors and Engineered Cells: New Weapons for Natural Killer Cell Arsenal Against Hematological Malignancies. *Cells* 9, E1578. <https://doi.org/10.3390/cells9071578>
- Gleason, M.K., Verneris, M.R., Todhunter, D.A., Zhang, B., McCullar, V., Zhou, S.X., Panoskaltsis-Mortari, A., Weiner, L.M., Vallera, D.A., Miller, J.S., 2012. Bispecific and trispecific killer cell engagers directly activate human NK cells through CD16 signaling and induce cytotoxicity and cytokine production. *Mol Cancer Ther* 11, 2674–2684. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-12-0692>
- Glorius, P., Baerenwaldt, A., Kellner, C., Staudinger, M., Dechant, M., Stauch, M., Beurskens, F.J., Parren, P.W.H.I., Winkel, J.G.J. van de, Valerius, T., Humpe, A., Repp, R., Gramatzki, M., Nimmerjahn, F., Peipp, M., 2013. The novel tribody [(CD20)(2)xCD16] efficiently triggers effector cell-mediated lysis of malignant B cells. *Leukemia* 27, 190–201. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.150>
- Godfrey, D.I., Uldrich, A.P., McCluskey, J., Rossjohn, J., Moody, D.B., 2015. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol* 16, 1114–1123. <https://doi.org/10.1038/ni.3298>
- Godfrey, J., Benson, D.M., 2012. The role of natural killer cells in immunity against multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 53, 1666–1676. <https://doi.org/10.3109/10428194.2012.676175>
- Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Hanoch, J., Yagel, S., 2000. HLA-G expression in extravillous trophoblasts is an intrinsic property of cell differentiation: a lesson learned from ectopic pregnancies. *Mol Hum Reprod* 6, 535–540. <https://doi.org/10.1093/molehr/6.6.535>

- Gooden, M., Lampen, M., Jordanova, E.S., Leffers, N., Trimbos, J.B., van der Burg, S.H., Nijman, H., van Hall, T., 2011. HLA-E expression by gynecological cancers restrains tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10656–10661. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100354108>
- Goodridge, J.P., Burian, A., Lee, N., Geraghty, D.E., 2013. HLA-F and MHC class I open conformers are ligands for NK cell Ig-like receptors. *J Immunol* 191, 3553–3562. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300081>
- Graebin, P., Veit, T.D., Alho, C.S., Dias, F.S., Chies, J.A.B., 2012. Polymorphic variants in exon 8 at the 3' UTR of the HLA-G gene are associated with septic shock in critically ill patients. *Crit Care* 16, R211. <https://doi.org/10.1186/cc11845>
- Graef, T., Moesta, A.K., Norman, P.J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A.M., Gleimer, M., Hammond, J.A., Guethlein, L.A., Bushnell, D.A., Robinson, P.J., Parham, P., 2009. KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A\*11 while diminishing avidity for HLA-C. *J Exp Med* 206, 2557–2572. <https://doi.org/10.1084/jem.20091010>
- Grier, J.T., Forbes, L.R., Monaco-Shawver, L., Oshinsky, J., Atkinson, T.P., Moody, C., Pandey, R., Campbell, K.S., Orange, J.S., 2012. Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest* 122, 3769–3780. <https://doi.org/10.1172/JCI64837>
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738. <https://doi.org/10.1038/nature01112>
- Guethlein, L.A., Beyzaie, N., Nemat-Gorgani, N., Wang, T., Ramesh, V., Marin, W.M., Hollenbach, J.A., Schetelig, J., Spellman, S.R., Marsh, S.G.E., Cooley, S., Weisdorf, D.J., Norman, P.J., Miller, J.S., Parham, P., 2021. Following Transplantation for Acute Myelogenous Leukemia, Donor KIR Cen B02 Better Protects against Relapse than KIR Cen B01. *J Immunol* ji2100119. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100119>
- Gumá, M., Budt, M., Sáez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A., López-Botet, M., 2006. Expansion of CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107, 3624–3631. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3682>
- Habif, G., Crinier, A., André, P., Vivier, E., Narni-Mancinelli, E., 2019. Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cell Mol Immunol* 16, 415–422. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0224-2>
- Hackmon, R., Pinnaduwege, L., Zhang, J., Lye, S.J., Geraghty, D.E., Dunk, C.E., 2017. Definitive class I human leukocyte antigen expression in gestational placentation: HLA-F, HLA-E, HLA-C, and HLA-G in extravillous trophoblast invasion on placentation, pregnancy, and parturition. *Am J Reprod Immunol* 77. <https://doi.org/10.1111/aji.12643>
- Hanna, J., Goldman-Wohl, D., Hamani, Y., Avraham, I., Greenfield, C., Natanson-Yaron, S., Prus, D., Cohen-Daniel, L., Arnon, T.I., Manaster, I., Gazit, R., Yutkin, V., Benharroch, D., Porgador, A., Keshet, E., Yagel, S., Mandelboim, O., 2006. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Med* 12, 1065–1074. <https://doi.org/10.1038/nm1452>
- Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., Nakachi, K., 2006. Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* 66, 563–570. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2776>
- Haynes, B.F., Gilbert, P.B., McElrath, M.J., Zolla-Pazner, S., Tomaras, G.D., Alam, S.M., Evans, D.T., Montefiori, D.C., Karnasuta, C., Sutthent, R., Liao, H.-X., DeVico, A.L., Lewis, G.K., Williams, C., Pinter, A., Fong, Y., Janes, H., DeCamp, A., Huang, Y., Rao, M., Billings, E., Karasavvas, N., Robb, M.L., Ngauy, V., de Souza, M.S., Paris, R., Ferrari, G., Bailer, R.T., Soderberg, K.A., Andrews, C., Berman, P.W., Frahm, N., De Rosa, S.C., Alpert, M.D., Yates, N.L., Shen, X., Koup, R.A., Pitisuttithum, P., Kaewkungwal, J., Nitayaphan, S., Rerks-Ngarm, S., Michael, N.L., Kim, J.H., 2012. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N Engl J Med* 366, 1275–1286. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1113425>
- He, Y., Tian, Z., 2017. NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands. *Cell Mol Immunol* 14, 321–330. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.26>

- Heatley, S.L., Mullighan, C.G., Doherty, K., Danner, S., O'Connor, G.M., Hahn, U., Szer, J., Schwarer, A., Bradstock, K., Sullivan, L.C., Bardy, P.G., Brooks, A.G., 2018. Activating KIR Haplotype Influences Clinical Outcome Following HLA-Matched Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *HLA*. <https://doi.org/10.1111/tan.13327>
- Heinrichs, H., Orr, H.T., 1990. HLA non-A,B,C class I genes: their structure and expression. *Immunol Res* 9, 265–274. <https://doi.org/10.1007/BF02935526>
- Herzer, K., Falk, C.S., Encke, J., Eichhorst, S.T., Ulsenheimer, A., Seliger, B., Krammer, P.H., 2003. Upregulation of major histocompatibility complex class I on liver cells by hepatitis C virus core protein via p53 and TAP1 impairs natural killer cell cytotoxicity. *J Virol* 77, 8299–8309. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.15.8299-8309.2003>
- Hiby, S.E., Walker, J.J., O'shaughnessy, K.M., Redman, C.W.G., Carrington, M., Trowsdale, J., Moffett, A., 2004. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J Exp Med* 200, 957–965. <https://doi.org/10.1084/jem.20041214>
- Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Oike, M., Ito, Y., Yasukawa, M., Niho, Y., 1997. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation--characterization of membrane TNF-alpha. *Clin Immunol Immunopathol* 82, 133–140. <https://doi.org/10.1006/clin.1996.4291>
- Hilton, H.G., Norman, P.J., Nemat-Gorgani, N., Goyos, A., Hollenbach, J.A., Henn, B.M., Gignoux, C.R., Guethlein, L.A., Parham, P., 2015. Loss and Gain of Natural Killer Cell Receptor Function in an African Hunter-Gatherer Population. *PLOS Genetics* 11, e1005439. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005439>
- Hilton, H.G., Vago, L., Older Aguilar, A.M., Moesta, A.K., Graef, T., Abi-Rached, L., Norman, P.J., Guethlein, L.A., Fleischhauer, K., Parham, P., 2012. Mutation at Positively Selected Positions in the Binding Site for HLA-C Shows That KIR2DL1 Is a More Refined but Less Adaptable NK Cell Receptor Than KIR2DL3. *J.I.* 189, 1418–1430. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100431>
- Hirayasu, K., Arase, H., 2015. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J Hum Genet* 60, 703–708. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.64>
- Höglund, P., Brodin, P., 2010. Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 10, 724–734. <https://doi.org/10.1038/nri2835>
- Hollenbach, J.A., Augusto, D.G., Alaez, C., Bubnova, L., Fae, I., Fischer, G., Gonzalez-Galarza, F.F., Gorodezky, C., Karabon, L., Kusnierczyk, P., Noble, J., Rickards, O., Roberts, C., Schaffer, M., Shi, L., Tavoularis, S., Trachtenberg, E., Yao, Y., Middleton, D., 2013. 16(th) IHIW: population global distribution of killer immunoglobulin-like receptor (KIR) and ligands. *Int J Immunogenet* 40, 39–45. <https://doi.org/10.1111/iji.12028>
- Holmström, M.O., Hjørtsø, M.D., Ahmad, S.M., Met, Ö., Martinenaite, E., Riley, C., Straten, P., Svane, I.M., Hasselbalch, H.C., Andersen, M.H., 2017. The JAK2V617F mutation is a target for specific T cells in the JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 31, 495–498. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.290>
- Holtappels, R., Thomas, D., Reddehase, M.J., 2009. The efficacy of antigen processing is critical for protection against cytomegalovirus disease in the presence of viral immune evasion proteins. *J Virol* 83, 9611–9615. <https://doi.org/10.1128/JVI.00936-09>
- Horowitz, A., Djaoud, Z., Nemat-Gorgani, N., Blokhuis, J., Hilton, H.G., Béziat, V., Malmberg, K.-J., Norman, P.J., Guethlein, L.A., Parham, P., 2016. Class I HLA haplotypes form two schools that educate NK cells in different ways. *Sci Immunol* 1, eaag1672. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aag1672>
- Horowitz, A., Guethlein, L.A., Nemat-Gorgani, N., Norman, P.J., Cooley, S., Miller, J.S., Parham, P., 2015. Regulation of Adaptive NK Cells and CD8 T Cells by HLA-C Correlates with Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and with Cytomegalovirus Reactivation. *J Immunol* 195, 4524–4536. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401990>
- Horowitz, A., Strauss-Albee, D.M., Leipold, M., Kubo, J., Nemat-Gorgani, N., Dogan, O.C., Dekker, C.L., Mackey, S., Maecker, H., Swan, G.E., Davis, M.M., Norman, P.J., Guethlein, L.A., Desai, M., Parham, P., Blish, C.A., 2013. Genetic and environmental determinants of human NK cell

- diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 5, 208ra145. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006702>
- Hoskin, D.W., Mader, J.S., Furlong, S.J., Conrad, D.M., Blay, J., 2008. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int J Oncol* 32, 527–535.
- Hosokai, R., Masuko, M., Shibasaki, Y., Saitoh, A., Furukawa, T., Imai, C., 2017. Donor Killer Immunoglobulin-Like Receptor Haplotype B/x Induces Severe Acute Graft-versus-Host Disease in the Presence of Human Leukocyte Antigen Mismatch in T Cell-Replete Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 23, 606–611. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.12.638>
- Hsu, A.P., Sampaio, E.P., Khan, J., Calvo, K.R., Lemieux, J.E., Patel, S.Y., Frucht, D.M., Vinh, D.C., Auth, R.D., Freeman, A.F., Olivier, K.N., Uzel, G., Zerbe, C.S., Spalding, C., Pittaluga, S., Raffeld, M., Kuhns, D.B., Ding, L., Paulson, M.L., Marciano, B.E., Gea-Banacloche, J.C., Orange, J.S., Cuellar-Rodriguez, J., Hickstein, D.D., Holland, S.M., 2011. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood* 118, 2653–2655. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-356352>
- Hsu, K.C., Chida, S., Geraghty, D.E., Dupont, B., 2002. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunological Reviews* 190, 40–52. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2002.19004.x>
- Hsu, K.C., Gooley, T., Malkki, M., Pinto-Agnello, C., Dupont, B., Bignon, J.-D., Bornhäuser, M., Christiansen, F., Gratwohl, A., Morishima, Y., Oudshoorn, M., Ringden, O., van Rood, J.J., Petersdorf, E., International Histocompatibility Working Group, 2006. KIR ligands and prediction of relapse after unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 828–836. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2006.04.008>
- Hsu, K.C., Kever-Taylor, C.A., Wilton, A., Pinto, C., Heller, G., Arkun, K., O'Reilly, R.J., Horowitz, M.M., Dupont, B., 2005. Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105, 4878–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4825>
- Huhn, O., Chazara, O., Ivarsson, M.A., Retière, C., Venkatesan, T.C., Norman, P.J., Hilton, H.G., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Ito, M., Kling, C., Parham, P., Ghadially, H., Moffett, A., Sharkey, A.M., Colucci, F., 2018a. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J.I.* 201, 2593–2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800860>
- Huhn, O., Chazara, O., Ivarsson, M.A., Retière, C., Venkatesan, T.C., Norman, P.J., Hilton, H.G., Jayaraman, J., Traherne, J.A., Trowsdale, J., Ito, M., Kling, C., Parham, P., Ghadially, H., Moffett, A., Sharkey, A.M., Colucci, F., 2018b. High-Resolution Genetic and Phenotypic Analysis of KIR2DL1 Alleles and Their Association with Pre-Eclampsia. *J.I.* 201, 2593–2601. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800860>
- Hviid, T.V.F., Larsen, L.G., Hoegh, A.M., Bzorek, M., 2004. HLA-G expression in placenta in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Am J Reprod Immunol* 52, 212–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2004.00208.x>
- Hydes, T.J., Moesker, B., Traherne, J.A., Ashraf, S., Alexander, G.J., Dimitrov, B.D., Woelk, C.H., Trowsdale, J., Khakoo, S.I., 2015. The interaction of genetic determinants in the outcome of HCV infection: evidence for discrete immunological pathways. *Tissue Antigens* 86, 267–275. <https://doi.org/10.1111/tan.12650>
- Iannello, A., Thompson, T.W., Ardolino, M., Marcus, A., Raulet, D.H., 2016. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr Opin Immunol* 38, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.001>
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K., 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
- Impola, U., Turpeinen, H., Alakulppi, N., Linjama, T., Volin, L., Niittyvuopio, R., Partanen, J., Koskela, S., 2014. Donor Haplotype B of NK KIR Receptor Reduces the Relapse Risk in HLA-Identical



- Sibling Hematopoietic Stem Cell Transplantation of AML Patients. *Front Immunol* 5, 405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00405>
- Ishigami, S., Arigami, T., Okumura, H., Uchikado, Y., Kita, Y., Kurahara, H., Maemura, K., Kijima, Y., Ishihara, Y., Sasaki, K., Uenosono, Y., Natsugoe, S., 2015. Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-F expression in gastric cancer. *Anticancer Res* 35, 2279–2285.
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., Aikou, T., 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–583.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327, 291–295. <https://doi.org/10.1126/science.1183021>
- Jacoby, M.A., Duncavage, E.J., Chang, G.S., Miller, C.A., Shao, J., Elliott, K., Robinson, J., Fulton, R.S., Fronick, C.C., O’Laughlin, M., Heath, S.E., Pusic, I., Welch, J.S., Link, D.C., DiPersio, J.F., Westervelt, P., Ley, T.J., Graubert, T.A., Walter, M.J., 2018. Subclones dominate at MDS progression following allogeneic hematopoietic cell transplant. *JCI Insight* 3, 98962. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.98962>
- JAWAHAR, S., MOODY, C., CHAN, M., FINBERG, R., GEHA, R., CHATILA, T., 1996. Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol* 103, 408–413. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1996.tb08295.x>
- Jethava, Y.S., Sica, S., Savani, B., Socola, F., Jagasia, M., Mohty, M., Nagler, A., Bacigalupo, A., 2017. Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 52, 1504–1511. <https://doi.org/10.1038/bmt.2017.83>
- Jiang, W., Johnson, C., Jayaraman, J., Simecek, N., Noble, J., Moffatt, M.F., Cookson, W.O., Trowsdale, J., Traherne, J.A., 2012. Copy number variation leads to considerable diversity for B but not A haplotypes of the human KIR genes encoding NK cell receptors. *Genome Research* 22, 1845–1854. <https://doi.org/10.1101/gr.137976.112>
- Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N., Hayashi, N., 2004. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 173, 6072–6081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.10.6072>
- Joncker, N.T., Fernandez, N.C., Treiner, E., Vivier, E., Raulet, D.H., 2009. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol* 182, 4572–4580. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803900>
- Jones, D.C., Roghianian, A., Brown, D.P., Chang, C., Allen, R.L., Trowsdale, J., Young, N.T., 2009. Alternative mRNA splicing creates transcripts encoding soluble proteins from most LILR genes. *Eur J Immunol* 39, 3195–3206. <https://doi.org/10.1002/eji.200839080>
- Jurisic, V., Srdic, T., Konjevic, G., Markovic, O., Colovic, M., 2007. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol* 24, 312–317. <https://doi.org/10.1007/s12032-007-0007-y>
- Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T., 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482–486. <https://doi.org/10.1038/nature05768>
- Kärre, K., 2008. Natural killer cell recognition of missing self. *Nat Immunol* 9, 477–480. <https://doi.org/10.1038/ni0508-477>
- Kaur, G., Gras, S., Mobbs, J.I., Vivian, J.P., Cortes, A., Barber, T., Kuttikkatte, S.B., Jensen, L.T., Attfield, K.E., Dendrou, C.A., Carrington, M., McVean, G., Purcell, A.W., Rossjohn, J., Fugger, L., 2017. Structural and regulatory diversity shape HLA-C protein expression levels. *Nat Commun* 8, 15924. <https://doi.org/10.1038/ncomms15924>
- Kawai, T., Akira, S., 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34, 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006>
- Khakoo, S.I., Thio, C.L., Martin, M.P., Brooks, C.R., Gao, X., Astemborski, J., Cheng, J., Goedert, J.J., Vlahov, D., Hilgartner, M., Cox, S., Little, A.-M., Alexander, G.J., Cramp, M.E., O’Brien, S.J., Rosenberg, W.M.C., Thomas, D.L., Carrington, M., 2004. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 305, 872–874. <https://doi.org/10.1126/science.1097670>

- Kiani, Z., Bruneau, J., Geraghty, D.E., Bernard, N.F., 2019. HLA-F on Autologous HIV-Infected Cells Activates Primary NK Cells Expressing the Activating Killer Immunoglobulin-Like Receptor KIR3DS1. *J Virol* 93, e00933-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00933-19>
- Kiani, Z., Dupuy, F.P., Bruneau, J., Lebouché, B., Zhang, C.X., Jackson, E., Lisovsky, I., da Fonseca, S., Geraghty, D.E., Bernard, N.F., 2018. HLA-F on HLA-Null 721.221 Cells Activates Primary NK Cells Expressing the Activating Killer Ig-like Receptor KIR3DS1. *J Immunol* 201, 113–123. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701370>
- Kiessling, R., Klein, E., Pross, H., Wigzell, H., 1975. “Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5, 117–121. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050209>
- Kim, K.-Y., Kim, J.K., Han, S.H., Lim, J.-S., Kim, K.I., Cho, D.H., Lee, M.-S., Lee, J.-H., Yoon, D.-Y., Yoon, S.R., Chung, J.W., Choi, I., Kim, E., Yang, Y., 2006. Adiponectin is a negative regulator of NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 176, 5958–5964. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.10.5958>
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S.M., Lybarger, L., Song, Y.-J., Yang, L., French, A.R., Sunwoo, J.B., Lemieux, S., Hansen, T.H., Yokoyama, W.M., 2005. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436, 709–713. <https://doi.org/10.1038/nature03847>
- Kim, Y.S., Kaidina, A.M., Chiang, J.-H., Yarygin, K.N., Lupatov, A.Yu., 2017. Cancer stem cell molecular markers verified in vivo. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B* 11, 43–54. <https://doi.org/10.1134/S1990750817010036>
- King, A., Hiby, S.E., Gardner, L., Joseph, S., Bowen, J.M., Verma, S., Burrows, T.D., Loke, Y.W., 2000. Recognition of trophoblast HLA class I molecules by decidual NK cell receptors—a review. *Placenta* 21 Suppl A, S81–85. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0520>
- King, A., Wooding, P., Gardner, L., Loke, Y.W., 1993. Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum Reprod* 8, 2061–2067. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137982>
- Knapp, S., Warshaw, U., Hegazy, D., Brackenbury, L., Guha, I.N., Fowell, A., Little, A.-M., Alexander, G.J., Rosenberg, W.M.C., Cramp, M.E., Khakoo, S.I., 2010. Consistent beneficial effects of killer cell immunoglobulin-like receptor 2DL3 and group 1 human leukocyte antigen-C following exposure to hepatitis C virus. *Hepatology* 51, 1168–1175. <https://doi.org/10.1002/hep.23477>
- Koene, H.R., Kleijer, M., Algra, J., Roos, D., von dem Borne, A.E., de Haas, M., 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90, 1109–1114.
- Koerner, S.P., André, M.C., Leibold, J.S., Kousis, P.C., Kübler, A., Pal, M., Haen, S.P., Bühring, H.-J., Grosse-Hovest, L., Jung, G., Salih, H.R., 2017. An Fc-optimized CD133 antibody for induction of NK cell reactivity against myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 459–469. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.194>
- Kohrt, H.E., Thielens, A., Marabelle, A., Sagiv-Barfi, I., Sola, C., Chanuc, F., Fuseri, N., Bonnafous, C., Czerwinski, D., Rajapaksa, A., Waller, E., Ugolini, S., Vivier, E., Romagné, F., Levy, R., Bléry, M., André, P., 2014. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood* 123, 678–686. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-08-519199>
- Koller, B.H., Geraghty, D.E., DeMars, R., Duvick, L., Rich, S.S., Orr, H.T., 1989. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J Exp Med* 169, 469–480. <https://doi.org/10.1084/jem.169.2.469>
- Koyro, T.F., Kraus, E., Lunemann, S., Hölzemer, A., Wulf, S., Jung, J., Fittje, P., Henseling, F., Körner, C., Huber, T.B., Grundhoff, A., Wiech, T., Panzer, U., Fischer, N., Altfeld, M., 2021. Upregulation of HLA-F expression by BK polyomavirus infection induces immune recognition by KIR3DS1-positive natural killer cells. *Kidney Int* 99, 1140–1148. <https://doi.org/10.1016/j.kint.2020.12.014>
- Kulkarni, S., Savan, R., Qi, Y., Gao, X., Yuki, Y., Bass, S.E., Martin, M.P., Hunt, P., Deeks, S.G., Telenti, A., Pereyra, F., Goldstein, D., Wolinsky, S., Walker, B., Young, H.A., Carrington, M.,

2011. Differential microRNA regulation of HLA-C expression and its association with HIV control. *Nature* 472, 495–498. <https://doi.org/10.1038/nature09914>
- Lafont, V., Liautard, J., Liautard, J.P., Favero, J., 2001. Production of TNF-alpha by human V gamma 9V delta 2 T cells via engagement of Fc gamma RIIIA, the low affinity type 3 receptor for the Fc portion of IgG, expressed upon TCR activation by nonpeptidic antigen. *J Immunol* 166, 7190–7199. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7190>
- Lambotte, O., Ferrari, G., Moog, C., Yates, N.L., Liao, H.-X., Parks, R.J., Hicks, C.B., Owzar, K., Tomaras, G.D., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., Delfraissy, J.-F., 2009. Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *AIDS* 23, 897–906. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328329f97d>
- Langkilde, C.H., Nilsson, L.L., Jørgensen, N., Funck, T., Perin, T.L., Hornstrup, M.B., Høst, T., Scheike, T., Lindhard, A., Hviid, T.V.F., 2020. Variation in the HLA-F gene locus with functional impact is associated with pregnancy success and time-to-pregnancy after fertility treatment. *Hum Reprod* 35, 705–717. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez276>
- Lanier, L.L., 2009. DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227, 150–160. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00720.x>
- Lanier, L.L., 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23, 225–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>
- Lanier, L.L., 1998. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 359–393. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.359>
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1996. Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157, 4741–4745.
- Le Bouteiller, P., Rodriguez, A.M., Mallet, V., Girr, M., Guillaudeux, T., Lenfant, F., 1996. Placental expression of HLA class I genes. *Am J Reprod Immunol* 35, 216–225. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1996.tb00034.x>
- Le Luduec, J.-B., Boudreau, J.E., Freiberg, J.C., Hsu, K.C., 2019. Novel Approach to Cell Surface Discrimination Between KIR2DL1 Subtypes and KIR2DS1 Identifies Hierarchies in NK Repertoire, Education, and Tolerance. *Front. Immunol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00734>
- Lee, D.W., Gardner, R., Porter, D.L., Louis, C.U., Ahmed, N., Jensen, M., Grupp, S.A., Mackall, C.L., 2014. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124, 188–195. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-552729>
- Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J.M., Kamimura, Y., Lanier, L.L., Kim, S., 2015. Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity* 42, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.013>
- Lee, N., Ishitani, A., Geraghty, D.E., 2010. HLA-F is a surface marker on activated lymphocytes I. *Eur J Immunol* 40, 2308–2318.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., Geraghty, D.E., 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5199–5204. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.5199>
- Lefebvre, S., Adrian, F., Moreau, P., Gourand, L., Dausset, J., Berrih-Aknin, S., Carosella, E.D., Paul, P., 2000. Modulation of HLA-G expression in human thymic and amniotic epithelial cells. *Hum Immunol* 61, 1095–1101. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(00\)00192-0](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(00)00192-0)
- Legoux, F., Gautreau, L., Hesnard, L., Leger, A., Moyon, M., Devilder, M.-C., Bonneville, M., Saulquin, X., 2013. Characterization of the human CD4(+) T-cell repertoire specific for major histocompatibility class I-restricted antigens. *Eur J Immunol* 43, 3244–3253. <https://doi.org/10.1002/eji.201343726>
- Legrand, N., David, G., Rodallec, A., Gaultier, A., Salmon, D., Cesbron, A., Wittkop, L., Raffi, F., Gendzekhadze, K., Retière, C., Allavena, C., Gagne, K., 2021. Influence of HLA-C environment on the spontaneous clearance of hepatitis C in European HIV-HCV co-infected individuals. *Clin Exp Immunol* 204, 107–124. <https://doi.org/10.1111/cei.13562>
- Leivas, A., Valeri, A., Córdoba, L., García-Ortiz, A., Ortiz, A., Sánchez-Vega, L., Graña-Castro, O., Fernández, L., Carreño-Tarragona, G., Pérez, M., Megías, D., Paciello, M.L., Sánchez-Pina, J.,

- Pérez-Martínez, A., Lee, D.A., Powell, D.J., Río, P., Martínez-López, J., 2021. NKG2D-CAR-transduced natural killer cells efficiently target multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 11, 146. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00537-w>
- Leung, W., Iyengar, R., Turner, V., Lang, P., Bader, P., Conn, P., Niethammer, D., Handgretinger, R., 2004. Determinants of antileukemia effects of allogeneic NK cells. *J Immunol* 172, 644–650. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.644>
- Levin, A.M., Bates, D.L., Ring, A.M., Krieg, C., Lin, J.T., Su, L., Moraga, I., Raeber, M.E., Bowman, G.R., Novick, P., Pande, V.S., Fathman, C.G., Boyman, O., Garcia, K.C., 2012. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 “superkine.” *Nature* 484, 529–533. <https://doi.org/10.1038/nature10975>
- Levy, E.M., Bianchini, M., Von Euw, E.M., Barrio, M.M., Bravo, A.I., Furman, D., Domenichini, E., Macagno, C., Pinsky, V., Zucchini, C., Valvassori, L., Mordoh, J., 2008. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol* 32, 633–641.
- Li, H., Ivarsson, M.A., Walker-Sperling, V.E., Subleski, J., Johnson, J.K., Wright, P.W., Carrington, M., Björkström, N.K., McVicar, D.W., Anderson, S.K., 2018. Identification of an elaborate NK-specific system regulating HLA-C expression. *PLoS Genet* 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007163>
- Li, H., Pascal, V., Martin, M.P., Carrington, M., Anderson, S.K., 2008. Genetic Control of Variegated KIR Gene Expression: Polymorphisms of the Bi-Directional KIR3DL1 Promoter Are Associated with Distinct Frequencies of Gene Expression. *PLoS Genet* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000254>
- Li, Y., Wang, Q., Mariuzza, R.A., 2011. Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J Exp Med* 208, 703–714. <https://doi.org/10.1084/jem.20102548>
- Li, Z., Khanna, M., Grimley, S.L., Ellenberg, P., Gonelli, C.A., Lee, W.S., Amarasena, T.H., Kelleher, A.D., Purcell, D.F.J., Kent, S.J., Ranasinghe, C., 2020. Mucosal IL-4R antagonist HIV vaccination with SOSIP-gp140 booster can induce high-quality cytotoxic CD4+/CD8+ T cells and humoral responses in macaques. *Sci Rep* 10, 22077. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79172-7>
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H.A., Thompson, P., Basar, R., Nassif Kerbauy, L., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Nunez Cortes, A., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E.N., Kebriaei, P., Mehta, R., Neelapu, S., Nieto, Y., Wang, M., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E.J., Rezvani, K., 2020. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N Engl J Med* 382, 545–553. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu, E., Tong, Y., Dotti, G., Shaim, H., Savoldo, B., Mukherjee, M., Orange, J., Wan, X., Lu, X., Reynolds, A., Gagea, M., Banerjee, P., Cai, R., Bdaiwi, M.H., Basar, R., Muftuoglu, M., Li, L., Marin, D., Wierda, W., Keating, M., Champlin, R., Shpall, E., Rezvani, K., 2018. Cord blood NK cells engineered to express IL-15 and a CD19-targeted CAR show long-term persistence and potent antitumor activity. *Leukemia* 32, 520–531. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.226>
- Liu, J., Xiao, Z., Ko, H.L., Shen, M., Ren, E.C., 2014. Activating killer cell immunoglobulin-like receptor 2DS2 binds to HLA-A\*11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 2662–2667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322052111>
- Ljunggren, H.G., Kärre, K., 1990. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237–244. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(90\)90097-s](https://doi.org/10.1016/0167-5699(90)90097-s)
- Locatelli, F., Pende, D., Falco, M., Della Chiesa, M., Moretta, A., Moretta, L., 2018. NK Cells Mediate a Crucial Graft-versus-Leukemia Effect in Haploidentical-HSCT to Cure High-Risk Acute Leukemia. *Trends in Immunology* 39, 577–590. <https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.009>
- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., Ma, A., 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9, 669–676. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80664-0](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80664-0)
- Long, B.R., Ndhlovu, L.C., Oksenberg, J.R., Lanier, L.L., Hecht, F.M., Nixon, D.F., Barbour, J.D., 2008. Conferral of enhanced natural killer cell function by KIR3DS1 in early human

- immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82, 4785–4792. <https://doi.org/10.1128/JVI.02449-07>
- Lopez, C., Kirkpatrick, D., Read, S.E., Fitzgerald, P.A., Pitt, J., Pahwa, S., Ching, C.Y., Smithwick, E.M., 1983. Correlation between low natural killing of fibroblasts infected with herpes simplex virus type 1 and susceptibility to herpesvirus infections. *J Infect Dis* 147, 1030–1035. <https://doi.org/10.1093/infdis/147.6.1030>
- Lopez-Vergès, S., Milush, J.M., Schwartz, B.S., Pando, M.J., Jarjoura, J., York, V.A., Houchins, J.P., Miller, S., Kang, S.-M., Norris, P.J., Nixon, D.F., Lanier, L.L., 2011. Expansion of a unique CD57<sup>+</sup>NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14725–14732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>
- Ludajic, K., Balavarca, Y., Bickeböllner, H., Rosenmayr, A., Fae, I., Fischer, G.F., Kouba, M., Pohlreich, D., Kalhs, P., Greinix, H.T., 2009. KIR genes and KIR ligands affect occurrence of acute GVHD after unrelated, 12/12 HLA matched, hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 44, 97–103. <https://doi.org/10.1038/bmt.2008.432>
- Lünemann, A., Lünemann, J.D., Münz, C., 2009. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 15, 352–358. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00035>
- Lunemann, S., Martus, G., Hölzemer, A., Chapel, A., Ziegler, M., Körner, C., Beltran, W.G., Carrington, M., Wedemeyer, H., Altfeld, M., 2016. Sequence variations in HCV core-derived epitopes alter binding of KIR2DL3 to HLA-C\*03:04 and modulate NK cell function. *J Hepatol* 65, 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.03.016>
- Lunemann, S., Schöbel, A., Kah, J., Fittje, P., Hölzemer, A., Langeneckert, A.E., Hess, L.U., Poch, T., Martus, G., Garcia-Beltran, W.F., Körner, C., Ziegler, A.E., Richert, L., Oldhafer, K.J., Schulze Zur Wiesch, J., Schramm, C., Dandri, M., Herker, E., Altfeld, M., 2018. Interactions Between KIR3DS1 and HLA-F Activate Natural Killer Cells to Control HCV Replication in Cell Culture. *Gastroenterology* 155, 1366–1371.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.019>
- Mace, E.M., Hsu, A.P., Monaco-Shawver, L., Makedonas, G., Rosen, J.B., Dropulic, L., Cohen, J.I., Frenkel, E.P., Bagwell, J.C., Sullivan, J.L., Biron, C.A., Spalding, C., Zerbe, C.S., Uzel, G., Holland, S.M., Orange, J.S., 2013. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56bright subset. *Blood* 121, 2669–2677. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-453969>
- Mailliard, R.B., Son, Y.-I., Redlinger, R., Coates, P.T., Giermasz, A., Morel, P.A., Storkus, W.J., Kalinski, P., 2003. Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function. *J Immunol* 171, 2366–2373. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2366>
- Makanga, D.R., Da Rin de Lorenzo, F., David, G., Willem, C., Dubreuil, L., Legrand, N., Guillaume, T., Peterlin, P., Lebourgeois, A., Béné, M.C., Garnier, A., Chevallier, P., Gendzekhadze, K., Cesbron, A., Gagne, K., Clemenceau, B., Retière, C., 2020a. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers* 12, 1927. <https://doi.org/10.3390/cancers12071927>
- Makanga, D.R., Da Rin de Lorenzo, F., David, G., Willem, C., Dubreuil, L., Legrand, N., Guillaume, T., Peterlin, P., Lebourgeois, A., Béné, M.C., Garnier, A., Chevallier, P., Gendzekhadze, K., Cesbron, A., Gagne, K., Clemenceau, B., Retière, C., 2020b. Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12071927>
- Malard, F., Mohty, M., 2020. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 395, 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Male, V., Trundle, A., Gardner, L., Northfield, J., Chang, C., Apps, R., Moffett, A., 2010. Natural killer cells in human pregnancy. *Methods Mol Biol* 612, 447–463. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_30)
- Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.-L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Gonçalves, A., André, P., Romagné, F., Thibault, G., Viens, P., Birnbaum, D., Bertucci, F., Moretta, A., Olive, D., 2011. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest* 121, 3609–3622. <https://doi.org/10.1172/JCI45816>

- Manandhar, T., Hò, G.-G.T., Pump, W.C., Blasczyk, R., Bade-Doeding, C., 2019. Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *Int J Mol Sci* 20, E3626. <https://doi.org/10.3390/ijms20153626>
- Mancusi, A., Ruggeri, L., Urbani, E., Pierini, A., Massei, M.S., Carotti, A., Terenzi, A., Falzetti, F., Tosti, A., Topini, F., Bozza, S., Romani, L., Tognellini, R., Stern, M., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A., 2015. Haploidentical hematopoietic transplantation from KIR ligand-mismatched donors with activating KIRs reduces nonrelapse mortality. *Blood* 125, 3173–3182. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-599993>
- Maniangou, B., Legrand, N., Alizadeh, M., Guyet, U., Willem, C., David, G., Charpentier, E., Walencik, A., Retière, C., Gagne, K., 2017. Killer Immunoglobulin-Like Receptor Allele Determination Using Next-Generation Sequencing Technology. *Front Immunol* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00547>
- Maniangou, B., Retière, C., Gagne, K., 2018. Next-generation sequencing technology a new tool for killer cell immunoglobulin-like receptor allele typing in hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion Clinique et Biologique* 25, 87–89. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.07.005>
- Manser, A.R., Weinhold, S., Uhrberg, M., 2015. Human KIR repertoires: shaped by genetic diversity and evolution. *Immunological Reviews* 267, 178–196. <https://doi.org/10.1111/imr.12316>
- Marín, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Méndez, R., Jiménez, P., Geraghty, D.E., Garrido, F., 2003. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54, 767–775. <https://doi.org/10.1007/s00251-002-0526-9>
- Marsh, S.G.E., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D.E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L.A., Shilling, H., Garcia, C.A., Hsu, K.C., Wain, H., 2003. Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Hum Immunol* 64, 648–654. [https://doi.org/10.1016/s0198-8859\(03\)00067-3](https://doi.org/10.1016/s0198-8859(03)00067-3)
- Marsh, S.G.E., WHO Nomenclature Committee for Factors of the HLA System, 2010. Nomenclature for factors of the HLA system, update April 2010. *Tissue Antigens* 76, 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2010.01551.x>
- Martelli-Palomino, G., Pancotto, J.A., Muniz, Y.C., Mendes-Junior, C.T., Castelli, E.C., Massaro, J.D., Krawiec-Radanne, I., Poras, I., Rebmann, V., Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Donadi, E.A., 2013. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. *PLoS One* 8, e71742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071742>
- Martin, M.P., Bashirova, A., Traherne, J., Trowsdale, J., Carrington, M., 2003. Cutting edge: expansion of the KIR locus by unequal crossing over. *J Immunol* 171, 2192–2195. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2192>
- Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.-H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S.J., Carrington, M., 2002. Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet* 31, 429–434. <https://doi.org/10.1038/ng934>
- Martin, M.P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J.N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E.E., Shupert, W.L., Phair, J., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Telenti, A., Connors, M., O'Brien, S.J., Walker, B.D., Parham, P., Deeks, S.G., McVicar, D.W., Carrington, M., 2007. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat Genet* 39, 733–740. <https://doi.org/10.1038/ng2035>
- Martínez-Sánchez, M.V., Fuster, J.L., Campillo, J.A., Galera, A.M., Bermúdez-Cortés, M., Llinares, M.E., Ramos-Elbal, E., Pascual-Gázquez, J.F., Fita, A.M., Martínez-Banaclocha, H., Galián, J.A., Gimeno, L., Muro, M., Minguela, A., 2021. Expression of NK Cell Receptor Ligands on Leukemic Cells Is Associated with the Outcome of Childhood Acute Leukemia. *Cancers (Basel)* 13, 2294. <https://doi.org/10.3390/cancers13102294>
- Mathe, G., Bernard, J., 1957. [Recent acquisitions in the field of heterografts of normal hemopoietic cells and of tumoral cells]. *Rev Hematol* 12, 529–564.
- Matzinger, P., 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296, 301–305. <https://doi.org/10.1126/science.1071059>
- McWilliams, E.M., Mele, J.M., Cheney, C., Timmerman, E.A., Fiazuddin, F., Strattan, E.J., Mo, X., Byrd, J.C., Muthusamy, N., Awan, F.T., 2016. Therapeutic CD94/NKG2A blockade improves

- natural killer cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Oncoimmunology* 5, e1226720. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1226720>
- Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A.M., Ferrini, S., 2011. Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. *J Biomed Biotechnol* 2011, 861920. <https://doi.org/10.1155/2011/861920>
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Meenagh, A., Gonzalez, A., Sleator, C., McQuaid, S., Middleton, D., 2008. Investigation of killer cell immunoglobulin-like receptor gene diversity, KIR2DL1 and KIR2DS1. *Tissue Antigens* 72, 383–391. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01093.x>
- Meghmem, D., Morisseau, S., Frutoso, M., Trillet, K., Maillason, M., Barbieux, I., Khaddage, S., Leray, I., Hildinger, M., Quémener, A., Jacques, Y., Mortier, E., 2017. Cutting Edge: Differential Fine-Tuning of IL-2- and IL-15-Dependent Functions by Targeting Their Common IL-2/15R $\beta$ / $\gamma$  Receptor. *J Immunol* 198, 4563–4568. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700046>
- Menier, C., Rabreau, M., Challier, J.-C., Le Discorde, M., Carosella, E.D., Rouas-Freiss, N., 2004. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. *Blood* 104, 3153–3160. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-0809>
- Messaoudene, M., Fregni, G., Fourmentraux-Neves, E., Chanal, J., Maubec, E., Mazouz-Dorval, S., Couturaud, B., Girod, A., Sastre-Garau, X., Albert, S., Guédon, C., Deschamps, L., Mitalian, D., Cremer, I., Jacquelot, N., Rusakiewicz, S., Zitvogel, L., Avril, M.-F., Caignard, A., 2014. Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res* 74, 81–92. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1303>
- Middleton, D., Meenagh, A., Gourraud, P.A., 2007. KIR haplotype content at the allele level in 77 Northern Irish families. *Immunogenetics* 59, 145–158. <https://doi.org/10.1007/s00251-006-0181-7>
- Middleton, D., Meenagh, A., Moscoso, J., Arnaiz-Villena, A., 2008. Killer immunoglobulin receptor gene and allele frequencies in Caucasoid, Oriental and Black populations from different continents. *Tissue Antigens* 71, 105–113. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2007.00973.x>
- Mittal, K.K., Mickey, M.R., Singal, D.P., Terasaki, P.I., 1968. Serotyping for homotransplantation. 18. Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* 6, 913–927. <https://doi.org/10.1097/00007890-196811000-00006>
- Moesta, A.K., Norman, P.J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M., Parham, P., 2008. Synergistic Polymorphism at Two Positions Distal to the Ligand-Binding Site Makes KIR2DL2 a Stronger Receptor for HLA-C Than KIR2DL3. *The Journal of Immunology* 180, 3969–3979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.6.3969>
- Moffett-King, A., 2002. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol* 2, 656–663. <https://doi.org/10.1038/nri886>
- Mohty, M., Labopin, M., Balère, M.L., Socié, G., Milpied, N., Tabrizi, R., Ifrah, N., Hicheri, Y., Dhedin, N., Michallet, M., Buzyn, A., Cahn, J.-Y., Bourhis, J.-H., Blaise, D., Raffoux, C., Espérou, H., Yakoub-Agha, I., 2010. Antithymocyte globulins and chronic graft-vs-host disease after myeloablative allogeneic stem cell transplantation from HLA-matched unrelated donors: a report from the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire. *Leukemia* 24, 1867–1874. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.200>
- Montaldo, E., Del Zotto, G., Della Chiesa, M., Mingari, M.C., Moretta, A., De Maria, A., Moretta, L., 2013. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A* 83, 702–713. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22302>
- Montaldo, E., Vitale, C., Cottalasso, F., Conte, R., Glatzer, T., Ambrosini, P., Moretta, L., Mingari, M.C., 2012. Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* 119, 3987–3996. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-09-379693>
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., 2000. Surface receptors delivering opposite signals regulate the function of human NK cells. *Semin Immunol* 12, 129–138. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0215>

- Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M., Moretta, L., 2005. Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol* 26, 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.09.008>
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., 1995. Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 182, 875–884. <https://doi.org/10.1084/jem.182.3.875>
- Moretta, L., Bottino, C., Cantoni, C., Mingari, M.C., Moretta, A., 2001. Human natural killer cell function and receptors. *Curr Opin Pharmacol* 1, 387–391. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(01)00067-4)
- Moretta, L., Pietra, G., Montaldo, E., Vacca, P., Pende, D., Falco, M., Del Zotto, G., Locatelli, F., Moretta, A., Mingari, M.C., 2014. Human NK cells: from surface receptors to the therapy of leukemias and solid tumors. *Front Immunol* 5, 87. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00087>
- Morris, G.S., Brueilly, K.E., Scheetz, J.S., Brannan, E.A., 2010. Functional performance status of hematopoietic SCT recipients in the sub-acute phase of recovery. *Bone Marrow Transplant* 45, 755–761. <https://doi.org/10.1038/bmt.2009.232>
- Morvan, M., David, G., Sébille, V., Perrin, A., Gagne, K., Willem, C., Kerdudou, N., Denis, L., Clémenceau, B., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C., 2008. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *European Journal of Immunology* 38, 3474–3486. <https://doi.org/10.1002/eji.200838407>
- Morvan, M., Willem, C., Gagne, K., Kerdudou, N., David, G., Sébille, V., Folléa, G., Bignon, J.-D., Retière, C., 2009. Phenotypic and Functional Analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK Cell Subsets Demonstrate Differential Regulation by Bw4 Molecules and Induced KIR3DS1 Expression on Stimulated NK Cells. *The Journal of Immunology* 182, 6727–6735. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900212>
- Naka, K., Hoshii, T., Muraguchi, T., Tadokoro, Y., Ooshio, T., Kondo, Y., Nakao, S., Motoyama, N., Hirao, A., 2010. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 463, 676–680. <https://doi.org/10.1038/nature08734>
- Nakamura, R., Gendzekhadze, K., Palmer, J., Tsai, N.-C., Mokhtari, S., Forman, S.J., Zaia, J.A., Senitzer, D., Marcucci, G., Stein, A., 2019. Influence of donor KIR genotypes on reduced relapse risk in acute myelogenous leukemia after hematopoietic stem cell transplantation in patients with CMV reactivation. *Leuk Res* 87, 106230. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2019.106230>
- Nattermann, J., Feldmann, G., Ahlenstiel, G., Langhans, B., Sauerbruch, T., Spengler, U., 2006. Surface expression and cytolytic function of natural killer cell receptors is altered in chronic hepatitis C. *Gut* 55, 869–877. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.076463>
- Navarrete, C.V., 2000. The HLA system in blood transfusion. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 13, 511–532. <https://doi.org/10.1053/beh.2000.0097>
- Nelson, G.W., Martin, M.P., Gladman, D., Wade, J., Trowsdale, J., Carrington, M., 2004. Cutting edge: heterozygote advantage in autoimmune disease: hierarchy of protection/susceptibility conferred by HLA and killer Ig-like receptor combinations in psoriatic arthritis. *J Immunol* 173, 4273–4276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.7.4273>
- Neuchel, C., Fürst, D., Niederwieser, D., Bunjes, D., Tsamadou, C., Wulf, G., Pfreundschuh, M., Wagner, E., Stuhler, G., Einsele, H., Schrezenmeier, H., Mytilineos, J., 2017. Impact of Donor Activating KIR Genes on HSCT Outcome in C1-Ligand Negative Myeloid Disease Patients Transplanted with Unrelated Donors-A Retrospective Study. *PLoS One* 12, e0169512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169512>
- Neuchel, C., Fürst, D., Tsamadou, C., Schrezenmeier, H., Mytilineos, J., 2021. Extended loci histocompatibility matching in HSCT-Going beyond classical HLA. *Int J Immunogenet* 48, 299–316. <https://doi.org/10.1111/iji.12545>
- Nguyen, S., Kuentz, M., Vernant, J.-P., Dhedin, N., Bories, D., Debré, P., Vieillard, V., 2008. Involvement of mature donor T cells in the NK cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Leukemia* 22, 344–352. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2405041>



- Njiomegnie, G.F., Read, S.A., Fewings, N., George, J., McKay, F., Ahlenstiel, G., 2020. Immunomodulation of the Natural Killer Cell Phenotype and Response during HCV Infection. *J Clin Med* 9, E1030. <https://doi.org/10.3390/jcm9041030>
- Nomenclature for factors of the HL-A system, 1968. *Bull World Health Organ* 39, 483–486.
- Norman, J.M., Mashiba, M., McNamara, L.A., Onafuwa-Nuga, A., Chiari-Fort, E., Shen, W., Collins, K.L., 2011. The antiviral factor APOBEC3G enhances the recognition of HIV-infected primary T cells by natural killer cells. *Nat Immunol* 12, 975–983. <https://doi.org/10.1038/ni.2087>
- Norman, P.J., Abi-Rached, L., Gendzekhadze, K., Hammond, J.A., Moesta, A.K., Sharma, D., Graef, T., McQueen, K.L., Guethlein, L.A., Carrington, C.V.F., Chandanayingyong, D., Chang, Y.-H., Crespi, C., Saruhan-Direskeneli, G., Hameed, K., Kamkamidze, G., Koram, K.A., Layrisse, Z., Matamoros, N., Milà, J., Park, M.H., Pitchappan, R.M., Ramdath, D.D., Shiao, M.-Y., Stephens, H.A.F., Struik, S., Tyan, D., Verity, D.H., Vaughan, R.W., Davis, R.W., Fraser, P.A., Riley, E.M., Ronaghi, M., Parham, P., 2009. Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes. *Genome Res* 19, 757–769. <https://doi.org/10.1101/gr.085738.108>
- Norman, P.J., Hollenbach, J.A., Nemat-Gorgani, N., Marin, W.M., Norberg, S.J., Ashouri, E., Jayaraman, J., Wroblewski, E.E., Trowsdale, J., Rajalingam, R., Oksenberg, J.R., Chiaroni, J., Guethlein, L.A., Traherne, J.A., Ronaghi, M., Parham, P., 2016. Defining KIR and HLA Class I Genotypes at Highest Resolution via High-Throughput Sequencing. *Am J Hum Genet* 99, 375–391. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.06.023>
- Notarangelo, L.D., Mazzolari, E., 2006. Natural killer cell deficiencies and severe varicella infection. *J Pediatr* 148, 563–564; author reply 564. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2005.06.028>
- O'Connor, G.M., Vivian, J.P., Gostick, E., Pymm, P., Lafont, B.A.P., Price, D.A., Rossjohn, J., Brooks, A.G., McVicar, D.W., 2015. Peptide-Dependent Recognition of HLA-B\*57:01 by KIR3DS1. *J Virol* 89, 5213–5221. <https://doi.org/10.1128/JVI.03586-14>
- Ogonek, J., Kralj Juric, M., Ghimire, S., Varanasi, P.R., Holler, E., Greinix, H., Weissinger, E., 2016. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol* 7, 507. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00507>
- Orange, J.S., 2013. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 132, 515–526. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.07.020>
- Orange, J.S., 2012. Unraveling human natural killer cell deficiency. *J Clin Invest* 122, 798–801. <https://doi.org/10.1172/JCI62620>
- Orange, J.S., 2002. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes and Infection* 4, 1545–1558. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00038-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00038-2)
- Ordóñez, D., Gómez-Lozano, N., Vilches, C., 2008. The 5' intergenic, promoter, pseudoexon 3 and complete coding sequences of the hybrid gene KIR2DS3\*002. *Tissue Antigens* 72, 504–505. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2008.01126.x>
- Ornstein, B.W., Hill, E.B., Geurs, T.L., French, A.R., 2013. Natural killer cell functional defects in pediatric patients with severe and recurrent herpesvirus infections. *J Infect Dis* 207, 458–468. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis701>
- Ostrakhovitch, E.A., Li, S.S.-C., 2006. The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. *Biochem Cell Biol* 84, 832–843. <https://doi.org/10.1139/o06-191>
- Pan, C., Zhai, Y., Li, G., Jiang, T., Zhang, W., 2021. NK Cell-Based Immunotherapy and Therapeutic Perspective in Gliomas. *Front. Oncol.* 11, 751183. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.751183>
- Pando, M.J., Gardiner, C.M., Gleimer, M., McQueen, K.L., Parham, P., 2003. The Protein Made from a Common Allele of KIR3DL1 (3DL1\*004) Is Poorly Expressed at Cell Surfaces due to Substitution at Positions 86 in Ig Domain 0 and 182 in Ig Domain 1. *The Journal of Immunology* 171, 6640–6649. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.12.6640>
- Parham, P., 2005. Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Molecular Immunology, Natural Killer cells from “disturbing” background to central players of immune responses* 42, 459–462. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.027>
- Parkman, R., Cohen, G., Carter, S.L., Weinberg, K.I., Masinsin, B., Guinan, E., Kurtzberg, J., Wagner, J.E., Kernan, N.A., 2006. Successful immune reconstitution decreases leukemic relapse and improves survival in recipients of unrelated cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 12, 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2006.05.008>

- Parrish-Novak, J., Dillon, S.R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J.A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J.L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S.R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R.D., Foster, D., 2000. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63. <https://doi.org/10.1038/35040504>
- Parronchi, P., De Carli, M., Manetti, R., Simonelli, C., Sampognaro, S., Piccinni, M.P., Macchia, D., Maggi, E., Del Prete, G., Romagnani, S., 1992. IL-4 and IFN (alpha and gamma) exert opposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by Th1 or Th2 human T cell clones. *J Immunol* 149, 2977–2983.
- Pasero, C., Gravis, G., Granjeaud, S., Guerin, M., Thomassin-Piana, J., Rocchi, P., Salem, N., Walz, J., Moretta, A., Olive, D., 2015. Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 6, 14360–14373. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3965>
- Pelak, K., Need, A.C., Fellay, J., Shianna, K.V., Feng, S., Urban, T.J., Ge, D., De Luca, A., Martinez-Picado, J., Wolinsky, S.M., Martinson, J.J., Jamieson, B.D., Bream, J.H., Martin, M.P., Borrow, P., Letvin, N.L., McMichael, A.J., Haynes, B.F., Telenti, A., Carrington, M., Goldstein, D.B., Alter, G., 2011. Copy Number Variation of KIR Genes Influences HIV-1 Control. *PLoS Biol* 9, e1001208. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001208>
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L., 1996. The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med* 184, 505–518. <https://doi.org/10.1084/jem.184.2.505>
- Pende, D., Cantoni, C., Rivera, P., Vitale, M., Castriconi, R., Marcenaro, S., Nanni, M., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, A., Moretta, L., 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31, 1076–1086. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200104\)31:4<1076::aid-immu1076>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200104)31:4<1076::aid-immu1076>3.0.co;2-y)
- Pende, D., Marcenaro, S., Falco, M., Martini, S., Bernardo, M.E., Montagna, D., Romeo, E., Cognet, C., Martinetti, M., Maccario, R., Mingari, M.C., Vivier, E., Moretta, L., Locatelli, F., Moretta, A., 2009. Anti-leukemia activity of alloreactive NK cells in KIR ligand-mismatched haploidentical HSCT for pediatric patients: evaluation of the functional role of activating KIR and redefinition of inhibitory KIR specificity. *Blood* 113, 3119–3129. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-164103>
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1505–1516. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1505>
- Pérez-Martínez, A., Ferreras, C., Pascual, A., Gonzalez-Vicent, M., Alonso, L., Badell, I., Fernández Navarro, J.M., Regueiro, A., Plaza, M., Pérez Hurtado, J.M., Benito, A., Beléndez, C., Couselo, J.M., Fuster, J.L., Díaz-Almirón, M., Bueno, D., Mozo, Y., Marsal, J., Gómez López, A., Sisinni, L., de Heredia, C.D., Díaz, M.Á., 2020. Haploidentical transplantation in high-risk pediatric leukemia: A retrospective comparative analysis on behalf of the Spanish working Group for bone marrow transplantation in children (GETMON) and the Spanish Grupo for hematopoietic transplantation (GETH). *Am J Hematol* 95, 28–37. <https://doi.org/10.1002/ajh.25661>
- Pfeiffer, M.M., Feuchtinger, T., Teltschik, H.-M., Schumm, M., Müller, I., Handgretinger, R., Lang, P., 2010. Reconstitution of natural killer cell receptors influences natural killer activity and relapse rate after haploidentical transplantation of T- and B-cell depleted grafts in children. *Haematologica* 95, 1381–1388. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.021121>
- Platonova, S., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Crozet, L., Vieillard, V., Validire, P., André, P., Dieu-Nosjean, M.-C., Alifano, M., Régnard, J.-F., Fridman, W.-H., Sautès-Fridman, C., Cremer, I.,

2011. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res* 71, 5412–5422. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4179>
- Pörtner, L.M., Schönberg, K., Hejazi, M., Brünnert, D., Neumann, F., Galonska, L., Reusch, U., Little, M., Haas, R., Uhrberg, M., 2012. T and NK cells of B cell NHL patients exert cytotoxicity against lymphoma cells following binding of bispecific tetravalent antibody CD19 × CD3 or CD19 × CD16. *Cancer Immunol Immunother* 61, 1869–1875. <https://doi.org/10.1007/s00262-012-1339-9>
- Pugh, J., Nemat-Gorgani, N., Djaoud, Z., Guethlein, L.A., Norman, P.J., Parham, P., 2019. In vitro education of human natural killer cells by KIR3DL1. *Life Sci Alliance* 2. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900434>
- Pyo, C.-W., Williams, L.M., Moore, Y., Hyodo, H., Li, S.S., Zhao, L.P., Sageshima, N., Ishitani, A., Geraghty, D.E., 2006. HLA-E, HLA-F, and HLA-G polymorphism: genomic sequence defines haplotype structure and variation spanning the nonclassical class I genes. *Immunogenetics* 58, 241–251. <https://doi.org/10.1007/s00251-005-0076-z>
- Quek, L., Ferguson, P., Metzner, M., Ahmed, I., Kennedy, A., Garnett, C., Jeffries, S., Walter, C., Piechocki, K., Timbs, A., Danby, R., Raghavan, M., Peniket, A., Griffiths, M., Bacon, A., Ward, J., Wheatley, K., Vyas, P., Craddock, C., 2016. Mutational analysis of disease relapse in patients allografted for acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 1, 193–204. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000760>
- Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E.O., 2001. Cutting Edge: Induction of IFN- $\gamma$  Production but Not Cytotoxicity by the Killer Cell Ig-Like Receptor KIR2DL4 (CD158d) in Resting NK Cells. *The Journal of Immunology* 167, 1877–1881. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.4.1877>
- Rajagopalan, S., Long, E.O., 1999. A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J Exp Med* 189, 1093–1100. <https://doi.org/10.1084/jem.189.7.1093>
- Rajagopalan, S., Long, E.O., 1997. The Direct Binding of a p58 Killer Cell Inhibitory Receptor to Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (HLA)-Cw4 Exhibits Peptide Selectivity. *J Exp Med* 185, 1523–1528.
- Ramsuran, V., Hernández-Sánchez, P.G., O’huigin, C., Sharma, G., Spence, N., Augusto, D.G., Gao, X., García-Sepúlveda, C.A., Kaur, G., Mehra, N.K., Carrington, M., 2017. Sequence and Phylogenetic Analysis of the Untranslated Promoter Regions for HLA Class I Genes. *J Immunol* 198, 2320–2329. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601679>
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., Jung, H., 2013. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 31, 413–441. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>
- Raulet, D.H., Vance, R.E., 2006. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6, 520–531. <https://doi.org/10.1038/nri1863>
- Rebmann, V., Schütt, P., Brandhorst, D., Opalka, B., Moritz, T., Nowrousian, M.R., Grosse-Wilde, H., 2007. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol* 123, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.11.007>
- Reichmann, E., 2002. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. *Semin Cancer Biol* 12, 309–315. [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(02)00017-2)
- René, C., Lozano, C., Eliaou, J.-F., 2016. Expression of classical HLA class I molecules: regulation and clinical impacts: Julia Bodmer Award Review 2015. *HLA* 87, 338–349. <https://doi.org/10.1111/tan.12787>
- Retière, C., Willem, C., Guillaume, T., Vié, H., Gautreau-Rolland, L., Scotet, E., Saulquin, X., Gagne, K., Béné, M.C., Imbert, B.-M., Clemenceau, B., Peterlin, P., Garnier, A., Chevallier, P., 2018. Impact on early outcomes and immune reconstitution of high-dose post-transplant cyclophosphamide vs anti-thymocyte globulin after reduced intensity conditioning peripheral blood stem cell allogeneic transplantation. *Oncotarget* 9, 11451–11464. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24328>
- Rettman, P., Legrand, N., Willem, C., Lodé, L., Chevallier, P., Cesbron, A., Senitzer, D., Retière, C., Gagne, K., 2015. Use of killer cell immunoglobulin-like receptor genes as early markers of

- hematopoietic chimerism after double-umbilical cord blood transplantation. *Haematologica* 100, e475-479. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.127993>
- Rettman, P., Malard, F., Legrand, N., Avinens, O., Eliaou, J.-F., Picard, C., Dormoy, A., Lafarge, X., de Matteis, M., Kennel, A., Loiseau, P., Devys, A., Boudifa, A., Absi, L., Fort, M., Masson, D., Quainon, F., Theodorou, I., Batho, A., Parissiadis, A., Delbos, F., Drouet, M., Senitzer, D., Marry, E., Raus, N., Yakoub-Agha, I., Cesbron, A., Retière, C., Gagne, K., 2016. Impact of KIR/HLA genetic combinations on double umbilical cord blood transplantation outcomes. Results of a French multicentric retrospective study on behalf of the Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) and the Société Francophone d'Histocompatibilité et d'Immunogénétique (SFHI). *Bone Marrow Transplant* 51, 1499–1503. <https://doi.org/10.1038/bmt.2016.151>
- Rettman, Pauline, Willem, C., David, G., Riou, R., Legrand, N., Esbelin, J., Cesbron, A., Senitzer, D., Gagne, K., Retière, C., 2016. New insights on the natural killer cell repertoire from a thorough analysis of cord blood cells. *J Leukoc Biol* 100, 471–479. <https://doi.org/10.1189/jlb.1HI0116-036R>
- Rettman, P., Willem, C., Volteau, C., Legrand, N., Chevallier, P., Lodé, L., Esbelin, J., Cesbron, A., Bonneville, M., Moreau, P., Senitzer, D., Retière, C., Gagne, K., 2017. Impact of Graft-Versus-Graft Natural Killer Cell Alloreactivity on Single Unit Dominance After Double Umbilical Cord Blood Transplantation. *Transplantation* 101, 2092–2101. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001545>
- Richard, J., Sindhu, S., Pham, T.N.Q., Belzile, J.-P., Cohen, E.A., 2010. HIV-1 Vpr up-regulates expression of ligands for the activating NKG2D receptor and promotes NK cell-mediated killing. *Blood* 115, 1354–1363. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237370>
- Robinson, J., Guethlein, L.A., Cereb, N., Yang, S.Y., Norman, P.J., Marsh, S.G.E., Parham, P., 2017. Distinguishing functional polymorphism from random variation in the sequences of >10,000 HLA-A, -B and -C alleles. *PLoS Genet* 13. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006862>
- Robinson, J., Halliwell, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., Marsh, S.G.E., 2013. The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 41, D1222-1227. <https://doi.org/10.1093/nar/gks949>
- Romagné, F., André, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D.M., Blaser, B.W., Della Chiesa, M., Moretta, A., Vivier, E., Caligiuri, M.A., Velardi, A., Wagtman, N., 2009. Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114, 2667–2677. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206532>
- Romee, R., Cooley, S., Berrien-Elliott, M.M., Westervelt, P., Verneris, M.R., Wagner, J.E., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Ustun, C., DeFor, T.E., Vivek, S., Peck, L., DiPersio, J.F., Cashen, A.F., Killo, R., Musiek, A., Schaffer, A., Anadkat, M.J., Rosman, I., Miller, D., Egan, J.O., Jeng, E.K., Rock, A., Wong, H.C., Fehniger, T.A., Miller, J.S., 2018. First-in-human phase 1 clinical study of the IL-15 superagonist complex ALT-803 to treat relapse after transplantation. *Blood* 131, 2515–2527. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-823757>
- Rosmaraki, E.E., Douagi, I., Roth, C., Colucci, F., Cumano, A., Di Santo, J.P., 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol* 31, 1900–1909. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200106\)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::aid-immu1900>3.0.co;2-m)
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W.D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M.F., Velardi, A., 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100. <https://doi.org/10.1126/science.1068440>
- Ruggeri, L., Urbani, E., André, P., Mancusi, A., Tosti, A., Topini, F., Bléry, M., Animobono, L., Romagné, F., Wagtman, N., Velardi, A., 2016. Effects of anti-NKG2A antibody administration on leukemia and normal hematopoietic cells. *Haematologica* 101, 626–633. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.135301>
- Russo, A., Oliveira, G., Berglund, S., Greco, R., Gambacorta, V., Cieri, N., Toffalori, C., Zito, L., Lorentino, F., Piemontese, S., Morelli, M., Giglio, F., Assanelli, A., Stanghellini, M.T.L., Bonini, C., Peccatori, J., Ciceri, F., Luznik, L., Vago, L., 2018. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: dynamics and clinical implications. *Blood* 131, 247–262. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-780668>

- Sánchez-Mejorada, G., Rosales, C., 1998. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol* 63, 521–533. <https://doi.org/10.1002/jlb.63.5.521>
- Sanger, F., Coulson, A.R., 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94, 441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Santos, M.R., Couto, A.R., Foroni, I., Bettencourt, B.F., Li, Z., Meneses, R., Wheeler, L., Pereira, J., Pimentel-Santos, F., Fonseca, J.E., Alves, H., Martinho, A., Lima, M., Brown, M.A., Bruges-Armas, J., 2018. Non-classical human leucocyte antigens in ankylosing spondylitis: possible association with HLA-E and HLA-F. *RMD Open* 4, e000677. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2018-000677>
- Santourlidis, S., Graffmann, N., Christ, J., Uhrberg, M., 2008. Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J Immunol* 180, 418–425. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.418>
- Santourlidis, S., Trompeter, H.-I., Weinhold, S., Eisermann, B., Meyer, K.L., Wernet, P., Uhrberg, M., 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol* 169, 4253–4261. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4253>
- Saunders, P.M., Vivian, J.P., O'Connor, G.M., Sullivan, L.C., Pymm, P., Rossjohn, J., Brooks, A.G., 2015. A bird's eye view of NK cell receptor interactions with their MHC class I ligands. *Immunological Reviews* 267, 148–166. <https://doi.org/10.1111/imr.12319>
- Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ringdén, O., Ljunggren, H.-G., Remberger, M., 2004. Increased infection-related mortality in KIR-ligand-mismatched unrelated allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation. *Transplantation* 78, 1081–1085. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000137103.19717.86>
- Schellekens, J., Rozemuller, E.H., Petersen, E.J., van den Tweel, J.G., Verdonck, L.F., Tilanus, M.G.J., 2008. Activating KIRs exert a crucial role on relapse and overall survival after HLA-identical sibling transplantation. *Mol Immunol* 45, 2255–2261. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.11.014>
- Schetelig, J., Baldauf, H., Koster, L., Kuxhausen, M., Heidenreich, F., de Wreede, L.C., Spellman, S., van Gelder, M., Bruno, B., Onida, F., Lange, V., Massalski, C., Potter, V., Ljungman, P., Schaap, N., Hayden, P., Lee, S.J., Kröger, N., Hsu, K., Schmidt, A.H., Yakoub-Agha, I., Robin, M., 2020. Haplotype Motif-Based Models for KIR-Genotype Informed Selection of Hematopoietic Cell Donors Fail to Predict Outcome of Patients With Myelodysplastic Syndromes or Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol* 11, 584520. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.584520>
- Schleypen, J.S., Von Geldern, M., Weiss, E.H., Kotzias, N., Rohrmann, K., Schendel, D.J., Falk, C.S., Pohla, H., 2003. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer* 106, 905–912. <https://doi.org/10.1002/ijc.11321>
- Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T.D., Han, H., Chiang, S.C.C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K.-J., Ljunggren, H.-G., Miller, J.S., Bryceson, Y.T., 2015. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* 42, 443–456. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.02.008>
- Schrama, D., Reisfeld, R.A., Becker, J.C., 2006. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 5, 147–159. <https://doi.org/10.1038/nrd1957>
- Scoville, S.D., Freud, A.G., Caligiuri, M.A., 2019. Cellular pathways in the development of human and murine innate lymphoid cells. *Curr Opin Immunol* 56, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2018.11.003>
- Shaffer, B.C., Le Luduec, J.-B., Park, S., Devlin, S., Archer, A., Davis, E., Cooper, C., Nhaissi, M., Suri, B., Wells, D., Tamari, R., Papadopoulos, E., Jakubowski, A.A., Giralt, S., Hsu, K.C., 2021. Prospective KIR genotype evaluation of hematopoietic cell donors is feasible with potential to benefit patients with AML. *Blood Advances* 5, 2003–2011. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002701>

- Shibuya, A., Campbell, D., Hannum, C., Yssel, H., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Kitamura, T., Nicholl, J., Sutherland, G.R., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4, 573–581. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)70060-4](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)70060-4)
- Shibuya, A., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1998. Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *J Immunol* 161, 1671–1676.
- Shilling, H.G., Guethlein, L.A., Cheng, N.W., Gardiner, C.M., Rodriguez, R., Tyan, D., Parham, P., 2002. Allelic Polymorphism Synergizes with Variable Gene Content to Individualize Human KIR Genotype. *The Journal of Immunology* 168, 2307–2315. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2307>
- Shilling, H.G., McQueen, K.L., Cheng, N.W., Shizuru, J.A., Negrin, R.S., Parham, P., 2003. Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 101, 3730–3740. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-08-2568>
- Shimoni, A., Labopin, M., Finke, J., Ciceri, F., Deconinck, E., Kröger, N., Gramatzki, M., Stelljes, M., Blaise, D., Stoelzel, F., Chevallier, P., Holler, E., Fegueux, N., Mohty, M., Nagler, A., 2019. Donor selection for a second allogeneic stem cell transplantation in AML patients relapsing after a first transplant: a study of the Acute Leukemia Working Party of EBMT. *Blood Cancer J* 9. <https://doi.org/10.1038/s41408-019-0251-3>
- Shouval, R., Labopin, M., Bondi, O., Mishan-Shamay, H., Shimoni, A., Ciceri, F., Esteve, J., Giebel, S., Gorin, N.C., Schmid, C., Polge, E., Aljurf, M., Kroger, N., Craddock, C., Bacigalupo, A., Cornelissen, J.J., Baron, F., Unger, R., Nagler, A., Mohty, M., 2015. Prediction of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation Mortality 100 Days After Transplantation Using a Machine Learning Algorithm: A European Group for Blood and Marrow Transplantation Acute Leukemia Working Party Retrospective Data Mining Study. *J Clin Oncol* 33, 3144–3151. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1339>
- Siewiera, J., El Costa, H., Tabiasco, J., Berrebi, A., Cartron, G., Le Bouteiller, P., Bouteiller, P., Jabrane-Ferrat, N., 2013. Human cytomegalovirus infection elicits new decidual natural killer cell effector functions. *PLoS Pathog* 9, e1003257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003257>
- Sim, G.C., Radvanyi, L., 2014. The IL-2 cytokine family in cancer immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews, Special Issue: Cytokines and cytokine receptors as Immunotherapeutics* 25, 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.018>
- Sips, M., Liu, Q., Draghi, M., Ghebremichael, M., Berger, C.T., Suscovich, T.J., Sun, Y., Walker, B.D., Carrington, M., Altfeld, M., Brouckaert, P., De Jager, P.L., Alter, G., 2016. HLA-C levels impact natural killer cell subset distribution and function. *Hum Immunol* 77, 1147–1153. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.08.004>
- Sivori, S., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Quatrini, L., Munari, E., Vacca, P., Tumino, N., Mariotti, F.R., Mingari, M.C., Pende, D., Moretta, L., 2020. Inhibitory Receptors and Checkpoints in Human NK Cells, Implications for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol* 11, 2156. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02156>
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., 1997. p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *J Exp Med* 186, 1129–1136.
- Smith, S.L., Kennedy, P.R., Stacey, K.B., Worboys, J.D., Yarwood, A., Seo, S., Solloa, E.H., Mistretta, B., Chatterjee, S.S., Gunaratne, P., Allette, K., Wang, Y.-C., Smith, M.L., Sebra, R., Mace, E.M., Horowitz, A., Thomson, W., Martin, P., Eyre, S., Davis, D.M., 2020. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Adv* 4, 1388–1406. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000699>
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S.L.H., Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>
- Solomon, S.R., Aubrey, M.T., Zhang, X., Piluso, A., Freed, B.M., Brown, S., Jackson, K.C., Morris, L.E., Holland, H.K., Solh, M.M., Bashey, A., 2018. Selecting the Best Donor for Haploidentical Transplant: Impact of HLA, Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor Genotyping, and Other

- Clinical Variables. *Biol Blood Marrow Transplant* 24, 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.01.013>
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M.L., Ricciardi, M.R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M.T., Guarini, A., Foà, R., Santoni, A., 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 113, 3503–3511. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-173914>
- Spits, H., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Vivier, E., 2013. Innate lymphoid cells—a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13, 145–149. <https://doi.org/10.1038/nri3365>
- Stern, M., Ruggeri, L., Capanni, M., Mancusi, A., Velardi, A., 2008. Human leukocyte antigens A23, A24, and A32 but not A25 are ligands for KIR3DL1. *Blood* 112, 708–710. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137521>
- Stewart, C.A., Van Bergen, J., Trowsdale, J., 2003. Different and divergent regulation of the KIR2DL4 and KIR3DL1 promoters. *J Immunol* 170, 6073–6081. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.12.6073>
- Stocker, N., Gaugler, B., Labopin, M., Farge, A., Ye, Y., Ricard, L., Brissot, E., Duléry, R., Sestili, S., Battipaglia, G., Médiavilla, C., Paviglianiti, A., Banet, A., Van De Wyngaert, Z., Ledraa, T., Mohty, M., Malard, F., 2020. High-dose post-transplant cyclophosphamide impairs  $\gamma\delta$  T-cell reconstitution after haploidentical haematopoietic stem cell transplantation using low-dose antithymocyte globulin and peripheral blood stem cell graft. *Clin Transl Immunology* 9, e1171. <https://doi.org/10.1002/cti2.1171>
- Storek, J., Storb, R., 2000. T-cell reconstitution after stem-cell transplantation—by which organ: *Lancet* 355, 1843–1844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02284-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02284-4)
- Storek, J., Witherspoon, R.P., Maloney, D.G., Chauncey, T.R., Storb, R., 1997. Improved reconstitution of CD4 T cells and B cells but worsened reconstitution of serum IgG levels after allogeneic transplantation of blood stem cells instead of marrow. *Blood* 89, 3891–3893.
- Strong, R.K., Holmes, M.A., Li, P., Braun, L., Lee, N., Geraghty, D.E., 2003. HLA-E allelic variants. Correlating differential expression, peptide affinities, crystal structures, and thermal stabilities. *J Biol Chem* 278, 5082–5090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208268200>
- Stulberg, M.J., Wright, P.W., Dang, H., Hanson, R.J., Miller, J.S., Anderson, S.K., 2007. Identification of distal KIR promoters and transcripts. *Genes Immun* 8, 124–130. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364363>
- Sun, H.S., Liu, D.X., Bai, Y.Y., Hu, N.W., 2019. Disease-association of different killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) and HLA-C gene combinations in reactive arthritis. *Modern Rheumatology* 29, 531–537. <https://doi.org/10.1080/14397595.2018.1483292>
- Sun, R., Fan, J., Wei, H., Zhang, C., Tian, Z., 2003. Use of interleukin-15 for preparation of adherent NK cells from human peripheral blood: comparison with interleukin-2. *J Immunol Methods* 279, 79–90. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(03\)00245-x](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(03)00245-x)
- Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2010a. Improved survival with inhibitory killer immunoglobulin receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.11.022>
- Symons, H.J., Leffell, M.S., Rossiter, N.D., Zahurak, M., Jones, R.J., Fuchs, E.J., 2010b. Improved survival with inhibitory Killer Immunoglobulin Receptor (KIR) gene mismatches and KIR haplotype B donors after nonmyeloablative, HLA-haploidentical bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.11.022>
- Takeshita, T., Asao, H., Ohtani, K., Ishii, N., Kumaki, S., Tanaka, N., Munakata, H., Nakamura, M., Sugamura, K., 1992. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science* 257, 379–382. <https://doi.org/10.1126/science.1631559>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tamouza, R., Busson, M., Rocha, V., Fortier, C., Haddad, Y., Brun, M., Boukouaci, W., Bleux, H., Socié, G., Krishnamoorthy, R., Toubert, A., Gluckman, E., Charron, D., 2006. Homozygous status for HLA-E\*0103 confers protection from acute graft-versus-host disease and transplant-

- related mortality in HLA-matched sibling hematopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 82, 1436–1440. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000244598.92049.dd>
- Tang, X., Yang, L., Li, Z., Nalin, A.P., Dai, H., Xu, T., Yin, J., You, F., Zhu, M., Shen, W., Chen, G., Zhu, X., Wu, D., Yu, J., 2018. First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Am J Cancer Res* 8, 1083–1089.
- Tao, S., He, Y., Kichula, K.M., Wang, J., He, J., Norman, P.J., Zhu, F., 2021. High-Resolution Analysis Identifies High Frequency of KIR-A Haplotypes and Inhibitory Interactions of KIR With HLA Class I in Zhejiang Han. *Front Immunol* 12, 640334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.640334>
- Tauro, S., Craddock, C., Peggs, K., Begum, G., Mahendra, P., Cook, G., Marsh, J., Milligan, D., Goldstone, A., Hunter, A., Khwaja, A., Chopra, R., Littlewood, T., Peniket, A., Parker, A., Jackson, G., Hale, G., Cook, M., Russell, N., Mackinnon, S., 2005. Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplasia. *J Clin Oncol* 23, 9387–9393. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.0057>
- The involvement of natural killer cells in the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome, 2004. *Am J Clin Pathol* 121, 507–511. <https://doi.org/10.1309/WPK7-Y2XK-NF4C-BF3R>
- Thomas, E.D., Storb, R., 1970. Technique for human marrow grafting. *Blood* 36, 507–515.
- Thomas, R., Apps, R., Qi, Y., Gao, X., Male, V., O’huigin, C., O’Connor, G., Ge, D., Fellay, J., Martin, J.N., Margolick, J., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Martin, M.P., Telenti, A., Deeks, S.G., Walker, B.D., Goldstein, D., McVicar, D.W., Moffett, A., Carrington, M., 2009. HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat Genet* 41, 1290–1294. <https://doi.org/10.1038/ng.486>
- Thomas, R., Yamada, E., Alter, G., Martin, M.P., Bashirova, A.A., Norman, P.J., Altfeld, M., Parham, P., Anderson, S.K., McVicar, D.W., Carrington, M., 2008. Novel KIR3DL1 alleles and their expression levels on NK cells: convergent evolution of KIR3DL1 phenotype variation? *J Immunol* 180, 6743–6750. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6743>
- Thöns, C., Senff, T., Hydes, T.J., Manser, A.R., Heinemann, F.M., Heinold, A., Heilmann, M., Kim, A.Y., Uhrberg, M., Scherbaum, N., Lauer, G.M., Khakoo, S.I., Timm, J., 2017. HLA-Bw4 80(T) and multiple HLA-Bw4 copies combined with KIR3DL1 associate with spontaneous clearance of HCV infection in people who inject drugs. *J Hepatol* 67, 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.040>
- Toffalori, C., Cavattoni, I., Deola, S., Mastaglio, S., Giglio, F., Mazzi, B., Assanelli, A., Peccatori, J., Bordignon, C., Bonini, C., Cortelazzo, S., Ciceri, F., Fleischhauer, K., Vago, L., 2012. Genomic loss of patient-specific HLA in acute myeloid leukemia relapse after well-matched unrelated donor HSCT. *Blood* 119, 4813–4815. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-411686>
- Tomasello, E., Yessaad, N., Gregoire, E., Hudspeth, K., Luci, C., Mavilio, D., Hardwigen, J., Vivier, E., 2012. Mapping of NKp46(+) Cells in Healthy Human Lymphoid and Non-Lymphoid Tissues. *Front Immunol* 3, 344. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00344>
- Tomblyn, M., Young, J.-A.H., Haagenson, M.D., Klein, J.P., Trachtenberg, E.A., Storek, J., Spellman, S.R., Cooley, S., Miller, J.S., Weisdorf, D.J., CIBMTR Infection and Immune Reconstitution Working Committee, 2010. Decreased infections in recipients of unrelated donor hematopoietic cell transplantation from donors with an activating KIR genotype. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.02.024>
- Tordai, A., Bors, A., Kiss, K.P., Balassa, K., Andrikovics, H., Batai, A., Szilvasi, A., Rajczy, K., Inotai, D., Torbagyi, E., Lengyel, L., Barta, A., Remenyi, P., Masszi, T., 2019. Donor KIR2DS1 reduces the risk of transplant related mortality in HLA-C2 positive young recipients with hematological malignancies treated by myeloablative conditioning. *PLoS One* 14, e0218945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218945>
- Toubi, E., Vadasz, Z., 2019. Innate immune-responses and their role in driving autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 18, 306–311. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.10.005>



- Trowsdale, J., Barten, R., Haude, A., Stewart, C.A., Beck, S., Wilson, M.J., 2001. The genomic context of natural killer receptor extended gene families. *Immunological Reviews* 181, 20–38. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2001.1810102.x>
- Tsamadou, C., Fürst, D., Vucinic, V., Bunjes, D., Neuchel, C., Mytilineos, D., Gramatzki, M., Arnold, R., Wagner, E.M., Einsele, H., Müller, C., Schrezenmeier, H., Mytilineos, J., 2017. Human leukocyte antigen-E mismatch is associated with better hematopoietic stem cell transplantation outcome in acute leukemia patients. *Haematologica* 102, 1947–1955. <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.169805>
- Tsamadou, C., Fürst, D., Wang, T., He, N., Lee, S.J., Spellman, S.R., Fleischhauer, K., Hsu, K.C., Paczesny, S., Verneris, M.R., Schrezenmeier, H., Mytilineos, J., 2019. Donor HLA-E Status Associates with Disease-Free Survival and Transplant-Related Mortality after Non In Vivo T Cell-Depleted HSCT for Acute Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, 2357–2365. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2019.08.007>
- Turner, B.M., 2002. Cellular Memory and the Histone Code. *Cell* 111, 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01080-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01080-2)
- Uhrberg, M., 2005. Shaping the human NK cell repertoire: an epigenetic glance at KIR gene regulation. *Molecular Immunology, Natural Killer cells from “disturbing” background to central players of immune responses* 42, 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.029>
- Uhrberg, M., Valiante, N.M., Shum, B.P., Shilling, H.G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L.L., Parham, P., 1997. Human Diversity in Killer Cell Inhibitory Receptor Genes. *Immunity* 7, 753–763. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80394-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80394-5)
- Vago, L., Perna, S.K., Zanussi, M., Mazzi, B., Barlassina, C., Stanghellini, M.T.L., Perrelli, N.F., Cosentino, C., Torri, F., Angius, A., Forno, B., Casucci, M., Bernardi, M., Peccatori, J., Corti, C., Bondanza, A., Ferrari, M., Rossini, S., Roncarolo, M.G., Bordignon, C., Bonini, C., Ciceri, F., Fleischhauer, K., 2009. Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 361, 478–488. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0811036>
- Vaidya, S.V., Stepp, S.E., McNERNEY, M.E., Lee, J.-K., Bennett, M., Lee, K.-M., Stewart, C.L., Kumar, V., Mathew, P.A., 2005. Targeted disruption of the 2B4 gene in mice reveals an in vivo role of 2B4 (CD244) in the rejection of B16 melanoma cells. *J Immunol* 174, 800–807. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.2.800>
- Vallera, D.A., Felices, M., McElmurry, R., McCullar, V., Zhou, X., Schmohl, J.U., Zhang, B., Lenvik, A.J., Panoskaltis-Mortari, A., Verneris, M.R., Tolar, J., Cooley, S., Weisdorf, D.J., Blazar, B.R., Miller, J.S., 2016. IL15 Trispecific Killer Engagers (TriKE) Make Natural Killer Cells Specific to CD33+ Targets While Also Inducing Persistence, In Vivo Expansion, and Enhanced Function. *Clin Cancer Res* 22, 3440–3450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2710>
- van den Brink, M.R.M., Velardi, E., Perales, M.-A., 2015. Immune reconstitution following stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015, 215–219. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2015.1.215>
- van der Ploeg, K., Le Luduec, J.-B., Stevenson, P.A., Park, S., Gooley, T.A., Petersdorf, E.W., Shaffer, B.C., Hsu, K.C., 2020. HLA-A alleles influencing NK cell function impact AML relapse following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood Advances* 4, 4955–4964. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002086>
- van Hall, T., André, P., Horowitz, A., Ruan, D.F., Borst, L., Zerbib, R., Narni-Mancinelli, E., van der Burg, S.H., Vivier, E., 2019. Monalizumab: inhibiting the novel immune checkpoint NKG2A. *J Immunother Cancer* 7, 263. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0761-3>
- Vargas, L. de B., Dourado, R.M., Amorim, L.M., Ho, B., Calonga-Solís, V., Issler, H.C., Marin, W.M., Beltrame, M.H., Petzl-Erler, M.L., Hollenbach, J.A., Augusto, D.G., 2020a. Single Nucleotide Polymorphism in KIR2DL1 Is Associated With HLA-C Expression in Global Populations. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01881>
- Vargas, L. de B., Dourado, R.M., Amorim, L.M., Ho, B., Calonga-Solís, V., Issler, H.C., Marin, W.M., Beltrame, M.H., Petzl-Erler, M.L., Hollenbach, J.A., Augusto, D.G., 2020b. Single Nucleotide Polymorphism in KIR2DL1 Is Associated With HLA-C Expression in Global Populations. *Front Immunol* 11, 1881. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01881>
- Vasu, S., He, S., Cheney, C., Gopalakrishnan, B., Mani, R., Lozanski, G., Mo, X., Groh, V., Whitman, S.P., Konopitzky, R., Kössl, C., Bucci, D., Lucas, D.M., Yu, J., Caligiuri, M.A., Blum, W.,

- Adam, P.J., Borges, E., Rueter, B., Heider, K.-H., Marcucci, G., Muthusamy, N., 2016. Decitabine enhances anti-CD33 monoclonal antibody BI 836858-mediated natural killer ADCC against AML blasts. *Blood* 127, 2879–2889. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-680546>
- Veillette, A., Latour, S., 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol* 15, 277–285. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(03\)00041-4](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00041-4)
- Vendelbosch, S., de Boer, M., Gouw, R.A.T.W., Ho, C.K.Y., Geissler, J., Swelsen, W.T.N., Moorhouse, M.J., Lardy, N.M., Roos, D., van den Berg, T.K., Kuijpers, T.W., 2013. Extensive Variation in Gene Copy Number at the Killer Immunoglobulin-Like Receptor Locus in Humans. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067619>
- Venstrom, J.M., Gooley, T.A., Spellman, S., Pring, J., Malkki, M., Dupont, B., Petersdorf, E., Hsu, K.C., 2010. Donor activating KIR3DS1 is associated with decreased acute GVHD in unrelated allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 115, 3162–3165. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-236943>
- Verheyden, S., Ferrone, S., Mulder, A., Claas, F.H., Schots, R., De Moerloose, B., Benoit, Y., Demanet, C., 2009. Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by Natural Killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 58, 855–865. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0601-7>
- Verheyden, S., Schots, R., Duquet, W., Demanet, C., 2005. A defined donor activating natural killer cell receptor genotype protects against leukemic relapse after related HLA-identical hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia* 19, 1446–1451. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403839>
- Vierra-Green, C., Roe, D., Hou, L., Hurley, C.K., Rajalingam, R., Reed, E., Lebedeva, T., Yu, N., Stewart, M., Noreen, H., Hollenbach, J.A., Guethlein, L.A., Wang, T., Spellman, S., Maiers, M., 2012. Allele-Level Haplotype Frequencies and Pairwise Linkage Disequilibrium for 14 KIR Loci in 506 European-American Individuals. *PLoS One* 7, e47491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047491>
- Vilches, C., Pando, M.J., Parham, P., 2000. Genes encoding human killer-cell Ig-like receptors with D1 and D2 extracellular domains all contain untranslated pseudoexons encoding a third Ig-like domain. *Immunogenetics* 51, 639–646. <https://doi.org/10.1007/s002510000184>
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., Callol, L., 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–28. [https://doi.org/10.1016/s0169-5002\(01\)00292-6](https://doi.org/10.1016/s0169-5002(01)00292-6)
- Vince, N., Li, H., Ramsuran, V., Naranbhai, V., Duh, F.-M., Fairfax, B.P., Saleh, B., Knight, J.C., Anderson, S.K., Carrington, M., 2016. HLA-C Level Is Regulated by a Polymorphic Oct1 Binding Site in the HLA-C Promoter Region. *Am. J. Hum. Genet.* 99, 1353–1358. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.09.023>
- Vinh, D.C., Patel, S.Y., Uzel, G., Anderson, V.L., Freeman, A.F., Olivier, K.N., Spalding, C., Hughes, S., Pittaluga, S., Raffeld, M., Sorbara, L.R., Elloumi, H.Z., Kuhns, D.B., Turner, M.L., Cowen, E.W., Fink, D., Long-Priel, D., Hsu, A.P., Ding, L., Paulson, M.L., Whitney, A.R., Sampaio, E.P., Frucht, D.M., DeLeo, F.R., Holland, S.M., 2010. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood* 115, 1519–1529. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-208629>
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., 1998. NKp44, a Novel Triggering Surface Molecule Specifically Expressed by Activated Natural Killer Cells, Is Involved in Non-Major Histocompatibility Complex-restricted Tumor Cell Lysis. *J Exp Med* 187, 2065–2072.
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., Powrie, F., Spits, H., 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* 174, 1054–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.017>
- Vivier, E., Morin, P., O'Brien, C., Druker, B., Schlossman, S.F., Anderson, P., 1991. Tyrosine phosphorylation of the Fc gamma RIII(CD16): zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. *J Immunol* 146, 206–210.

- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* 331, 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., Ugolini, S., 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Vollmers, S., Lobermeyer, A., Körner, C., 2021. The New Kid on the Block: HLA-C, a Key Regulator of Natural Killer Cells in Viral Immunity. *Cells* 10, 3108. <https://doi.org/10.3390/cells10113108>
- Voorter, C.E.M., Palusci, F., Tilanus, M.G.J., 2014. Sequence-based typing of HLA: an improved group-specific full-length gene sequencing approach. *Methods Mol Biol* 1109, 101–114. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9437-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9437-9_7)
- Wagner, I., Schefzyk, D., Pruschke, J., Schöfl, G., Schöne, B., Gruber, N., Lang, K., Hofmann, J., Gnahn, C., Heyn, B., Marin, W.M., Dandekar, R., Hollenbach, J.A., Schetelig, J., Pingel, J., Norman, P.J., Sauter, J., Schmidt, A.H., Lange, V., 2018. Allele-Level KIR Genotyping of More Than a Million Samples: Workflow, Algorithm, and Observations. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02843>
- Wainwright, S.D., Biro, P.A., Holmes, C.H., 2000. HLA-F is a predominantly empty, intracellular, TAP-associated MHC class Ib protein with a restricted expression pattern. *J Immunol* 164, 319–328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.1.319>
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., Vivier, E., 2005. Natural-killer cells and dendritic cells: “l’union fait la force.” *Blood* 106, 2252–2258. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1154>
- Wang, W., Jiang, J., Wu, C., 2020. CAR-NK for tumor immunotherapy: Clinical transformation and future prospects. *Cancer Lett* 472, 175–180. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.11.033>
- Wanquet, A., Bramanti, S., Harbi, S., Fürst, S., Legrand, F., Faucher, C., Granata, A., Calmels, B., Lemarie, C., Picard, C., Chabannon, C., Weiller, P.-J., Castagna, L., Blaise, D., Devillier, R., 2018. Killer Cell Immunoglobulin-Like Receptor–Ligand Mismatch in Donor versus Recipient Direction Provides Better Graft-versus-Tumor Effect in Patients with Hematologic Malignancies Undergoing Allogeneic T Cell–Replete Haploidentical Transplantation Followed by Post-Transplant Cyclophosphamide. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 24, 549–554. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.11.042>
- Waterhouse, M., Pfeifer, D., Pantic, M., Emmerich, F., Bertz, H., Finke, J., 2011. Genome-wide profiling in AML patients relapsing after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 17, 1450–1459.e1. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2011.07.012>
- Weisdorf, D., Cooley, S., Wang, T., Trachtenberg, E., Haagenson, M.D., Vierra-Green, C., Spellman, S., Spahn, A., Vogel, J., Kobusingye, H., Fehniger, T., Woolfrey, A., Devine, S., Ross, M., Waller, E.K., Sobecks, R., Parham, P., Guethlein, L.A., Marsh, S.G.E., Miller, J., participating center writing committee, 2019. KIR Donor Selection: Feasibility in Identifying better Donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 25, e28–e32. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.08.022>
- Weisdorf, D., Cooley, S., Wang, T., Trachtenberg, E., Vierra-Green, C., Spellman, S., Sees, J.A., Spahn, A., Vogel, J., Fehniger, T.A., Woolfrey, A.E., Devine, S.M., Ross, M., Waller, E.K., Sobecks, R.M., McGuirk, J., Oran, B., Farag, S.S., Shore, T., Van Besien, K., Marsh, S.G.E., Guethlein, L.A., Parham, P., Miller, J.S., 2020. KIR B donors improve the outcome for AML patients given reduced intensity conditioning and unrelated donor transplantation. *Blood Adv* 4, 740–754. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019001053>
- Wiernik, A., Foley, B., Zhang, B., Verneris, M.R., Warlick, E., Gleason, M.K., Ross, J.A., Luo, X., Weisdorf, D.J., Walcheck, B., Vallera, D.A., Miller, J.S., 2013. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res* 19, 3844–3855. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0505>
- Willem, C., Guillaume, T., Makanga, D.R., Legrand, N., Cesbron, A., Gagne, K., Peterlin, P., Garnier, A., Le Bourgeois, A., Bene, M.C., Chevallier, P., Retiere, C., 2019a. Ptcy+ ATG Vs Ptcy Alone As Gvhd Prophylaxis for Peripheral Blood Stem Cells Haplo-Transplants: Comparison of NK and T Cell Effector Reconstitution 1999.
- Willem, C., Makanga, D.R., Guillaume, T., Manianguou, B., Legrand, N., Gagne, K., Peterlin, P., Garnier, A., Béné, M.C., Cesbron, A., Le Bourgeois, A., Chevallier, P., Retière, C., 2019b.


- Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J Immunol* 202, 2141–2152. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801489>
- Wilson, M.J., Torkar, M., Trowsdale, J., 1997. Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene. *Tissue Antigens* 49, 574–579. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1997.tb02804.x>
- Wischhusen, J., Friese, M.A., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Weller, M., 2005. HLA-E protects glioma cells from NKG2D-mediated immune responses in vitro: implications for immune escape in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 523–528. <https://doi.org/10.1093/jnen/64.6.523>
- Wiśniewski, A., Bilińska, M., Klimczak, A., Wagner, M., Majorczyk, E., Nowak, I., Pokryszko-Dragan, A., Kuśnierczyk, P., 2010. Association of the HLA-G gene polymorphism with multiple sclerosis in a Polish population. *Int J Immunogenet* 37, 307–311. <https://doi.org/10.1111/j.1744-313X.2010.00926.x>
- Wu, G.Q., Zhao, Y.M., Lai, X.Y., Luo, Y., Tan, Y.M., Shi, J.M., Li, L., Zheng, W.Y., Zhang, J., Hu, X.R., Jin, A.Y., He, J.S., Xie, W.Z., Ye, X.J., Cai, Z., Lin, M.F., Huang, H., 2010. The beneficial impact of missing KIR ligands and absence of donor KIR2DS3 gene on outcome following unrelated hematopoietic SCT for myeloid leukemia in the Chinese population. *Bone Marrow Transplant* 45, 1514–1521. <https://doi.org/10.1038/bmt.2010.3>
- Wu, X., He, J., Wu, D., Bao, X., Qiu, Q., Yuan, X., Han, Y., Sun, A., Chen, G., Xu, Y., 2009. KIR and HLA-Cw genotypes of donor-recipient pairs influence the rate of CMV reactivation following non-T-cell deleted unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Am J Hematol* 84, 776–777. <https://doi.org/10.1002/ajh.21527>
- Wuerfel, F.M., Huebner, H., Häberle, L., Gass, P., Hein, A., Jud, S.M., Hack, C.C., Wunderle, M., Schulz-Wendtland, R., Erber, R., Hartmann, A., Ekici, A.B., Beckmann, M.W., Fasching, P.A., Ruebner, M., 2020. HLA-G and HLA-F protein isoform expression in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *Sci Rep* 10, 15750. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72837-3>
- Xiong, S., Sharkey, A.M., Kennedy, P.R., Gardner, L., Farrell, L.E., Chazara, O., Bauer, J., Hiby, S.E., Colucci, F., Moffett, A., 2013. Maternal uterine NK cell-activating receptor KIR2DS1 enhances placentation. *J Clin Invest* 123, 4264–4272. <https://doi.org/10.1172/JCI68991>
- Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A.-M., Partheniou, F., Parham, P., 2006. Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. *J Exp Med* 203, 633–645. <https://doi.org/10.1084/jem.20051884>
- Yokoyama, W.M., Kim, S., 2006. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* 24, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.03.006>
- Young, J.-A.H., Logan, B.R., Wu, J., Wingard, J.R., Weisdorf, D.J., Mudrick, C., Knust, K., Horowitz, M.M., Confer, D.L., Dubberke, E.R., Pergam, S.A., Marty, F.M., Strasfeld, L.M., Brown, J.W.M., Langston, A.A., Schuster, M.G., Kaul, D.R., Martin, S.I., Anasetti, C., Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network Trial 0201, 2016. Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 22, 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.09.013>
- Young, N.T., Waller, E.C.P., Patel, R., Roghanian, A., Austyn, J.M., Trowsdale, J., 2008. The inhibitory receptor LILRB1 modulates the differentiation and regulatory potential of human dendritic cells. *Blood* 111, 3090–3096. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-089771>
- Yu, J., Mitsui, T., Wei, M., Mao, H., Butchar, J.P., Shah, M.V., Zhang, J., Mishra, A., Alvarez-Breckenridge, C., Liu, X., Liu, S., Yokohama, A., Trotta, R., Marcucci, G., Benson, D.M., Loughran, T.P., Tridandapani, S., Caligiuri, M.A., 2011. NKp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest* 121, 1456–1470. <https://doi.org/10.1172/JCI43242>
- Zaia, J.A., Sun, J.Y., Gallez-Hawkins, G.M., Thao, L., Oki, A., Lacey, S.F., Dagis, A., Palmer, J., Diamond, D.J., Forman, S.J., Senitzer, D., 2009. The effect of single and combined activating killer immunoglobulin-like receptor genotypes on cytomegalovirus infection and immunity after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 15, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.11.030>

- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188, 2375–2380. <https://doi.org/10.1084/jem.188.12.2375>
- Zeiser, R., Blazar, B.R., 2017. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med* 377, 2167–2179. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1609337>
- Zeiser, R., Vago, L., 2019. Mechanisms of immune escape after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 133, 1290–1297. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-10-846824>
- Zhang, X., Feng, J., Chen, S., Yang, H., Dong, Z., 2019. Synergized regulation of NK cell education by NKG2A and specific Ly49 family members. *Nat Commun* 10, 5010. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13032-5>
- Zhang, X., Lin, A., Zhang, J.-G., Bao, W.-G., Xu, D.-P., Ruan, Y.-Y., Yan, W.-H., 2013. Alteration of HLA-F and HLA I antigen expression in the tumor is associated with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 132, 82–89. <https://doi.org/10.1002/ijc.27621>
- Zhao, X.-Y., Chang, Y.-J., Xu, L.-P., Zhang, X.-H., Liu, K.-Y., Li, D., Huang, X.-J., 2014. HLA and KIR genotyping correlates with relapse after T-cell-replete haploidentical transplantation in chronic myeloid leukaemia patients. *Br J Cancer* 111, 1080–1088. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.423>
- Zhao, X.-Y., Chang, Y.-J., Zhao, X.-S., Xu, L.-P., Zhang, X.-H., Liu, K.-Y., Li, D., Huang, X.-J., 2015. Recipient expression of ligands for donor inhibitory KIRs enhances NK-cell function to control leukemic relapse after haploidentical transplantation. *Eur J Immunol* 45, 2396–2408. <https://doi.org/10.1002/eji.201445057>
- Zhao, X.-Y., Luo, X.-Y., Yu, X.-X., Zhao, X.-S., Han, T.-T., Chang, Y.-J., Huo, M.-R., Xu, L.-P., Zhang, X.-H., Liu, K.-Y., Li, D., Jiang, Z.-F., Huang, X.-J., 2017. Recipient-donor KIR ligand matching prevents CMV reactivation post-haploidentical T cell-replete transplantation. *Br J Haematol* 177, 766–781. <https://doi.org/10.1111/bjh.14622>
- Zheng, J., Xu, C., Chu, D., Zhang, X., Li, J., Ji, G., Hong, L., Feng, Q., Li, X., Wu, G., Du, J., Zhao, Q., 2014. Human leukocyte antigen G is associated with esophageal squamous cell carcinoma progression and poor prognosis. *Immunol Lett* 161, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.04.007>
- Zheng, M., Gao, Y., Wang, G., Song, G., Liu, S., Sun, D., Xu, Y., Tian, Z., 2020. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 17, 533–535. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>
- Zicari, S., Sessa, L., Cotugno, N., Ruggiero, A., Morrocchi, E., Concato, C., Rocca, S., Zangari, P., Manno, E.C., Palma, P., 2019. Immune Activation, Inflammation, and Non-AIDS Co-Morbidities in HIV-Infected Patients under Long-Term ART. *Viruses* 11, E200. <https://doi.org/10.3390/v11030200>
- Ziegler, M.C., Nelde, A., Weber, J.K., Schreitmüller, C.M., Martus, G., Huynh, T., Bunders, M.J., Lunemann, S., Stevanovic, S., Zhou, R., Altfeld, M., 2020. HIV-1 induced changes in HLA-C\*03: 04-presented peptide repertoires lead to reduced engagement of inhibitory natural killer cell receptors. *AIDS* 34, 1713–1723. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000002596>

# ANNEXES

Article

# Genetic and Molecular Basis of Heterogeneous NK Cell Responses against Acute Leukemia

Dhon Roméo Makanga<sup>1,2,3</sup>, Francesca Da Rin de Lorenzo<sup>1,2,3</sup>, Gaëlle David<sup>1,2,3</sup>, Catherine Willem<sup>1,2,3</sup>, Léa Dubreuil<sup>1,2,3</sup>, Nolwenn Legrand<sup>1,2,3</sup>, Thierry Guillaume<sup>2,4</sup>, Pierre Peterlin<sup>4</sup>, Amandine Lebourgeois<sup>4</sup>, Marie Christine Béné<sup>2,3,5</sup>, Alice Garnier<sup>4</sup>, Patrice Chevallier<sup>2,3,4</sup>, Ketevan Gendzekhadze<sup>6</sup>, Anne Cesbron<sup>1,7</sup>, Katia Gagne<sup>1,2,3,7</sup>, Béatrice Clemenceau<sup>2,3,†</sup> and Christelle Retière<sup>1,2,3,\*,†</sup> 

<sup>1</sup> Etablissement Français du Sang, 44011 Nantes, France; Dhon.Makanga@efs.sante.fr (D.R.M.); francedarin@gmail.com (F.D.R.d.L.); Gaelle.David@efs.sante.fr (G.D.); catherine.willem@efs.sante.fr (C.W.); lea.dubreuil@efs.sante.fr (L.D.); nolwenn.legrand@efs.sante.fr (N.L.); Anne.Cesbron@efs.sante.fr (A.C.); Katia.Gagne@efs.sante.fr (K.G.)

<sup>2</sup> Université de Nantes, INSERM U1232 CNRS, CRCINA, F-44000 Nantes, France; thierry.guillaume@chu-nantes.fr (T.G.); MarieChristine.BENE@chu-nantes.fr (M.C.B.); patrice.chevallier@chu-nantes.fr (P.C.); Beatrice.Clemenceau@univ-nantes.fr (B.C.)

<sup>3</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, F-44000 Nantes, France

<sup>4</sup> Hematology Clinic, CHU, 44000 Nantes, France; Pierre.PETERLIN@chu-nantes.fr (P.P.); amandinelebourgeois@wanadoo.fr (A.L.); alice.garnier@chu-nantes.fr (A.G.)

<sup>5</sup> Hematology Biology, CHU, 44000 Nantes, France

<sup>6</sup> HLA Laboratory, Department of Hematology and HCT, City of Hope, Medical Center, Duarte, CA 91010, USA; kgendzek@coh.org

<sup>7</sup> LabEx Transplantex, Université de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

\* Correspondence: christelle.retiere@efs.sante.fr

† The last two authors contributed equally to this work.

Received: 22 June 2020; Accepted: 13 July 2020; Published: 16 July 2020



**Abstract:** Natural killer (NK) cells are key cytotoxic effectors against malignant cells. Polygenic and polymorphic Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) and HLA genes participate in the structural and functional formation of the NK cell repertoire. In this study, we extensively investigated the anti-leukemic potential of NK cell subsets, taking into account these genetic parameters and cytomegalovirus (CMV) status. Hierarchical clustering analysis of NK cell subsets based on NKG2A, KIR, CD57 and NKG2C markers from 68 blood donors identified donor clusters characterized by a specific phenotypic NK cell repertoire linked to a particular immunogenetic KIR and HLA profile and CMV status. On the functional side, acute lymphoblastic leukemia (ALL) was better recognized by NK cells than acute myeloid leukemia (AML). However, a broad inter-individual disparity of NK cell responses exists against the same leukemic target, highlighting bad and good NK responders. The most effective NK cell subsets against different ALLs expressed NKG2A and represented the most frequent subset in the NK cell repertoire. In contrast, minority CD57<sup>+</sup> or/and KIR<sup>+</sup> NK cell subsets were more efficient against AML. Overall, our data may help to optimize the selection of hematopoietic stem cell donors on the basis of immunogenetic KIR/HLA for ALL patients and identify the best NK cell candidates in immunotherapy for AML.

**Keywords:** KIR; HLA; natural killer cells; repertoire; acute leukemia; CMV

## 1. Introduction

Natural killer (NK) cells are key cytotoxic effectors of innate immunity against malignant [1] and virally infected cells [2]. They are able to sense the absence or the low expression of HLA

class I molecules on cancer or virally infected cells via Killer cell Immunoglobulin-like Receptor (KIR) [3]. On the basis of their recognition of HLA class I, a strong interest in NK cells is focused on hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to optimize the graft-versus-leukemia (GvL) effect. In the context of acute leukemias, NK cell-mediated immunosurveillance requires the establishment of an immunological synapse between the NK cell and the leukemia target, involving a large number of interactions between inhibitory and activating NK receptors and their ligands expressed by leukemic cells. Inhibitory receptors mainly include KIR and NKG2A receptors, which are specific to HLA class I molecules. KIRs are clonally expressed on the surface of mature NK cells. In addition, inhibitory KIRs and autologous HLA class I interactions contribute to the functional education of NK cells [4]. Thus, only KIR<sup>+</sup> NK cells that have encountered their ligand during development will be educated to recognize their absence [5]. The inhibitory NKG2A receptor is expressed on the surface of immature NK cells and ensures NK cell-mediated immunosurveillance through interaction with the HLA-E molecule [6] before KIR expression. Moreover, NK cells express a wide range of activating receptors that recognize induced or upregulated molecules on tumor cells. Activating NK receptors known to be involved in NK cell activation include NKG2D, DNAM-1, 2B4 and NCRs such as NKp30, NKp44 and NKp46. NKG2D recognizes MICA/B and ULBP ligands, DNAM-1 recognizes PVR and Nectin-2 ligands, and 2B4 recognizes CD48 [7]. NCRs recognize different ligands on the cell membrane that can be induced in response to stress or pathogen infection [8–11] (Table 1). Cognate ligands are heterogeneously expressed on leukemias. It has been reported that the absence of expression or downregulation of HLA class I molecules, as well as the presence of activating ligands on the surface of leukemia cells, were associated with the reduction of relapse incidence and improved overall survival of patients with leukemia [12,13].

**Table 1.** Main inhibitory and activating NK cell receptors and their cognate ligands.

NK Receptors	CD Number	Ligands
		Activating
DNAM-1	CD226	Nectin-2 (CD112), PVR(CD155)
2B4	CD244	CD48
NKp30	CD337	B7-H6, BAT3 <sup>a</sup> , PfEMP1 <sup>a</sup>
NKp44	CD336	Nidogen-1, PCNA <sup>a</sup> , HS <sup>a</sup> , HLA-DP
NKp46	CD335	CFP <sup>a</sup> , viral HA, HN <sup>a</sup> or envelope proteins, PfEMP1 <sup>a</sup>
NKG2D	CD314	MIC-A <sup>a</sup> , MIC-B <sup>a</sup> , ULBP1-6
NKG2C	CD159a	HLA-E
		Inhibitory
NKG2A	CD159a	HLA-E
KIR2DL2/3	CD158b	HLA-C1, HLA-C2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> PVR, poliovirus receptor; BAT3, HLA-B-associated transcript 3; PfEMP1, *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; HS, heparan sulfate; CFP, Complement factor P; HA, haemagglutinin; HN, haemagglutinin neuramidase; MIC, major histocompatibility complex (MHC) class I polypeptide-related sequence. <sup>b</sup> KIR2DL2/L3 also weakly recognizes HLA-C2 alleles and few HLA-B alleles that bear the HLA-C1 epitope (e.g., HLA-B\*4601 and HLA-B\*7301).

We previously documented the beneficial role of KIR and HLA incompatibilities between the donor and the recipient, which significantly limited relapse in the context of haploidentical HSCT [14]. We showed that KIR and HLA incompatibilities participate in the activation and earlier differentiation of NK cells associated with more graft-versus-host-disease (GvHD) and less relapse [14]. However, we are not yet able to define the most effective NK cell populations against leukemia, depending on the nature of acute lymphoblastic or myeloid leukemia.

KIR and HLA genes participate in the structural and functional formation of the NK cell repertoire. The KIR and HLA gene families constitute the most polymorphic and polygenic receptor-ligand pair in humans, and their functional interactions drive tremendous NK cell diversity with a limited number of germline-encoded genes [15]. According to the NK cell differentiation model described by Bjorsktrom et al. [16], NK cell subsets can be defined on the basis of early differentiation markers,



such as NKG2A and KIR, and the terminal differentiation CD57 marker [17]. Indeed, during their development, immature CD56<sup>bright</sup> NK cells express NKG2A and then gradually lose the intensity of expression of CD56, resulting in a pool of CD56<sup>dim</sup> NK cells [18,19]. At this stage, NK cells can lose the expression of NKG2A and/or acquire KIR and/or CD57 markers in a non-coordinated manner, leading to mature CD56<sup>dim</sup> NK cell subsets. Human cytomegalovirus (CMV) drastically changes the NK cell repertoire, favoring a massive and lifelong expansion of adaptive-like NK cells that express activating CD94/NKG2C receptors; these cells constitute the most mature subset [20–22]. These amplified NKG2C<sup>+</sup> NK cells preferentially co-express inhibitory KIR, such as KIR2DL2/3 or KIR2DL1, which is involved in functional NK cell education [23]. Of note, peptide-specific recognition of CMV strains controls adaptive NK cells, which, in part, explains why all CMV seropositive individuals do not display this expanded memory-like NK subset [24].

In this study, we hypothesized that KIR and HLA immunogenetic markers and CMV status drive the NK cell subset distribution and that NK cell subsets do not share similar degranulation potential against leukemias, depending on the nature thereof. Thus, we carried out an in-depth investigation of the anti-leukemic potential of NK cell subsets against a panel of acute myeloid and lymphoid leukemia cell lines and primary leukemic cells, taking into account KIR and HLA genetic parameters, NK cell development stages and the CMV status of healthy blood donors.

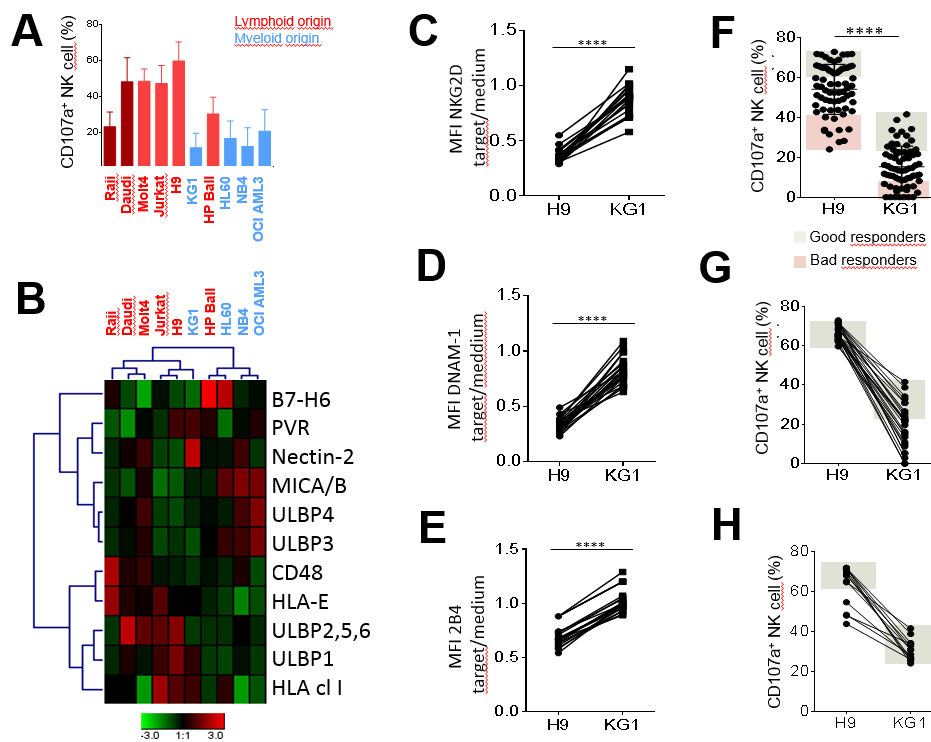
## 2. Results

### 2.1. Lymphoid Cell Lines More Strongly Stimulated NK Cell Degranulation than Myeloid Cell Lines

To explore the diversity of the anti-leukemia potential of NK cells, we initially investigated NK cell degranulation from a validation cohort of healthy blood donors ( $n = 14$ ) against a panel of myeloid and lymphoid cell lines (Figure 1A). Lymphoid cell lines, including Burkitt cell lines and acute lymphoblastic leukemia (ALL), more strongly triggered NK cell degranulation than myeloid cell lines, which mainly included acute myeloid leukemia (AML) cell lines (Figure 1A). Given the diversity of NK cell responses based on the target cell nature, we aimed to characterize the phenotype of all target cell lines for the expression of NK receptor ligands known to be involved in the modulation of NK cell functions. Thus, we determined the expression of HLA class I and HLA-E, which are ligands of inhibitor NK receptors, and ULBP1-6, MICA/B, Nectin-2 (CD112), PVR (CD155), CD48 and B7-H6, which are ligands of activating NK receptors. Hierarchical clustering analysis of ligand expression was performed with the Genesis<sup>®</sup> software, taking into account the mean fluorescence intensity (MFI) of each NK receptor ligand (Figure 1B). Two clusters of target cells can be identified according to trends based on lymphoid and myeloid origins. The first cluster, which mainly includes lymphoid cell lines (except for KG1), showed higher expression of HLA class I, HLA-E, ULBP1/2/5/6 and CD48 ligands than myeloid cell lines. The second cluster, which mainly includes myeloid cell lines (excluding HP Ball), showed higher expression of ULBP3/4, MICA/B, Nectin-2 (CD112) and PVR (CD155) ligands than lymphoid cells (Figure 1B). This dichotomy of ligand expression between myeloid and lymphoid cells leads to different receptor-ligand interactions between NK cells and their cellular targets.

To undertake our study on a broader cohort of healthy donors, we focused our investigation on H9, an acute lymphoblastic leukemia (ALL) cell line, and KG1, an acute myeloid leukemia (AML) cell line, as two representative cell lines that are differently recognized by NK cells.

According to the immunophenotypic analysis, the H9 ALL cell line expressed more ULBP2/5/6, CD48 and B7-H6 than the KG1 AML cell line, which, in contrast, expressed Nectin-2 (CD112) and MICA/B, which were slightly expressed and not expressed on the H9 cell line, respectively (Figure S1). Both H9 and KG1 target cells similarly expressed activating ULBP1 and PVR (CD155) ligands (Figure S1). The expression (MFI) of activating NKG2D (Figure 1C), DNAM-1 (Figure 1D) and 2B4 (Figure 1E) were significantly more downregulated on H9 than those on KG1-stimulated NK cells compared with steady-state. These results suggest that activating NKG2D, DNAM-1 and 2B4 receptors were potentially more engaged with their cognate ligands expressed on H9 ALL.



**Figure 1.** Inter- and intra-individual heterogeneity of NK cell responses against a panel of myeloid and lymphoid target cells. **(A)** Histogram outlining NK (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) cell degranulation observed after 5 h incubation in the presence of myeloid cell lines (blue bar) and lymphoid cell lines (red bar) at an effector/target ratio of 1:1 for 14 representative blood donors. Values are expressed as mean  $\pm$  SD. **(B)** Heatmap representing the relative MFI of each NK ligand expression on target cell surfaces using Genesis software. Relative MFI represents the ratio of the MFI of each NK ligand on the MFI of isotype control of each mAb. Red and green indicate high expression levels and low expression levels, respectively. The modulation of NKG2D **(C)**, DNAM-1 **(D)** and 2B4 **(E)** expression observed after NK cell stimulation in the presence of H9 ALL and KG1 AML cell lines at an effector/target ratio 1:1 from 24 representative healthy blood donors by MFC. **(F)** NK cell degranulation evaluated against H9 ALL and KG1 AML cell lines from a broader cohort of 68 blood donors. Good and bad responders are located in gray and pink zones, respectively. **(G)** NK cell degranulation against H9 and KG1 cell lines is represented for good responders identified against H9. **(H)** NK cell degranulation against H9 and KG1 cell lines is represented for good responders identified against KG1. \*\*\*\* Indicates  $p < 0.0001$  (Student's *t*-test).

## 2.2. Inter-Individual Diversity of NK Cell Responses against Leukemia Target Cells

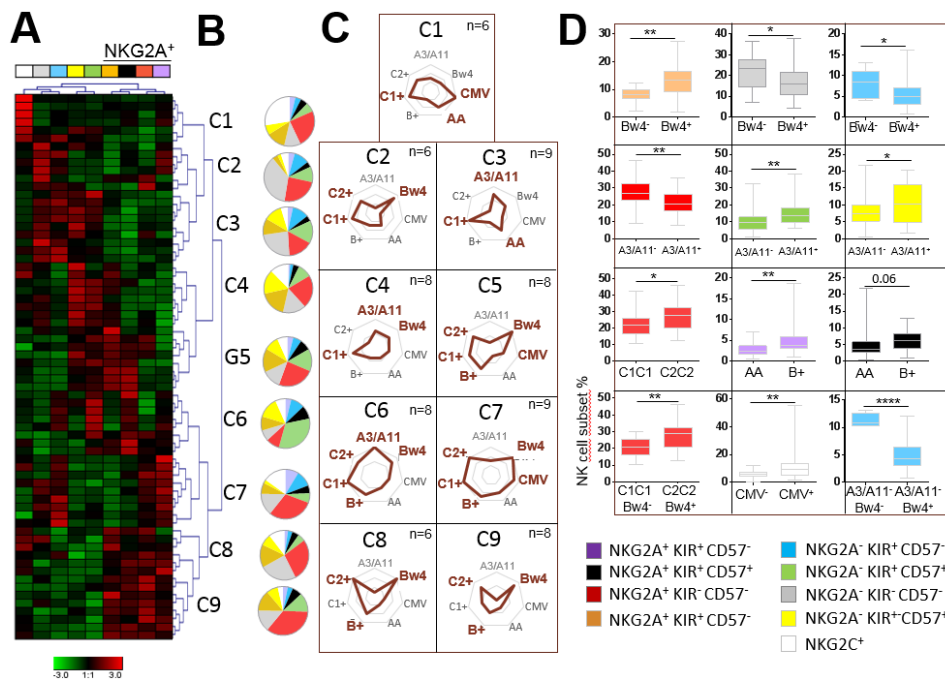
We further addressed the inter-individual diversity of NK cell responses from a broader cohort of 68 healthy blood donors. We showed that the H9 ALL cell line stimulated NK cell degranulation to a significantly greater extent than the KG1 AML cell line, highlighting bad and good responders against both target cell lines (Figure 1F). In addition, the best responders against H9 were not systematically good responders against KG1 (Figure 1G), and inversely, good responders against KG1 were not all good responders against H9 (Figure 1H). Our results show a broad inter-individual diversity of NK cell responses against leukemic cells. Moreover, NK cell responsiveness was dependent on the nature of leukemic cells, suggesting that different NK cell subsets are engaged depending on the nature of leukemic cells. These observations led us to explore the intra-individual diversity of NK cell responses.

## 2.3. The Significant Impact of Immunogenetic HLA/KIR Polymorphisms and CMV Status on the Phenotypic Structuration of the NK Cell Repertoire

To further investigate the intra-individual diversity of NK cell responses, we refined our investigations to take into account immunogenetic KIR/HLA polymorphisms and CMV status.

According to the NK cell differentiation model described by Bjorkstrom et al. [16], we defined NK cell subsets on the basis of NK cell maturation stages [18] by targeting NKG2A, KIR2DL2/3 (denoted hereon as KIR), NKG2C and CD57 markers (Figure S2A), and we determined the frequency of each NK cell subset by multiparameter flow cytometry (MFC) from 68 healthy blood donors, who were divided according to KIR and HLA genetics and CMV status (Figure S2B). We found that NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> and NKG2A<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells were the two main subsets in terms of frequency, while NK cell subsets expressing KIR and CD57 markers were represented in low proportions (Figure S2C).

Hierarchical clustering analysis of the NK cell repertoire by Genesis<sup>®</sup> software led us to identify nine clusters of individuals based on NK cell frequencies (Figure 2A). Each cluster was characterized by a specific NK cell repertoire (Figure 2B) linked to a particular genetic KIR and HLA profile and CMV status (Figure 2C). Thus, B<sup>+</sup> KIR genotypes favored a higher frequency of NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> NK cell subsets compared with AA KIR genotypes; the A3/A11 environment favored higher frequencies of mature CD57<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup> NK cells; C2C2 and Bw4 environments favored a higher frequency NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells, and a higher frequency of NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup> NK cells was favored in the Bw4 environment (Figure 2D). In accordance with the literature, the NKG2C<sup>+</sup> NK cell frequency was significantly higher in CMV<sup>+</sup> individuals (Figure 2D). Overall, we observed that each NK cell subset was favored by a specific KIR genotype and/or HLA class I environment or by the presence of CMV.



**Figure 2.** Impact of the immunogenetic KIR/HLA profile and CMV status on the structuration of the NK cell repertoire. (A) Heatmap (Genesis<sup>®</sup>) clustering of healthy blood donors (n = 68) from the frequency of nine NK cell subsets targeted by flow cytometry based on NKG2A, KIR, NKG2C and CD57 markers. Each column is dedicated to a defined NK cell subset. Red and green indicate the high and low frequencies of the NK cell subsets, respectively. C1–C9 indicate the nine clusters of individuals. (B) Charts representing frequencies of nine investigated NK cell subsets for each cluster. (C) Radar charts indicating the number of blood donors for each characteristic (KIR AA or B<sup>+</sup> genotype, A3/A11, Bw4, C1 and C2 environment and CMV status) per cluster. The KIR/HLA immunogenetic profiles and CMV status impacting each cluster are indicated in brown. (D) Whisker graphs of NK cell subset frequencies according to A3/A11, Bw4, C1, and C2 environments, KIR genotype (AA or B<sup>+</sup>) and CMV status investigated in 68 individuals. \* Indicates *p* < 0.05, \*\* indicates *p* < 0.01 and \*\*\*\* indicates *p* < 0.0001.

#### 2.4. NKG2A<sup>+</sup> NK Cell Subsets are the Most Efficient against ALL Target Cells

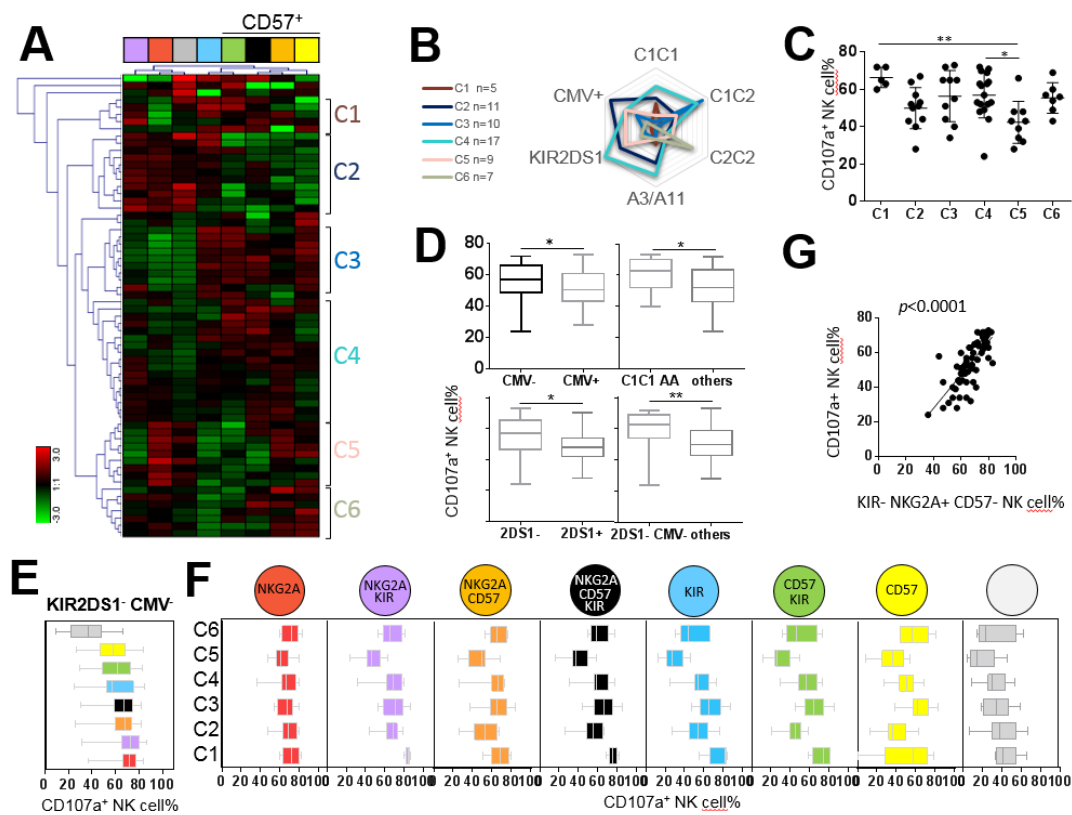
We carried out an in-depth investigation of the degranulation of NK cell subsets from 68 healthy blood donors against the H9 ALL cell line. Because all CMV<sup>+</sup> individuals (n = 32) from our cohort of healthy blood donors did not necessarily exhibit the amplification of NKG2C<sup>+</sup> NK cells, we excluded the NKG2C marker in this part of the study to define eight NK cell subsets on the basis of NKG2A, KIR and CD57 expression. Hierarchical clustering analysis (Genesis<sup>®</sup>) of the degranulation of eight NK cell subsets stimulated with the H9 cell line defined six clusters of individuals (Figure 3A). The superposition of all clusters depending on the immunogenetic KIR and HLA environment and CMV status highlighted specific profiles (Figure 3B). We observed a disparity of whole NK cell degranulation of different clusters, outlining good (C1, C3 and C4 clusters) and bad responders (C2, C5 and C6 clusters), with a significant difference between C1 and C5 (66.40% versus 42.33%,  $p < 0.01$ ) and C4 and C5 clusters (56.82% versus 42.33%,  $p < 0.05$ ) (Figure 3C). Overall, we observed that CMV<sup>-</sup> KIR2DS1<sup>-</sup> individuals were the best responders against the H9 ALL cell line (59.35% versus 50.12%,  $p = 0.0047$ ) (Figure 3D). The shared attribute among the most effective NK cell subset against the H9 cell was NKG2A expression (Figure 3E). Interestingly, the degranulation of each NK cell subset in each individual cluster showed that the NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subset was efficient in all clusters (Figure 3F). Of note, NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell frequency significantly correlated with the degranulation of whole NK cells ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3G). This result is in accordance with the prevalence of the NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subset in the NK cell repertoire.

We further investigated the degranulation potential of NK cell subsets against COE-B primary ALL blasts isolated from a patient. Hierarchical clustering analysis of the degranulation of NK cell subsets from 51 healthy blood donors determined six clusters of individuals (Figure S3A). We observed a disparity of whole NK cell degranulation of different clusters (Figure S3B). The best NK responders were C2C2 individuals (24.90% C1C1, 23.11% C1C2 and 34.06% C2C2 individuals;  $p = 0.014$  between C1C1 and C2C2 individuals,  $p = 0.004$  between C1C2 and C2C2 individuals) (Figure S3C). As observed with the H9 ALL cell line, the most effective NK cell subsets against primary ALL blasts expressed NKG2A (Figure S3D). NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell frequency significantly correlated with the degranulation of the whole NK cells ( $p < 0.0001$ ) (Figure S3E). Overall, the best NK responders present a C2C2 environment that favors a high frequency of NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells, the most efficient NK cells against ALL blasts.

#### 2.5. KIR<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> NK Cell Subsets are the Most Efficient against AML Target Cells

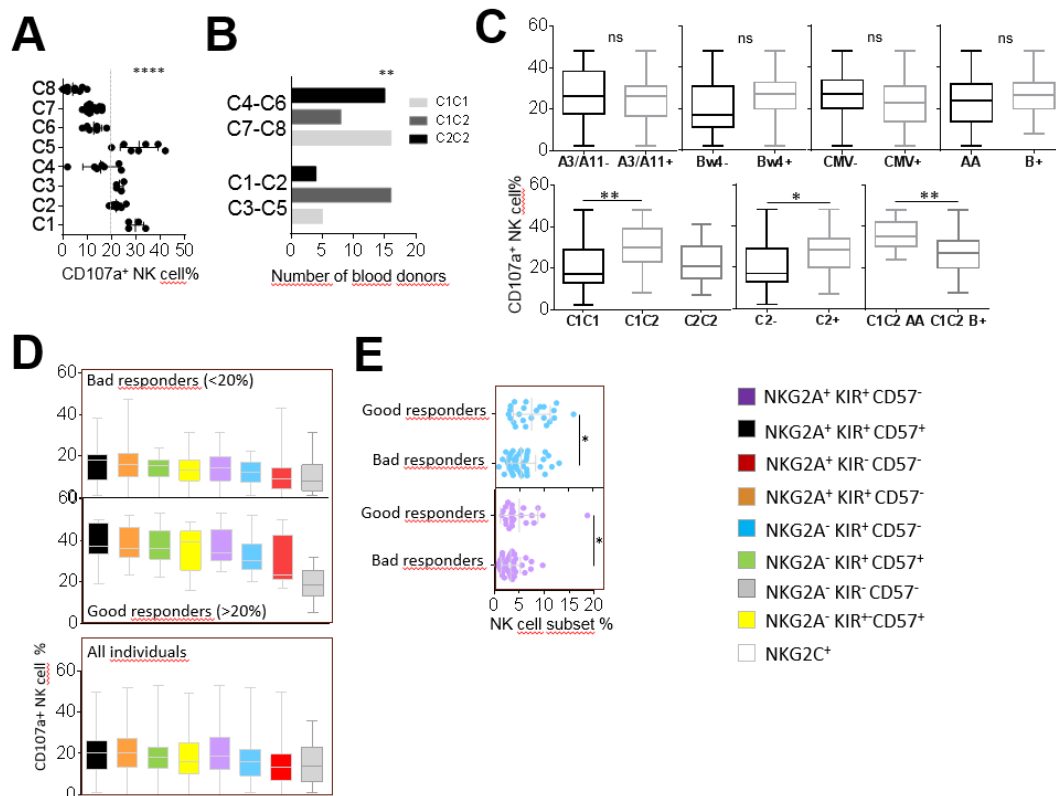
In parallel to our investigations on NK cell responses against ALL targets, we carried out an in-depth evaluation of these responses against the AML KG1 cell line and two primary AML blasts from the cohort of 68 healthy blood donors. After KG1 stimulation, we determined eight individual clusters based on the degranulation of the eight studied NK cell subsets using hierarchical clustering analysis (data not shown). C1, C2, C3 and C5 individual clusters presented a strong whole NK cell degranulation in contrast to C4, C6, C7 and C8 individual clusters ( $p < 0.0001$ ) (Figure 4A). Interestingly, good responders (C1, C2, C3 and C5) were predominantly C1C2 ( $p = 0.0021$ ) in contrast to bad responders (C4, C6, C7 and C8) (Figure 4B). We did not observe an impact of the KIR (AA versus B+) genotype, HLA-A3/A11 and HLA-Bw4 environments or CMV status on whole NK cell degranulation against the KG1 AML cell line (Figure 4C). However, in accordance with the profile of the best NK responders, C1C2 individuals were better responders against KG1 compared with C1C1 individuals (30.74% versus 20.47%,  $p = 0.0038$ ) (Figure 4C). Moreover, among C1C2 individuals, AA KIR genotyped individuals were significantly better responders than B+ KIR genotyped individuals (36.08% versus 26.47%,  $p = 0.0082$ ) (Figure 4C). The most effective NK cell subsets against the KG1 AML cell line shared the CD57 marker, as observed in good (whole NK cell degranulation > 20%) and bad responders (whole NK cell degranulation < 20%) and all studied donors (Figure 4D). In focusing on the frequency of studied NK cell subsets, a significant difference was observed between good and bad responders for the KIR<sup>+</sup> NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subset (7.45% versus 5.29%,  $p = 0.0139$ ) and KIR<sup>+</sup> NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>

(4.99% versus 3.29,  $p = 0.0198$ ) (Figure 4E). These results suggest a functional advantage of KIR<sup>+</sup> NK cells against the KG1 cell line, even though they did not constitute the best effectors.



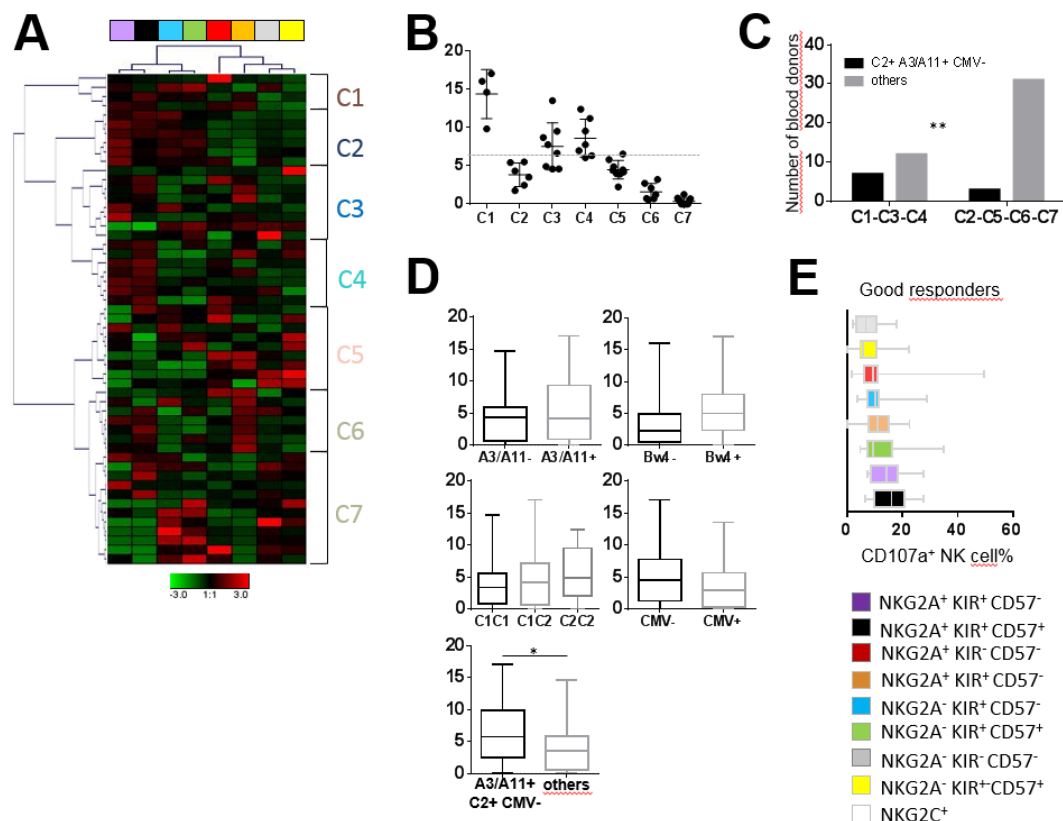
**Figure 3.** NKG2A<sup>+</sup> NK cell subsets are the most efficient against the H9 ALL cell line. (A) Heatmap (Genesis®) clustering of healthy blood donors (n = 68) from the degranulation of eight targeted NK cell subsets. NK cell subset degranulation was assessed after 5 h incubation in the presence of the H9 ALL cell line at an effector/target ratio of 1:1. Each column is dedicated to a defined NK cell subset. Red and green indicate high frequency and low frequency of NK cell degranulation, respectively. C1–C6 indicate the six clusters of individuals. (B) Radar charts indicating the number of blood donors for each characteristic (KIR AA or B<sup>+</sup> genotype, A3/A11, Bw4, C1 and C2 environment and CMV status) per cluster. (C) Whisker graphs of whole NK cell degranulation in each cluster. (D) Whisker graphs of whole NK cell degranulation according to C1C1 environment, KIR genotype (AA), KIR gene content (2DS1<sup>+</sup> or 2DS1<sup>-</sup>) and CMV status (CMV<sup>+</sup> or CMV<sup>-</sup>) investigated in 68 individuals. (E) Whisker graphs illustrating the degranulation of the eight investigated NK cell subsets from the best responders, KIR2DS1<sup>-</sup> CMV<sup>-</sup>, against the H9 ALL cell line. NK cell subsets are classified from the highest to the lowest efficiency. NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells represented the most efficient NK cell subset against the H9 ALL cell line. (F) Whisker graphs of NK cell degranulation for each investigated NK cell subset for all clusters. (G) Correlation between NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell frequencies and whole NK cell degranulation percentage from 68 individuals. *p*-values are indicated only where a significant *p*-value was obtained ( $p < 0.05$ ). \* Indicates  $p < 0.05$ , \*\* indicates  $p < 0.01$ . Spearman’s rank correlation coefficients were calculated, and *p*-values of  $p < 0.0001$  were obtained.





**Figure 4.** CD57<sup>+</sup> NK cell subsets are the most efficient against the KG1 AML cell line. (A) Dot plots illustrating the whole NK cell degranulation of eight clusters of individuals. (B) Histograms indicating the number of individuals according to HLA-C environment (C1C1, C1C2 and C2C2) for good (C1, C2, C3 and C5) and bad (C4, C6, C7 and C8) responders. (C) Whisker graphs representing whole NK cell degranulation according to A3/A11, Bw4, C1, C2 environments, KIR genotype (AA or B+) and CMV status investigated in 68 individuals. (D) Whisker graphs illustrating the degranulation frequency of eight NK cell subsets against the KG1 AML cell line from bad and good responders and from all individuals (n = 68). NK cell subsets are classified from the highest to the lowest efficiency. (E) Dot plots illustrating the NK cell frequency of NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> (blue) and NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> (purple) NK cell subsets for bad and good responders. *p*-values are indicated only where a significant *p*-value was obtained (*p* < 0.05). \* Indicates *p* < 0.05, \*\* indicates *p* < 0.01, \*\*\*\* indicates *p* < 0.0001.

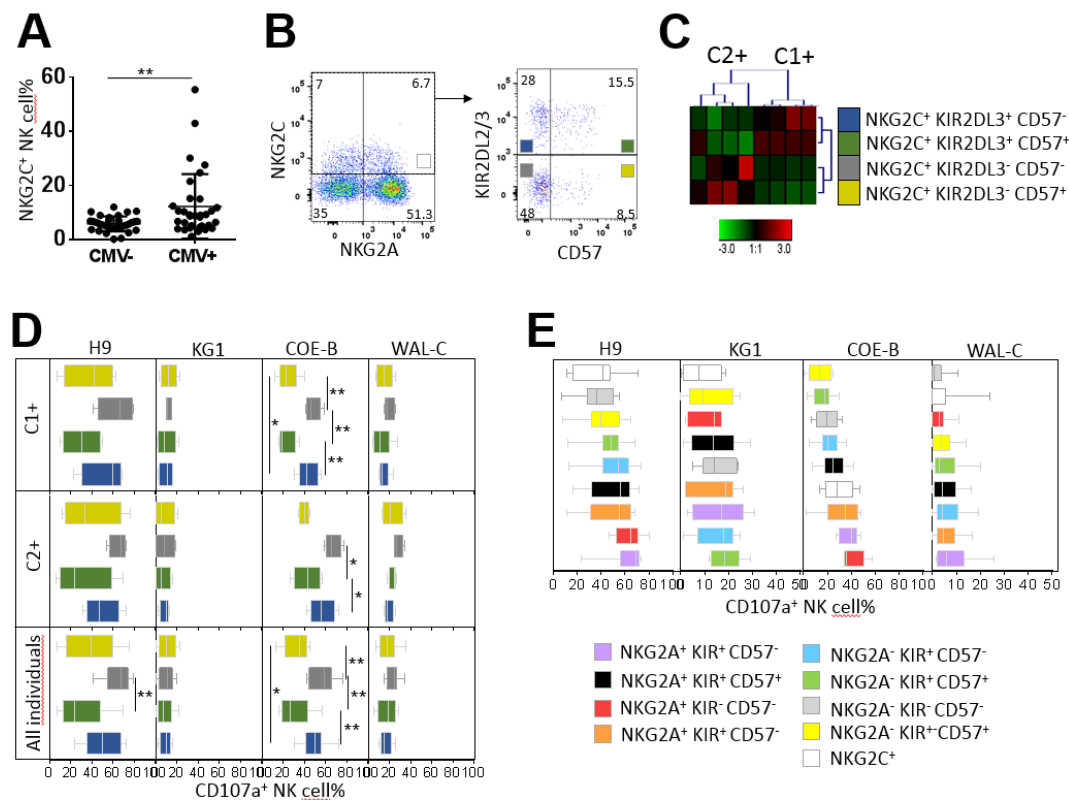
Moreover, hierarchical clustering analysis of the degranulation of the eight NK cell subsets against two AML blasts (WAL-C and JAI-S) led us to identify seven clusters of individuals, as illustrated for the most representative AML blasts (WAL-C) in Figure 5A. The comparison of whole NK cell degranulation against primary AML blasts among these seven clusters revealed bad (C2, C5, C6, C7) and good (C1, C3, C4) responders (Figure 5B). The analysis of the immunogenic KIR/HLA profile of bad and good responders indicated that the best responders were significantly more likely to be A3/A11<sup>+</sup>C2<sup>+</sup> CMV<sup>-</sup> than their bad counterparts (*p* = 0.024) (Figure 5C). These results were confirmed for all individuals (6.62% versus 3.92%, *p* = 0.033) (Figure 5D). The most effective NK cell subsets against primary AML cells expressed KIR (Figure 5E). NKG2A<sup>+</sup> CD57<sup>+/-</sup> KIR<sup>+</sup> cell subsets constituted the main effective NK cells against primary AML targets, in accordance with results observed against the AML KG1 cell line. Efficient NK cell subsets against AML targets were not well represented in the NK cell repertoire, explaining the low degranulation of whole NK cells observed against AML. In contrast, in terms of frequency, the most predominant NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> and NKG2A<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subsets harbored very low degranulation against AML cells (Figure 5E).



**Figure 5.** KIR<sup>+</sup> NK cell subsets are the most efficient against primary AML blasts. (A) Heatmap (Genesis<sup>®</sup>) clustering of healthy blood donors (n = 51) from the degranulation of eight targeted NK cell subsets. NK cell subset degranulation was assessed after 5 h incubation in the presence of primary AML target cells at an effector/target ratio of 1:1. Each column is dedicated to a defined NK cell subset. Red and green indicate high frequency and low frequency of NK cell degranulation, respectively. C1–C7 indicate the seven clusters of individuals. (B) Dot plots illustrating whole NK cell degranulation of blood donors clustered from C1 to C7. (C) Histograms illustrating the number of individuals according to A3/A11, C2 environment and CMV for bad (C2, C5, C6 and C7) and good (C1, C3 and C4) responders. (D) Whisker graphs of whole NK cell degranulation according to HLA-Bw4, A3/A11, C1 and C2 environments and CMV status in 51 individuals. (E) Whisker graphs of the degranulation frequency of the eight investigated NK cell subsets against primary AML target cells for the good (C1, C3 and C4) responders. NK cell subsets are classified from the highest to the lowest efficiency. *p*-values are indicated only where a significant *p*-value was obtained (*p* < 0.05). \* Indicates *p* < 0.05, \*\* indicates *p* < 0.01.

## 2.6. Hyporesponsiveness of CMV-Driven NKG2C<sup>+</sup> NK Cell Subsets against Leukemia Target Cells

For the study of NKG2C<sup>+</sup> NK cell functionality, we focused only on CMV<sup>+</sup> individuals with the amplification of NKG2C<sup>+</sup> NK cells (higher than 12.28%, corresponding to the mean value). From the 68 healthy blood donors investigated in this study, 32 individuals were CMV seropositive, and only 8 CMV<sup>+</sup> individuals presented an amplification of NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets (Figure 6A). From these eight CMV<sup>+</sup> individuals, two clusters of individuals were defined by hierarchical clustering analysis of the frequency of four NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets based on NKG2A, KIR and CD57 marker expression (Figure 6B,C). The first cluster harbored C1<sup>+</sup> individuals (three C1C1 individuals and one C1C2 individual) with an amplification of the NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>+/-</sup> NK cell subsets (Figure 6C). In contrast, the second cluster harbored C2<sup>+</sup> individuals (three C2C2 individuals and one C1C2 individual) with an amplification of the NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>+/-</sup> NK cell subsets (Figure 6C), in accordance with the preferential amplification of educated NK cells via inhibitory KIR [23].



**Figure 6.** Degranulation potential of CMV-driven NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets against leukemia target cells. (A) Dot plots of NKG2C<sup>+</sup> NK cell frequencies in CMV<sup>-</sup> (n = 32) and CMV<sup>+</sup> (n = 36) individuals. (B) Density plots illustrating the cell strategy to target NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets expressing or not expressing KIR2DL2/3 and CD57. (C) Heatmap (Genesis®) clustering of CMV<sup>+</sup> blood donors with NKG2C NK cell amplification (n = 8) from the frequencies of the four NKG2C<sup>+</sup> (KIR<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup>, KIR<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>, KIR<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> and KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup>) NK cell subsets. Each column is dedicated to a defined NK cell subset. The color of each square reflects the percentage of the corresponding subset. Red and green indicate high and low frequencies of NK cell subsets, respectively. (D) Whisker graphs of the degranulation of the four NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets against ALL H9 and AML KG1 cell lines, primary ALL COE-B and AML WAL-C blasts for C1<sup>+</sup> (n = 4), C2<sup>+</sup> (n = 4) and all individuals (n = 8). (E) Whisker graphs of degranulation frequency of the nine investigated NK cell subsets from CMV<sup>+</sup> individuals (n = 9) with amplification of the NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets against H9, KG1, CO-E and WAL-C. NK cell subsets are classified from the highest to the lowest efficiency. *p*-values are indicated only where a significant *p*-value was obtained (*p* < 0.05). \* Indicates *p* < 0.05 and \*\* indicates *p* < 0.01.

The degranulation of NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subsets against ALL cells (H9 cell line and primary ALL blasts) was significantly higher than that of NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> NK cell subsets (64.46% versus 30.75%, *p* = 0.0084, against H9, and 56.53% versus 31.87%, *p* = 0.0011, for COE-B blasts), regardless of the HLA-C environment of NK cells (C1<sup>+</sup> or C2<sup>+</sup>) (Figure 6D). Of note, the C2<sup>+</sup> NK responses of all NK cell subsets against ALL blasts were higher than the C1<sup>+</sup> counterpart, in accordance with our previous results obtained from the whole cohort. In contrast, the degranulation of all NKG2C<sup>+</sup> NK subsets was low against the AML KG1 cell line and blasts. Overall, we observed that NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subsets (and probably KIR2DL1<sup>+</sup>), amplified in C2<sup>+</sup> CMV<sup>+</sup> individuals, were the most effective subsets against ALL H9 and primary cells, as well as against primary AML targets.

Several research groups consider memory-like NKG2C<sup>+</sup> NK cells to be attractive anti-leukemia candidates for immunotherapy [25]. Thus, we further examined the degranulation potential of memory-like NKG2C<sup>+</sup> NK cells in these eight CMV<sup>+</sup> individuals. We compared that to the



degranulation of eight NK cell subsets defined on the basis of NKG2A, KIR and CD57 markers. The degranulation of NKG2C<sup>+</sup> NK cells was low against H9, KG1 and primary AML blasts (Figure 6E). Although the whole NKG2C<sup>+</sup> NK cell population exhibited better responses against primary ALL blasts (Figure 6E), this population seems to be not as attractive for harnessing anti-leukemia immunity.

### 3. Discussion

On the basis of clinical data, NK cells appear to play a crucial role in the eradication of acute leukemia [26–28]. However, the ability of NK cells to mediate a response against tumor cells such as leukemia cells depends on the presence of ligands that are recognized by NK receptors on tumor cells [12,13,26,29]. In this study, a broad diversity of NK cell responses was observed in vitro against myeloid and lymphoid cell lines. Most of the lymphoid cell lines triggered stronger NK cell responses than myeloid cell lines. Furthermore, a broad inter-individual disparity of NK cell responses was observed against the same leukemic target, highlighting bad and good NK responders. In addition, the best responders against one target were not systematically good responders against another. These results showed that the diversity of NK cell responses against leukemic cells were inter- and intra-individual. On the basis of NKG2A, KIR2DL2/3, CD57 and NKG2C markers, we determined different clusters of individuals who shared a common NK cell repertoire linked to the immunogenetic KIR/HLA profile and CMV status. We found that the NKG2A<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subset was predominantly represented in the majority of NK cell repertoires and more significantly in C2C2 Bw4<sup>+</sup> genotyped individuals. Of note, C2C2 individuals are more represented in the African population (up to 40%) than Caucasian (20%) and Asian (less than 5%) populations. HLA-C of the C2 group and HLA-Bw4 ligands contribute to the education and maturation of KIR2DL1 and KIR3DL1 NK cells, respectively [4]. As KIR2DL1 and KIR3DL1 expression were not investigated in this study, it is possible that a proportion of NKG2A<sup>+</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells express KIR2DL1 and KIR3DL1 receptors. In contrast, NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup>, NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> and NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> NK cell subsets were represented in low frequencies in NK cell repertoires. NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells were favored in A3/A11<sup>-</sup>/Bw4<sup>-</sup> genotyped individuals. No significant difference between C1 and C2 ligands was observed in the frequency of this KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell subset. Thus, the absence of A3/A11 and Bw4 ligands suggests that C1 or C2 ligands favored the education and development of the NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>-</sup> NK cell subset since it has been reported that the KIR2DL3 receptor can strongly recognize the C1 ligand and recognizes the C2 ligand with low affinity [30]. NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> and NKG2A<sup>-</sup> KIR2DL2/3<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> NK cell subsets were particularly favored in A3/A11<sup>+</sup> genotyped individuals. As A3/A11 HLA class I molecules, originally identified as ligands for the KIR3DL2 inhibitory receptor [31], participate in the development of KIR3DL2<sup>+</sup> NK cells, we can speculate that a proportion of NKG2A<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup> NK cells express KIR3DL2. Our data are placed in a broad body of literature on the structuration of the NK cell repertoire [30,32–37], with the notably recent study of Pfeifferle et al., showing a well-maintained NK cell repertoire over time [18]. Indeed, the intra-lineage plasticity maintains phenotypic and functional NK cell homeostasis, and the acquired phenotype determines functional potential in NK cells. Because the KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cell represents the most prevalent NK cell subset in the KIR NK cell repertoire, we focused only on the KIR2DL2/3 inhibitory receptor in this study. However, further investigations are needed to evaluate the role of other inhibitory KIR receptors, such as KIR2DL1, KIR3DL1 and KIR3DL2, in anti-leukemia NK cell responses, particularly against AML.

An in-depth functional analysis identified NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells as the most effective NK cell subsets against the ALL H9 cell line and ALL blasts, as previously reported [38]. The fact that NKG2A<sup>+</sup> NK cells were represented at a high frequency in the NK cell repertoire explains the strong response of these subsets against ALL targets. Moreover, Forslun et al. reported that NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells exhibit more dynamic migration, which is associated with increased target cell conjugation and a higher probability of killing compared with NKG2A<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells. The authors suggested that the ability of NKG2A<sup>+</sup> NK cells to form more conjugates resulted in

their increased motility, leading to more encounters with target cells [39]. In our study, ALL targets expressed HLA-E molecules. We can speculate that this inhibitory effect of NKG2A is probably counterbalanced by the strong activating signals mediated through the interaction of NKG2D and DNAM-1 and their cognate ligands expressed on ALL targets. Thus, the cellular mechanism behind the efficient response mediated by these NK cells expressing NKG2A, particularly the response against lymphoid cells, remains unclear. Of note, good responders against ALL targets were either KIR2DS1<sup>-</sup> or C2C2 individuals, the latter harboring a higher frequency of NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells. These parameters are important, as they can help in choosing donors of HSC that harbor more efficient and abundant NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells to treat acute lymphoblastic leukemia.

In the context of haploidentical HSCT, numerous studies have reported that NK cell-mediated alloreactivity is induced by donor KIR<sup>+</sup> NK cells [40–42]. In a previous study, we documented that KIR/HLA incompatibilities were associated with the more differentiated phenotype of the NK cell repertoire at the time of GvHD, limiting the incidence of relapse after haploidentical HSCT [14]. In line with these previous studies, we report here that more differentiated NK cells expressing KIR and CD57 markers were the most effective NK cells against AML targets, including primary AML blasts. Although KIR<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> NK cells represented the most effective NK cells against AML targets, the low frequency of these NK cell subsets explains why AML targets did not trigger whole NK cell degranulation. Conversely, NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells harbor a low responsiveness against AML targets. This observation is in line with the study of Nguyen et al., who showed that increased frequency of immature NKG2A<sup>+</sup> NK cells during NK cell repertoire reconstitution after HSCT did not produce a GvL effect in AML patients [43]. In contrast, KIR<sup>+</sup> NK cells with the CD57 phenotype display increased functional potential associated with the increased transcription of genes involved in adhesion and immune synapse [18]. Altogether, these data suggest that KIR<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> NK cell subsets may be more adapted to interact with and eliminate AML target cells. Among different therapeutic approaches developed to enhance NK cell cytotoxicity against cancer [44], the expansion of allogeneic NK cells constitutes an appealing approach [45]. Thus, the expansion of selected NK cells based on KIR and CD57 expression should constitute promising cell immunotherapy after HSCT to improve the GvL effect in AML patients. Moreover, new insights open avenues in NK cell-based immunotherapy, in particular, chimeric activating receptor (CAR) NK cells [46]. We can imagine genetically engineering the most efficient KIR<sup>+</sup> and CD57<sup>+</sup> NK cell subsets against AML to harness their ability to kill these targets.

Furthermore, we documented the massive amplification of adaptive and more differentiated NKG2C<sup>+</sup> NK cells in seropositive CMV individuals, consistent with previous reports [20–23]. NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL3<sup>+</sup> CD57<sup>+/-</sup> cells were preferentially expanded in C1<sup>+</sup> individuals, whereas NKG2C<sup>+</sup> KIR2DL3<sup>-</sup> CD57<sup>+/-</sup> NK cells were preferentially expanded in C2<sup>+</sup> individuals, demonstrating the important role of the HLA-C environment in the expansion of such NK cell subsets, as previously observed [20,23,47,48]. Lopez-Vergès et al., reported that during CMV infection, there is a unique expansion of NKG2C<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> NK cells, and they proposed that CD57 might provide a marker of “memory” NK cells in response to CMV infection [49]. Our study identified expanded NKG2C<sup>+</sup> NK cells with and without CD57 expression, suggesting the presence of phenotypic intra-individual diversity of the NKG2C<sup>+</sup> NK cell repertoire in CMV seropositive individuals. Functionally, adaptive NKG2C<sup>+</sup> NK cell responses were more diverse than initially expected [40]. Interestingly, we noted low responsiveness of the well-described adaptive and memory-like NKG2C<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> NK cells against all leukemia targets, in contrast to other NKG2C<sup>+</sup> NK cell subsets. Our study identified NKG2C<sup>+</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> NK cells as the most effective NKG2C<sup>+</sup> NK cell subset. Of note, taking into account all NK cell subsets investigated on the basis of KIR, CD57 and NKG2A expression, the NKG2C<sup>+</sup> NK cell subset was among the least efficient NK cell subset against all leukemia targets. Merino et al. recently showed that chronically stimulated adaptive NK cells were dysfunctional when challenged with tumor cells [50]. Although this NK subset displays attractive characteristics, we observed limited anti-tumor efficiency.

In conclusion, our data may have evident clinical implications, as they can be used to optimize the selection of HSC donors on the basis of immunogenetic KIR and HLA for ALL patients and identify the best NK cell subsets in immunotherapy to cure AML patients.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs), Cell Lines and Primary Target Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously described [32]. All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France), and informed consent was given by all donors. A panel of myeloid and lymphoid cell lines (n = 10) and primary leukemic cells (n = 2) were used to investigate the potential of NK cell degranulation. Cell lines included acute myeloid leukemia (AML) cell lines (n = 4): HL60, KG1, NB-4 and OCI-AML3; T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cell lines (n = 4): Jurkat, Molt-4, HP B-ALL and H9; and Burkitt Lymphoma cell lines (n = 2): Raji and Daudi. KG1, NB4 and OCI-AML3 cell lines were generously supplied by Dr Nicolas Dulphy (UMRS-1160 INSERM, Paris, France). Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing glutamine (Gibco) and penicillin-streptomycin (Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines. Blood samples from two patients with acute leukemia were used to isolate leukemic blasts by the same method used for PBMC isolation. All patients gave their informed consent to physicians from the clinical hematology department of the Nantes University Hospital (Pr. Patrice Chevallier). Primary leukemic cells included one acute myeloid leukemia (AML) target (blasts > 90%) and one B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) target (blasts > 95%) named WAL-C and COE-B, respectively. All leukemic cells (lines and blasts) were HLA typed. A declaration of preparation and conservation of these biocollections (DC-2014-2340) has been provided to French Research Minister and has received approval from the IRB (2015-DC-1).

### 4.2. HLA and KIR Genotyping

HLA class I allele assignment and KIR gene content typing were performed as previously described [14] for all volunteer blood donors (n = 68). KIR genetic typing was performed on all donor samples using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described using specific KIR primers provided by Dr. Ketevan Gendzekhadze (City of Hope, Duarte, CA, USA) [51]. More details are provided in Appendix A.

### 4.3. HCMV Serology

CMV serology was carried out by the technical platform of the Virology Department of Nantes University Hospital (Pr. Berthe-Marie Imbert and Dr. Céline Bressollette) using plasmas from donor biocollections. The CMV serological status of donors was determined by the detection of IgG2 anti-CMV antibodies in plasmas using the LIAISON chemiluminescent immune test (DiaSorin, Saluggia, Italie) according to the manufacturer's instructions [23]. Our cohort of blood donors comprised 35 seronegative CMV individuals (CMV<sup>-</sup>) and 33 seropositive CMV individuals (CMV<sup>+</sup>).

### 4.4. Phenotypic Analysis of NK Cells, Cell Lines and Primary Leukemic Cells by Flow Cytometry

High-resolution immunophenotyping of NK cells, cell lines and primary leukemic cells was determined by eight-color multiparameter flow cytometry (MFC) using the mouse anti-human mAbs presented in Appendix A.

### 4.5. CD107a Mobilization Assay Detected by Flow Cytometry

NK cells from healthy blood donors were pre-incubated with anti-CD107a-BV421 (H4A3, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). CD107a is a sensitive marker for the identification of NK cell activity [52] and can be used for isolation of tumor-cytolytic cells [53]. NK cell degranulation

against myeloid and lymphoid cell lines was assessed after incubation for 5 h alone (negative control) or with different target cells (E/T ratio = 1:1 and  $2.5 \times 10^6$  cells/well) in bottom 96 well plate with brefeldin A (Sigma, Lezennes, France) at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the last 4 h. An initial cell surface staining was used to target NK cell subsets by MFC using the following mouse-Abs combination: CD57-FITC, NKG2C-PE, NKG2D-PerCP-Cy5.5, NKG2A-PC7, KIR2DL2/3-APC, CD56-APC-Cy7 and CD3-BV510. A second cell surface staining was used to analyze NK cell activating receptor expression by MFC using the following mouse-Abs combination: 2B4-FITC, NKp30-PE, DNAM-1-PerCP-Cy5.5, NKp44-PC7 and NKp46-APC. As some primary leukemic cells expressed CD56, the NKp46 marker was used to target NK cells in the degranulation assay by MFC using the following mouse-Abs combination: NKG2A-FITC, NKG2C-PE, KIR2DL2/3-PE-Cy5.5, CD57-PC7, KIR2DL2/3-APC and NKp46-APC. All flow cytometry data were collected using a FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed with Flowjo™ 10.6 software (BD Biosciences).

#### 4.6. Hierarchical Clustering Analysis of NK Cell Phenotype and Degranulation

The hierarchical clustering of investigated NK cell subsets was performed following a complete linkage using the Genesis software [54]. The software is available at [www.genome.tugraz.at](http://www.genome.tugraz.at).

#### 4.7. Statistical Analyses

Comparisons of NK cell frequencies between two different series of individuals were performed by Student's *t*-test. Comparisons of multiple groups were performed by one-way ANOVA using the GraphPad Prism v6.0 software (Ritme informatique, Paris, France). *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

### 5. Conclusions

In conclusion, this study showed a broad inter-individual disparity of NK cell responses against the same leukemic target, highlighting bad and good NK responders. We observed that the diversity of NK cell responses against leukemic cells was inter- and intra-individual. Indeed, on the basis of NKG2A, KIR2DL2/3, CD57 and NKG2C markers, we identified different clusters of individuals who shared a common NK cell repertoire that was linked to the immunogenetic KIR/HLA profile and CMV status. On the functional side, the most effective NK cell subsets against different ALL targets expressed NKG2A and represented the most frequent subset in the NK cell repertoire. In contrast, minority CD57<sup>+</sup> or/and KIR<sup>+</sup> NK cell subsets were more efficient against AML. These results may have evident implications in oncohematology to improve both the selection of hematopoietic stem cell donors for ALL patients and immunotherapies to cure AML patients.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1927/s1>, Figure S1: Immunophenotyping of H9 ALL and KG1 AML cell lines; Figure S2: Flow cytometry strategy to determine the frequency of different NK cell subsets; Figure S3: NKG2A<sup>+</sup> NK cell subsets are the most efficient against primary ALL blasts.

**Author Contributions:** Study design: C.R. and B.C.; acquisition and analysis of flow cytometry data: D.R.M., F.D.R.d.L., G.D. and C.W.; Genesis analysis: C.R. and D.R.M.; HLA typing: A.C.; KIR genotyping: N.L., L.D., K.G. (Ketevan Gendzekhadze) and K.G. (Katia Gagne); patient's sample collection and clinical documentation: A.G., A.L., M.C.B., P.P., T.G. and P.C.; data interpretation: D.R.M., F.D.R.d.L. and C.R.; manuscript writing: D.R.M. and C.R.; English editing: K.G. (Ketevan Gendzekhadze). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Centre Pays de la Loire and by grants from International Research Group on unrelated hematopoietic stem cell Transplantation (IRGHET), la Ligue contre le Cancer (comité de Loire-Atlantique, comité de la Vienne, comité de la Vendée, comité du Morbihan et le comité des Deux Sèvres), DHU Oncogreffe, Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and l'Agence de Biomédecine (ABM). DRM is a PhD student supported by Industrial Agreement for Training Through Research Grants 2017/0850. LD is a PhD student supported by La Region Pays de la Loire (2018-09766).

**Acknowledgments:** We thank all volunteer blood donors and patients who agreed to participate in the study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## Appendix A

### A.1. HLA and KIR Genotyping

The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes was established. Donor KIR genotypes were then determined on the basis of the presence or the absence of activating KIR. Thus, a KIR AA genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as the activating KIR gene, and a KIR B+ genotype was defined by the presence of several activating KIR genes [55]. KIR ligands such as A3/A11, Bw4, C1 and C2 were defined on the basis of allelic HLA class I typing. In this study, we included 30 AA and 38 B+ KIR genotyped healthy blood donors and 24 C1C1, 26 C1C2 and 18 C2C2 genotyped individuals. Among healthy blood donors, 18 individuals harbored the KIR2DS1 gene, 53 individuals were Bw4<sup>+</sup>, and 30 individuals were A3/A11<sup>+</sup> genotyped.

### A.2. NK Cell Phenotypic Analysis by Flow Cytometry

The NK cell surface phenotype was determined by eight-color multiparameter flow cytometry (MFC) on PBMCs using the following mouse anti-human mAbs: anti-KIR2DL2/3-APC (GL183, Beckman Coulter, Immunotech, Marseilles, France), anti-CD3-BV510 (UCHT1, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), anti-CD56-APC-Cy7 (NCAM16.2, BD Biosciences), anti-NKp30-PE (Z25, Beckman Coulter, Bréa, CA, USA), anti-NKp44-PE-Cy7 (P44-8, Beckman Coulter), anti-NKp46-APC (9E2, BD Biosciences), anti-NKG2A-PE-Cy7 (Z199, Beckman Coulter), anti-NKG2C-PE (134591, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), anti-CD57-FITC (HNK-1, BD Biosciences), anti-DNAM-1-PerCP-Cy5.5 (11A8, Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-2B4-FITC (2-69) and anti-NKG2D-PerCP-Cy5.5 (1D11, Biolegend).

### A.3. Phenotypic Analysis of Cell Lines and Primary Leukemic Cells by Flow Cytometry

High-resolution immunophenotyping of cell lines and primary leukemic cells was determined by eight-color multiparameter flow cytometry (MFC) using the following mouse anti-human mAbs: anti-HLA class I-FITC (F41-IE3H1D2, EFS Nantes, France), anti-HLA-E-PE, anti-MICA/B-PE-Cy7 (6D4, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), anti-ULBP-1-FITC (170818, R&D Systems, Minneapolis, Minn, USA), anti-ULBP-2/5/6-PE (165903, R&D Systems), anti-ULBP3-PE (166510, R&D Systems), anti-ULBP-4-PE (709116, R&D Systems), anti-B7-H6-APC (875001, R&D Systems), anti-CD155 (PVR)-APC (SKII.4, Biolegend), anti-CD112 (Nectin-2)-APC (TX31, Sony), anti-PDL-1 (CD274)-PE-Cy7 (29.E2A3, Sony), anti-CD48-FITC (BJ40, Biolegend), anti-CD3-PerCP (SK7, BD Biosciences), anti-CD56-APC-Cy7 (NCAM16.2, BD Biosciences), anti-CD19-FITC (SJ25CI, BD Biosciences), anti-CD33-PerCP-Cy5.5 (WM53, Sony), anti-CD34-BV510 (581, Sony) and anti-CD45-BV421 (HI30, Sony).

## References

1. Iannello, A.; Thompson, T.W.; Ardolino, M.; Marcus, A.; Raulet, D.H. Immunosurveillance and immunotherapy of tumors by innate immune cells. *Curr. Opin. Immunol.* **2016**, *38*, 52–58. [[CrossRef](#)]
2. Waggoner, S.N.; Reighard, S.D.; Gyurova, I.E.; Cranert, S.A.; Mahl, S.E.; Karme, E.P.; McNally, J.P.; Moran, M.T.; Brooks, T.R.; Yaqoob, F.; et al. Roles of natural killer cells in antiviral immunity. *Curr. Opin. Virol.* **2016**, *16*, 15–23. [[CrossRef](#)]
3. Kärre, K. MHC gene control of the natural killer system at the level of the target and the host. *Semin. Cancer Biol.* **1991**, *2*, 295–309. [[PubMed](#)]
4. Anfossi, N.; André, P.; Guia, S.; Falk, C.S.; Roetynck, S.; Stewart, C.A.; Bresó, V.; Frassati, C.; Revirón, D.; Middleton, D.; et al. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* **2006**, *25*, 331–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Boudreau, J.E.; Hsu, K.C. Natural killer cell education in human health and disease. *Curr. Opin. Immunol.* **2018**, *50*, 102–111. [[CrossRef](#)]

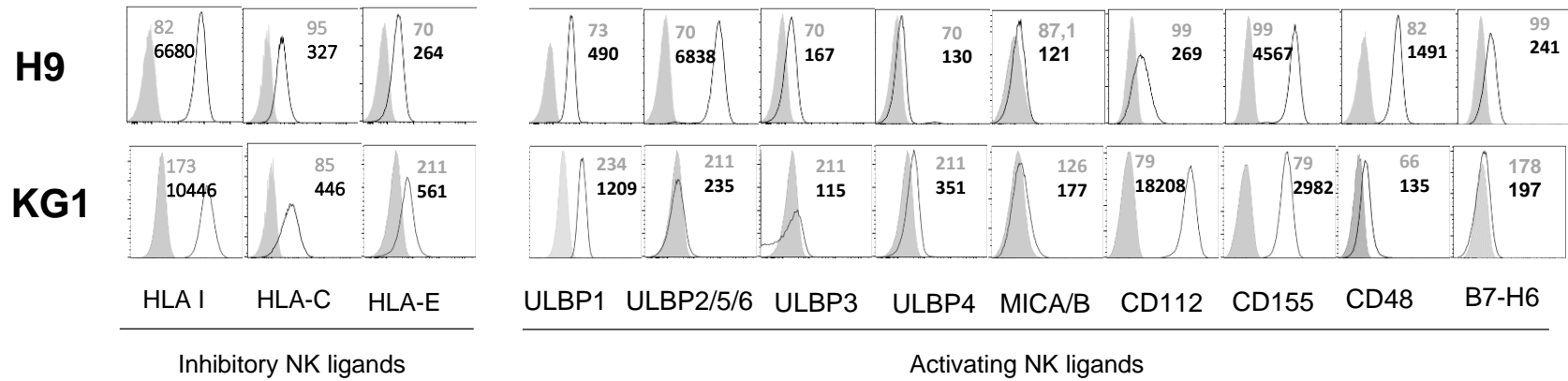
6. Braud, V.M.; Allan, D.S.J.; O'Callaghan, C.A.; Söderström, K.; D'Andrea, A.; Ogg, G.S.; Lazetic, S.; Young, N.T.; Bell, J.I.; Phillips, J.H.; et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **1998**, *391*, 795–799. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Del Zotto, G.; Marcenaro, E.; Vacca, P.; Sivori, S.; Pende, D.; Della Chiesa, M.; Moretta, F.; Ingegnere, T.; Mingari, M.C.; Moretta, A.; et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions: Markers and Function Of Human Nk Cells. *Cytometry B Clin. Cytom.* **2017**, *92*, 100–114. [[CrossRef](#)]
8. Chiossone, L.; Vienne, M.; Kerdiles, Y.M.; Vivier, E. Natural killer cell immunotherapies against cancer: Checkpoint inhibitors and more. *Semin. Immunol.* **2017**, *31*, 55–63. [[CrossRef](#)]
9. Gaggero, S.; Bruschi, M.; Petretto, A.; Parodi, M.; Del Zotto, G.; Lavarello, C.; Prato, C.; Santucci, L.; Barbuto, A.; Bottino, C.; et al. Nidogen-1 is a novel extracellular ligand for the NKP44 activating receptor. *Oncimmunology* **2018**, *7*, e1470730. [[CrossRef](#)]
10. Niehrs, A.; Garcia-Beltran, W.F.; Norman, P.J.; Watson, G.M.; Hölzemer, A.; Chapel, A.; Richert, L.; Pommerening-Röser, A.; Körner, C.; Ozawa, M.; et al. A subset of HLA-DP molecules serve as ligands for the natural cytotoxicity receptor NKP44. *Nat. Immunol.* **2019**, *20*, 1129–1137. [[CrossRef](#)]
11. Barrow, A.D.; Edeling, M.A.; Trifonov, V.; Luo, J.; Goyal, P.; Bohl, B.; Bando, J.K.; Kim, A.H.; Walker, J.; Andahazy, M.; et al. Natural Killer Cells Control Tumor Growth by Sensing a Growth Factor. *Cell* **2018**, *172*, 534–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Mastaglio, S.; Wong, E.; Perera, T.; Ripley, J.; Blombery, P.; Smyth, M.J.; Koldej, R.; Ritchie, D. Natural killer receptor ligand expression on acute myeloid leukemia impacts survival and relapse after chemotherapy. *Blood Adv.* **2018**, *2*, 335–346. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Pende, D.; Spaggiari, G.M.; Marcenaro, S.; Martini, S.; Rivera, P.; Capobianco, A.; Falco, M.; Lanino, E.; Pierri, I.; Zambello, R.; et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: Evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* **2005**, *105*, 2066–2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Willem, C.; Makanga, D.R.; Guillaume, T.; Maniangou, B.; Legrand, N.; Gagne, K.; Peterlin, P.; Garnier, A.; Béné, M.C.; Cesbron, A.; et al. Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J. Immunol.* **2019**, *202*, 2141–2152. [[CrossRef](#)]
15. Parham, P. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 1–5. [[CrossRef](#)]
16. Björkström, N.K.; Riese, P.; Heuts, F.; Andersson, S.; Fauriat, C.; Ivarsson, M.A.; Björklund, A.T.; Flodström-Tullberg, M.; Michaëlsson, J.; Rottenberg, M.E.; et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **2010**, *116*, 3853–3864. [[CrossRef](#)]
17. Nielsen, C.M.; White, M.J.; Goodier, M.R.; Riley, E.M. Functional Significance of CD57 Expression on Human NK Cells and Relevance to Disease. *Front. Immunol.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)]
18. Pfefferle, A.; Jacobs, B.; Netskar, H.; Ask, E.H.; Lorenz, S.; Clancy, T.; Goodridge, J.P.; Sohlberg, E.; Malmberg, K.-J. Intra-lineage Plasticity and Functional Reprogramming Maintain Natural Killer Cell Repertoire Diversity. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 2284–2294.e4. [[CrossRef](#)]
19. Cichocki, F.; Grzywacz, B.; Miller, J.S. Human NK Cell Development: One Road or Many? *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
20. Béziat, V.; Liu, L.L.; Malmberg, J.-A.; Ivarsson, M.A.; Sohlberg, E.; Björklund, A.T.; Retière, C.; Sverremark-Ekström, E.; Traherne, J.; Ljungman, P.; et al. NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood* **2013**, *121*, 2678–2688. [[CrossRef](#)]
21. Della Chiesa, M.; Muccio, L.; Moretta, A. CMV induces rapid NK cell maturation in HSCT recipients. *Immunol. Lett.* **2013**, *155*, 11–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Foley, B.; Cooley, S.; Verneris, M.R.; Curtsinger, J.; Luo, X.; Waller, E.K.; Anasetti, C.; Weisdorf, D.; Miller, J.S. Human Cytomegalovirus (CMV)-Induced Memory-like NKG2C<sup>+</sup> NK Cells Are Transplantable and Expand In Vivo in Response to Recipient CMV Antigen. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 5082–5088. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Djaoud, Z.; David, G.; Bressollette, C.; Willem, C.; Rettman, P.; Gagne, K.; Legrand, N.; Mehlal, S.; Cesbron, A.; Imbert-Marcille, B.-M.; et al. Amplified NKG2C<sup>+</sup> NK Cells in Cytomegalovirus (CMV) Infection Preferentially Express Killer Cell Ig-like Receptor 2DL: Functional Impact in Controlling CMV-Infected Dendritic Cells. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 2708–2716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Hammer, Q.; Rückert, T.; Borst, E.M.; Dunst, J.; Haubner, A.; Durek, P.; Heinrich, F.; Gasparoni, G.; Babic, M.; Tomic, A.; et al. Peptide-specific recognition of human cytomegalovirus strains controls adaptive natural killer cells. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 453–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fehniger, T.A.; Cooper, M.A. Harnessing NK Cell Memory for Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* **2016**, *37*, 877–888. [[CrossRef](#)]
26. Torelli, G.F.; Peragine, N.; Raponi, S.; Pagliara, D.; De Propriis, M.S.; Vitale, A.; Bertaina, A.; Barberi, W.; Moretta, L.; Basso, G.; et al. Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica* **2014**, *99*, 1248–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Locatelli, F.; Moretta, F.; Brescia, L.; Merli, P. Natural killer cells in the treatment of high-risk acute leukaemia. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 173–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sweeney, C.; Vyas, P. The Graft-Versus-Leukemia Effect in AML. *Front. Oncol.* **2019**, *9*. [[CrossRef](#)]
29. Paczulla, A.M.; Rothfelder, K.; Raffel, S.; Konantz, M.; Steinbacher, J.; Wang, H.; Tandler, C.; Mbarga, M.; Schaefer, T.; Falcone, M.; et al. Absence of NKG2D ligands defines leukaemia stem cells and mediates their immune evasion. *Nature* **2019**, *572*, 254–259. [[CrossRef](#)]
30. David, G.; Djaoud, Z.; Willem, C.; Legrand, N.; Rettman, P.; Gagne, K.; Cesbron, A.; Retière, C. Large Spectrum of HLA-C Recognition by Killer Ig-like Receptor (KIR)2DL2 and KIR2DL3 and Restricted C1 Specificity of KIR2DS2: Dominant Impact of KIR2DL2/KIR2DS2 on KIR2D NK Cell Repertoire Formation. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4778–4788. [[CrossRef](#)]
31. Hansasuta, P.; Dong, T.; Thananchai, H.; Weekes, M.; Willberg, C.; Aldemir, H.; Rowland-Jones, S.; Braud, V.M. Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 1673–1679. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Morvan, M.; David, G.; Sébille, V.; Perrin, A.; Gagne, K.; Willem, C.; Kerdudou, N.; Denis, L.; Clémenceau, B.; Folléa, G.; et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 3474–3486. [[CrossRef](#)]
33. Fauriat, C.; Andersson, S.; Björklund, A.T.; Carlsten, M.; Schaffer, M.; Björkström, N.K.; Baumann, B.C.; Michaëlsson, J.; Ljunggren, H.-G.; Malmberg, K.-J. Estimation of the Size of the Alloreactive NK Cell Repertoire: Studies in Individuals Homozygous for the Group A KIR Haplotype. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6010–6019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yu, J.; Heller, G.; Chewing, J.; Kim, S.; Yokoyama, W.M.; Hsu, K.C. Hierarchy of the Human Natural Killer Cell Response Is Determined by Class and Quantity of Inhibitory Receptors for Self-HLA-B and HLA-C Ligands. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 5977–5989. [[CrossRef](#)]
35. Hilton, H.G.; Guethlein, L.A.; Goyos, A.; Nemat-Gorgani, N.; Bushnell, D.A.; Norman, P.J.; Parham, P. Polymorphic HLA-C Receptors Balance the Functional Characteristics of KIR Haplotypes. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3160–3170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Morvan, M.; Willem, C.; Gagne, K.; Kerdudou, N.; David, G.; Sébille, V.; Folléa, G.; Bignon, J.-D.; Retière, C. Phenotypic and Functional Analyses of KIR3DL1+ and KIR3DS1+ NK Cell Subsets Demonstrate Differential Regulation by Bw4 Molecules and Induced KIR3DS1 Expression on Stimulated NK Cells. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 6727–6735. [[CrossRef](#)]
37. Goodridge, J.P.; Önfelt, B.; Malmberg, K.-J. Newtonian cell interactions shape natural killer cell education. *Immunol. Rev.* **2015**, *267*, 197–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hatton, O.; Strauss-Albee, D.M.; Zhao, N.Q.; Haggadone, M.D.; Pelpola, J.S.; Krams, S.M.; Martinez, O.M.; Blish, C.A. NKG2A-Expressing Natural Killer Cells Dominate the Response to Autologous Lymphoblastoid Cells Infected with Epstein–Barr Virus. *Front. Immunol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
39. Forslund, E.; Sohlberg, E.; Enqvist, M.; Olofsson, P.E.; Malmberg, K.-J.; Önfelt, B. Microchip-Based Single-Cell Imaging Reveals That CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> NKG2A<sup>+</sup> NK Cells Have More Dynamic Migration Associated with Increased Target Cell Conjugation and Probability of Killing Compared to CD56<sup>dim</sup> CD57<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> NKG2A<sup>-</sup> NK Cells. *J. Immunol.* **2015**, *195*, 3374–3381. [[CrossRef](#)]
40. Russo, A.; Oliveira, G.; Berglund, S.; Greco, R.; Gambacorta, V.; Cieri, N.; Toffalori, C.; Zito, L.; Lorentino, F.; Piemontese, S.; et al. NK cell recovery after haploidentical HSCT with posttransplant cyclophosphamide: Dynamics and clinical implications. *Blood* **2018**, *131*, 247–262. [[CrossRef](#)]
41. Mancusi, A.; Ruggeri, L.; Velardi, A. Haploidentical hematopoietic transplantation for the cure of leukemia: From its biology to clinical translation. *Blood* **2016**, *128*, 2616–2623. [[CrossRef](#)]

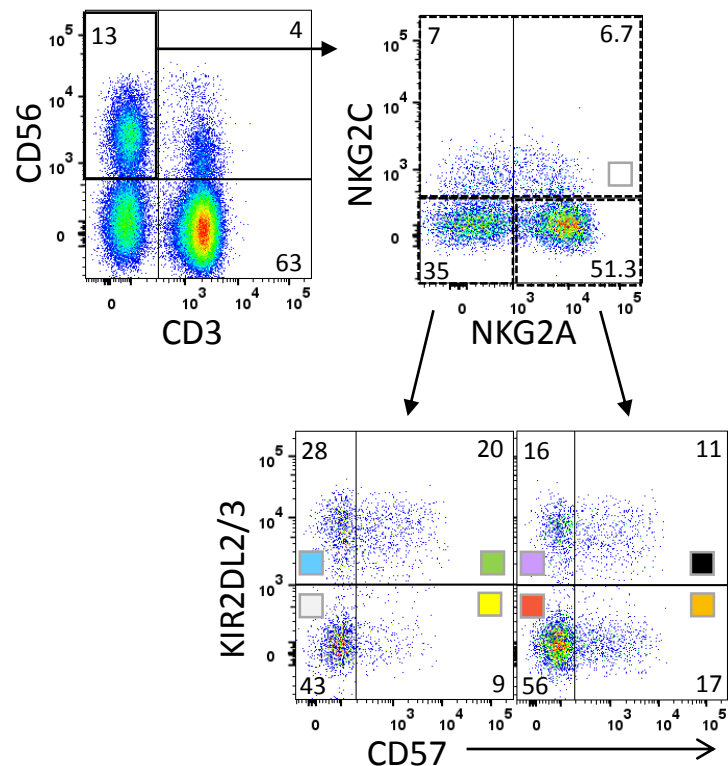
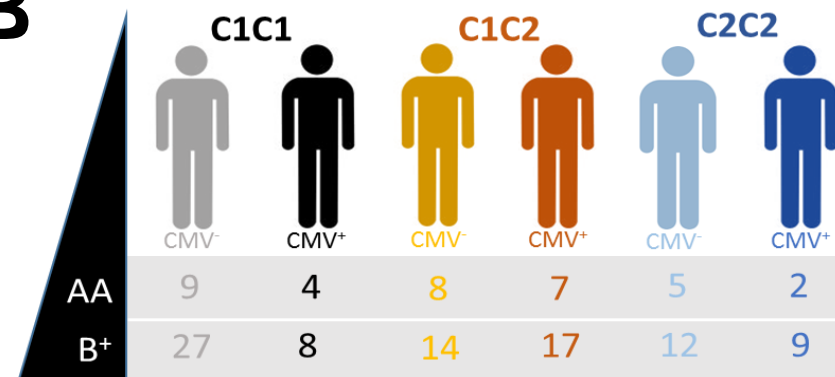
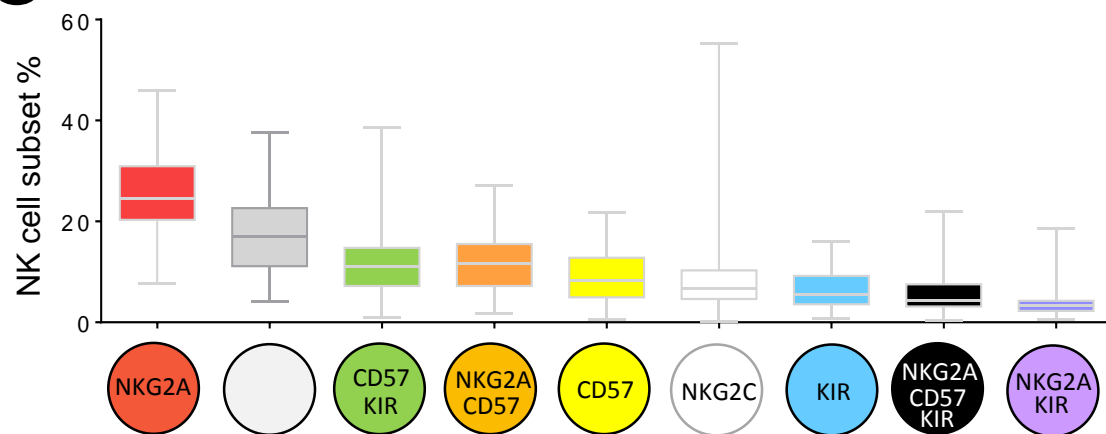
42. Locatelli, F.; Pende, D.; Mingari, M.C.; Bertaina, A.; Falco, M.; Moretta, A.; Moretta, L. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: Role of alloreactive NK cells. *Front. Immunol.* **2013**, *4*. [CrossRef]
43. Nguyen, S.; Dhedin, N.; Vernant, J.-P.; Kuentz, M.; Jijakli, A.A.; Rouas-Freiss, N.; Carosella, E.D.; Boudifa, A.; Debré, P.; Vieillard, V. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: Immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* **2005**, *105*, 4135–4142. [CrossRef] [PubMed]
44. Hodgins, J.J.; Khan, S.T.; Park, M.M.; Auer, R.C.; Ardolino, M. Killers 2.0: NK Cell Therapies at the Forefront of Cancer Control. Available online: <http://www.jci.org/articles/view/129338/pdf> (accessed on 7 May 2020).
45. Ruggeri, L.; Parisi, S.; Urbani, E.; Curti, A. Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2015**, *6*. [CrossRef] [PubMed]
46. Liu, E.; Marin, D.; Banerjee, P.; Macapinlac, H.A.; Thompson, P.; Basar, R.; Kerbauy, L.N.; Overman, B.; Thall, P.; Kaplan, M.; et al. Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *N. Engl. J. Med.* **2020**. [CrossRef] [PubMed]
47. Manser, A.R.; Scherenschlich, N.; Thöns, C.; Hengel, H.; Timm, J.; Uhrberg, M. KIR Polymorphism Modulates the Size of the Adaptive NK Cell Pool in Human Cytomegalovirus-Infected Individuals. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 2301–2309. [CrossRef]
48. Liu, L.L.; Béziat, V.; Oei, V.Y.S.; Pfefferle, A.; Schaffer, M.; Lehmann, S.; Hellström-Lindberg, E.; Söderhäll, S.; Heyman, M.; Grandér, D.; et al. Ex Vivo Expanded Adaptive NK Cells Effectively Kill Primary Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 654–665. [CrossRef]
49. Lopez-Verges, S.; Milush, J.M.; Schwartz, B.S.; Pando, M.J.; Jarjoura, J.; York, V.A.; Houchins, J.P.; Miller, S.; Kang, S.-M.; Norris, P.J.; et al. Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 14725–14732. [CrossRef]
50. Merino, A.; Zhang, B.; Dougherty, P.; Luo, X.; Wang, J.; Blazar, B.R.; Miller, J.S.; Cichocki, F. Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J. Clin. Invest.* **2019**, *129*, 3770–3785. [CrossRef]
51. Sun, J.Y.; Gaidulis, L.; Miller, M.M.; Goto, R.M.; Rodriguez, R.; Forman, S.J.; Senitzer, D. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens* **2004**, *64*, 462–468. [CrossRef]
52. Alter, G.; Malenfant, J.M.; Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* **2004**, *294*, 15–22. [CrossRef]
53. Penack, O.; Gentilini, C.; Fischer, L.; Asemissen, A.M.; Scheibenbogen, C.; Thiel, E.; Uharek, L. CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* **2005**, *19*, 835–840. [CrossRef]
54. Sturn, A.; Quackenbush, J.; Trajanoski, Z. Genesis: Cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 207–208. [CrossRef]
55. Hsu, K.C.; Chida, S.; Geraghty, D.E.; Dupont, B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: Gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol. Rev.* **2002**, *190*, 40–52. [CrossRef]







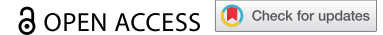
**Figure S1: Immunophenotyping of H9 ALL and KG1 AML cell lines.** Representative density plots illustrating inhibitory and activating NK ligand expression on H9 ALL and KG1 AML cell lines. Cell lines were stained using mAb (clear grey) and isotype control (filled grey) and were analyzed by flow cytometry. The Mean Fluorescent Intensity (MFI) of each NK ligand and the corresponding controls are indicated in the density plots.

**A****B****C**

**Figure S2: Flow Cytometry strategy to determine the frequency of different NK cell subsets. (A)** Density plots illustrating cell targeting strategy used by multi-color flow cytometry to target 9 NK cell subsets (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) based on the KIR, NKG2A, CD57 and NKG2C markers. A color code is indicated for the 9 NK cell subsets. **(B)** Distribution of blood donors (n=68) following KIR and HLA genetics and CMV status. **(C)** Whisker graphs showing the frequency of the 9 NK cell subsets : NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> (red), NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> (purple), NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (black), NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> (blue), NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> (green), NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (yellow), NKG2A<sup>+</sup>KIR<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (orange), NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> (grey) and NKG2C<sup>+</sup> (white) investigated in 68 blood donors. NK cell subsets were classified from the most represented to the least represented following the same color code. Shown are mean  $\pm$ SD.



ORIGINAL RESEARCH



## Low number of KIR ligands in lymphoma patients favors a good rituximab-dependent NK cell response

Dhon Roméo Makanga<sup>a,b,c</sup>, Maxime Jullien<sup>d</sup>, Gaëlle David<sup>a,b,c</sup>, Nolwenn Legrand<sup>a,b,c</sup>, Catherine Willem<sup>a,b,c</sup>, Léa Dubreuil<sup>a,b,c</sup>, Alexandre Walencik<sup>a</sup>, Cyrille Touzeau<sup>d</sup>, Thomas Gastinne<sup>d</sup>, Benoit Tessoulin<sup>d</sup>, Steven Le Gouill<sup>d</sup>, Béatrice Mahé<sup>d</sup>, Katia Gagne<sup>a,b,c,e</sup>, Patrice Chevallier<sup>b,c,d</sup>, Béatrice Clemenceau<sup>b,c,\*</sup>, and Christelle Retière<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup>Etablissement Français Du Sang, Nantes, France; <sup>b</sup>Université De Nantes, INSERM U1232 CNRS, CRCINA, Nantes, France; <sup>c</sup>LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, Nantes, France; <sup>d</sup>Hematology Clinic, CHU, Nantes, France; <sup>e</sup>LabEx Transplantex, Université De Strasbourg, Strasbourg, France

### ABSTRACT

The antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) effector function of natural killer (NK) cells is one of the known mechanisms of action for rituximab-based anti-cancer immunotherapy. Inhibition of the ADCC function of NK cells through interactions between inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA class I ligands is associated with resistance of cancers to rituximab. In this study, we deeply investigated the impact of KIR, HLA class I, and CD16 genotypes on rituximab-dependent NK cell responses in both an *in vitro* cellular model from healthy blood donors and *ex vivo* rituximab-treated non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients. We highlight that an HLA environment with limited KIR ligands is beneficial to promoting a higher frequency of KIR<sup>+</sup> NK cells including both educated and uneducated NK cells, two NK cell compartments that demonstrate higher rituximab-dependent degranulation than KIR<sup>-</sup> NK cells. In contrast, a substantial KIR ligand environment favors a higher frequency of poorly effective KIR<sup>-</sup> NK cells and numerous functional KIR/HLA inhibitions of educated KIR<sup>+</sup> NK cells. These phenomena explain why NHL patients with limited KIR ligands respond better to rituximab. In this HLA environment, CD16 polymorphism appears to have a collateral effect. Furthermore, we show the synergic effect of KIR2DS1, which strongly potentiates NK cell ADCC from C2<sup>-</sup> blood donors against C2<sup>+</sup> target cells. Taken together, these results pave the way for stronger prediction of rituximab responses for NHL patients. HLA class I typing and peripheral blood KIR<sup>+</sup> NK cell frequency could be simple and useful markers for predicting rituximab response.

### ARTICLE HISTORY

Received 2 April 2021  
Revised 24 May 2021  
Accepted 25 May 2021

### KEYWORDS

KIR; hla; adcc; rituximab; nk cells; cd16; non hodgkin lymphoma

## Introduction


Several mechanisms of action contribute to the efficacy of therapeutic antibodies, mainly including complement-dependent cytotoxicity, antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and the induction of cell death.<sup>1,12</sup> The ADCC effector function of natural killer (NK) cells and macrophages is widely used clinically as a mechanism of action for rituximab-based anti-cancer immunotherapy.<sup>3</sup> Rituximab is a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B cell lymphomas.<sup>3,4</sup> The rituximab-mediated ADCC activity of NK cells is triggered through the interaction between CD16 (FcγRIIIa) activating receptor with the Fc fragments of this monoclonal antibody. On the clinical side, an association between the FCGR3A genotype and clinical and molecular responses to rituximab has been revealed.<sup>5</sup> Thus, CD16 polymorphism may be evidence that ADCC is one of the mechanisms of action responsible for rituximab's anti-tumor effects. It has been shown that rituximab had a strong affinity for the CD16 158 V allotype compared to its 158 F counterpart.<sup>5,6</sup> Numerous studies have reported that the use of low-dose

rituximab was associated with greater ADCC responses in patients with the CD16 158 VV or VF genotype compared to patients with the 158 FF genotype.<sup>7</sup>

Several mechanisms of cancer resistance to rituximab have been documented in the literature, and different strategies are used to increase the effector activity of NK cells to improve anti-tumor responses. The inhibition of the ADCC function of NK cells through interactions between inhibitory killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) and HLA class I ligands has been described as one of the potential mechanisms of cancer resistance to rituximab<sup>8,9</sup>. KIRs are mainly expressed by NK cells and modulate NK cell responses by recognizing HLA class I molecules in tumoral or virus-infected cells. The interactions between KIR and autologous HLA class I ligands during development contribute to the functional education of KIR<sup>+</sup> NK cells.<sup>10</sup> This functional competence gives educated KIR<sup>+</sup> NK cells the ability to recognize and eliminate target cells that exhibit an absence of expression (missing-self) or a downregulation of HLA class I molecules. The main inhibitory KIRs are KIR2DL1, KIR2DL2/3 and

**CONTACT** Christelle Retière  [christelle.retiere@efs.sante.fr](mailto:christelle.retiere@efs.sante.fr)  Etablissement Français Du Sang-Pays De La Loire, CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université De Nantes, 34 Boulevard Jean Monnet, Nantes Cedex 01 44011, France

\*Co-senior authors

 Supplemental data for this article can be accessed on the [publisher's website](#)

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

KIR3DL1, which, respectively, recognize HLA-C molecules of group C2 (Lys80), HLA-C molecules of group C1 (Asn80) and Bw4 motifs bearing some HLA-A and HLA-B molecules. In contrast, the activating KIR2DS1 triggers NK cell alloreactivity by recognizing HLA-C molecules of group C2 on the surface of allogeneic target cells only when KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells have evolved in a C2<sup>-</sup> environment.<sup>11–13</sup> KIR genes are clonally expressed on the surface of NK cells.<sup>14</sup> Thus, the KIR<sup>+</sup> NK cell repertoire is diverse between individuals, since the NK cell repertoire harbors different NK cell populations with different functional orientations.

Previous studies have shown that uneducated NK cells dominate ADCC responses in neuroblastoma<sup>15</sup> and lymphoma<sup>16</sup> patients. By contrast, other groups have more recently shown a dominance of educated KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells in ADCC responses compared to uneducated counterparts in HIV models.<sup>17,18</sup> Furthermore, some studies<sup>9,16</sup> report disparities in regard to the impact of KIR/HLA interactions on the ADCC responses of NK cells. The experimental strategies and cellular models used in these studies do not necessarily represent the best means to study the activity of KIR<sup>+</sup> NK cells, which may explain these discrepancies. Terszowski et al. used KIR ligand transfected 721.221 target cells as target cells to measure rituximab-mediated ADCC although 721.221 does not express CD20.<sup>9</sup> Borgerding et al. developed a cellular model using a high arituximab concentration (10 µg/mL).<sup>8</sup> A few studies have documented mainly patient outcomes related to KIR/HLA genotypes without mechanistic investigations.<sup>19,20</sup> Thus, in this study, we revisited the *in vitro* influence of KIR, HLA and CD16 polymorphisms on rituximab-dependent NK cell degranulation in healthy blood donors. Then, we investigated their influence on the rituximab-based treatment response of a cohort of 74 non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients. Our results provide an overview of the influence of KIR, HLA class I, and CD16 polymorphisms on rituximab-dependent NK cell cytotoxicity integrating genetic rules for the structural and functional formation of the NK cell repertoire.

## Methods

### Study design and patient samples

From November 2019 to February 2020, 80 consecutive adult patients treated in our institution for an NHL with a rituximab-based immunochemotherapy were included after providing informed consent. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated as previously described.<sup>11</sup> Routine information, such as disease status, previous treatments received (including anterior exposure to rituximab), and CMV serology were collected from the medical file. The best response to immunochemotherapy at the end of the follow-up period (July 2020) was determined using Cheason 2007 revised criteria<sup>21</sup> for patients with CT-measurable disease. Patients treated for a Waldenström macroglobulinemia with no CT-measurable disease were evaluated using Owen 2012 criteria.<sup>22</sup> In both cases, complete response (CR) was defined as the disappearance of all evidence of disease, partial response (PR) as  $\geq 50\%$  regression of measurable disease, progressive disease

(PD) as the appearance of any new lesion or  $\geq 50\%$  increase measurable disease, and stable disease (SD) as failure to attain CR/PR or PD. At the time of analysis, 6 patients did not have an assessment of disease response and were excluded.

### Cells (PBMC and cell lines)

PBMCs were isolated as previously described.<sup>11</sup> All blood donors were recruited at the Blood Transfusion Center (EFS, Nantes, France) and informed consent was given by all individuals. The following CD20<sup>+</sup> HLA class I homozygous EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines were used as targets for functional assays: AMALA (HLA-B\*15:01, -C\*03:03, and Bw4<sup>-</sup>/C1C1), SP001 (HLA-B\*44:02, -C\*05:01, and Bw4<sup>+</sup>/C2C2) and RSH (HLA-B\*42:01, -C\*17:01, and Bw4<sup>-</sup>/C2C2). Cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, Paisley, Scotland, UK) containing glutamine (Gibco) and penicillin-streptomycin (Gibco) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco). Mycoplasma tests performed by PCR were negative for all cell lines.

### HLA, KIR, and FcγRIIIa (CD16) genotyping

HLA class I allele assignment was performed for all blood donor volunteers and lymphoma patients as previously described.<sup>23</sup> KIR generic typing was performed on all blood donors using a KIR multiplex PCR-SSP method as previously described<sup>24</sup> using primers provided by Ketevan Gendzekhadze. The presence or absence of KIR2DL1, 2DL2, 2DL3, 2DL5, 3DL1, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS4/1D, 2DS5 and 3DS1 genes was assigned. Donor KIR genotypes were then determined based on the presence or absence of activating KIR. Thus, a KIR AA genotype was defined by the presence of only KIR2DS4 as activating KIR gene and a KIR B<sup>+</sup> genotype by the presence of several activating KIR genes.<sup>25</sup> KIR ligands A3/A11, Bw4 (HLA-A and/or HLA-B), C1, and C2 were defined for all blood donors and lymphoma patients based on allelic HLA-A, -B, and -C typing. FcγRIIIa V158F polymorphism was typed for 14 healthy blood donors and 80 lymphoma patients by PCR-SSP as previously described.<sup>26</sup>

### Cell phenotypic analysis by flow cytometry

The NK cell phenotype from healthy blood donors was determined by eight-color multiparameter flow cytometry (MFC) on PBMC using the following mouse anti-human mAbs: anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony Biotechnology, San Jose, CA, USA), anti-CD56-BV510 (HCD56, Sony), anti-CD16-PerCP-Cy5.5 (3G8, Sony), anti-KIR2DL1-FITC (143211, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) anti-KIR2DL1/S1 (EB6, Beckman Coulter, Immunotech, Marseilles, France), anti-KIR2DL2/3/S2-PE-Cy7 (GL183, Beckman Coulter), anti-KIR3DL1/S1-PE (Z27, Beckman Coulter), and anti-NKG2C-APC (REA205, Miltenyi Biotec, Paris, France). The NK cell surface phenotype from patients was determined by seven-color multiparameter flow cytometry (MFC) on PBMCs using the following mouse anti-human mAbs: anti-CD3-APC-Cy7 (SK7, Sony), anti-CD56-BV510 (HCD56, Sony), anti-KIR2DL1/S1 (EB6, Beckman Coulter), anti-KIR2DL2/3/S2-PE-Cy7 (GL183), anti-



KIR3DL1/S1-PE (Z27), anti-NKG2A-PC7 (Z199, Beckman Coulter) and anti-NKG2C-APC (REA205, Miltenyi Biotec, Paris, France).

CD20 and HLA class I cell surface expressions were confirmed on EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines by flow cytometry using the following mouse anti-human mAbs: anti-CD20-FITC and anti-HLA class I-FITC (F41-IE3H1D2, EFS Nantes).

### **CD107a mobilization assay by flow cytometry**

EBV-B cell lines were pre-incubated with the anti-CD20 mAb (Roche, Basel, Switzerland) to a final concentration of 0.1, 1, or 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . PBMCs from healthy blood donors were mixed with EBV-B target cells in the presence of anti-CD107a-BV421 (H4A3, Sony) mAb, and NK-cell ( $\text{CD}3^- \text{CD}56^+$ ) degranulation was assessed after incubation for 5 h alone (negative control) or with different target cells (E:T ratio = 1:1) with brefeldin A (Sigma) at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the last 4 h. Then, the NK cell phenotype was obtained as previously indicated. All flow cytometry data were collected using an FACSCanto II (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo<sup>TM</sup> 10.6 software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

### **Statistical analysis**

Comparison of data in two series was performed using the Student's t-test. Statistical differences between different groups were analyzed using one-way ANOVA. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism v6.0 software (San Diego, CA, USA). *P* values <.05 were considered statistically significant.

## **Results**

### **Inhibitory KIR2DL/HLA-C interaction brings rituximab-dependent educated KIR2DL<sup>+</sup> NK cell degranulation down to the degranulation baseline of uneducated counterpart**

We evaluated the modulation of rituximab-dependent NK cell cytotoxicity in a cohort of healthy blood donors using the main inhibitory KIR2DL1, KIR2DL2/3 and KIR3DL1 and activating KIR2DS1. The KIR genotypes and HLA class I types were determined as well as CD16 V158F polymorphism, in order to include only donors with CD16 158 VV or VF (**supplemental table S1**). Seven C1C1, three C1C2 and four C2C2 were studied from 14 blood donors. Notably, a majority of donors (11/14) were HLA-A and/or HLA-B Bw4<sup>+</sup> (**supplemental table S1**). We used three homozygous HLA class I EBV-B cell lines that did or did not express Bw4, C1, or C2 KIR ligands. All EBV-B cell lines expressed CD20 and a similar level of HLA class I molecules (**figure S1**).

From blood donor PBMCs, NK cells were identified as  $\text{CD}3^- \text{CD}56^+$  cells. Most of them were  $\text{CD}56^{\text{dim}}$ . A KIR-specific mAb combination led us to target three NK cell subsets expressing either KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DS1<sup>-</sup>/2DL2/3<sup>-</sup>/3DL1<sup>-</sup>), KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DL1/S1<sup>-</sup>/3DL1<sup>-</sup>), or KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DL1/2/3<sup>-</sup>2DS1<sup>-</sup>), and one NK cell subset expressing only KIR2DS1<sup>+</sup> (KIR2DL1<sup>-</sup>/2DL2/3<sup>-</sup>/

3DL1<sup>-</sup>) as illustrated in **Figure 1a** with a representative donor expressing KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL3, and KIR3DL1.

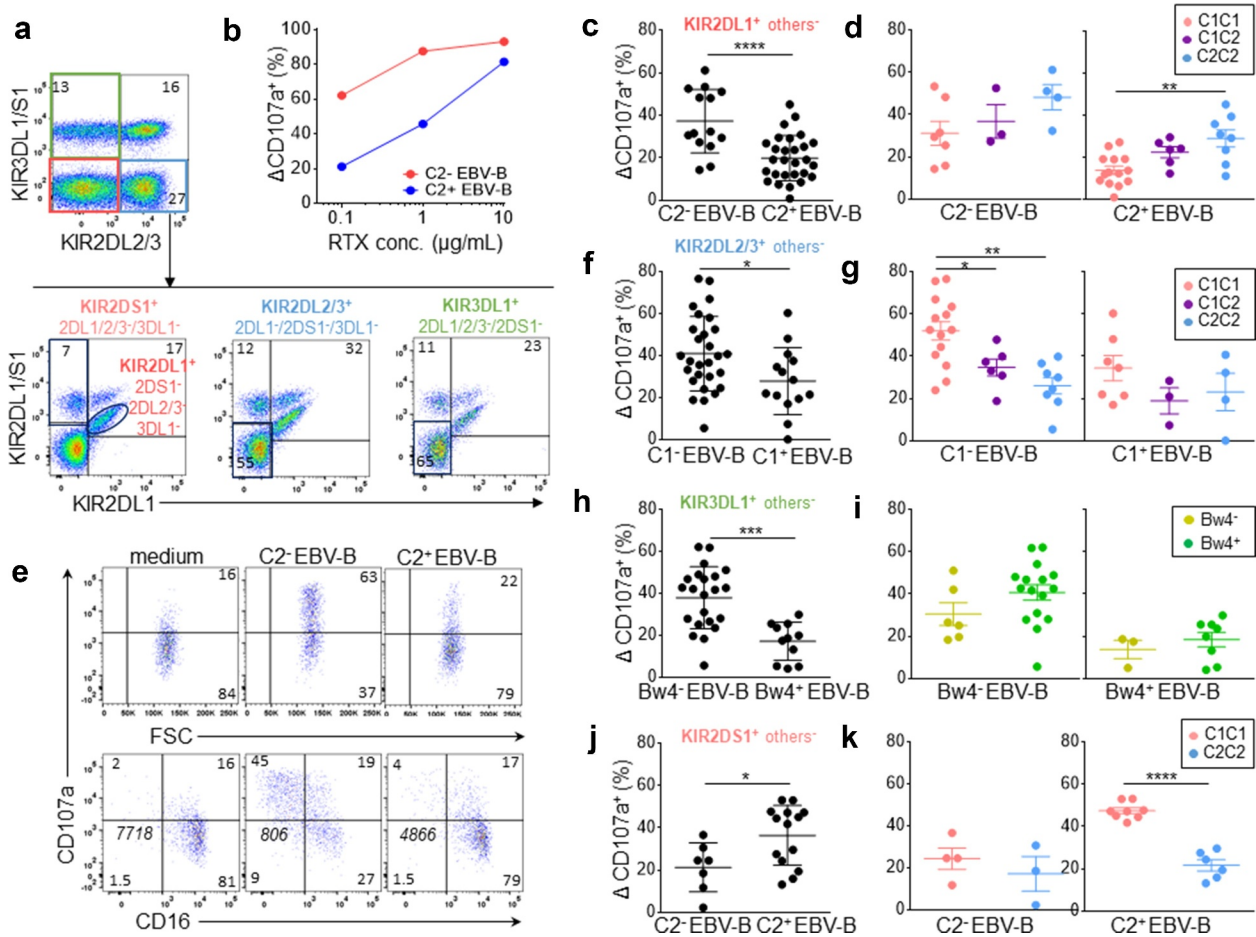
Different rituximab concentrations were evaluated to determine the best one to assess the modulator effect of inhibitory KIR/HLA interactions in our *in vitro* cellular model. PBMCs were incubated with the different EBV-B cell lines, NK cells were identified as  $\text{CD}3^- \text{CD}56^+$ , and the degranulation (CD107a) of each NK cell subset was determined by flow cytometry. At 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of antibody, the CD16-mediated activation masked the inhibitory effect of KIR2DL1 on NK cell cytotoxicity against the C2<sup>+</sup> EBV-B cell line (**Figure 1b**). However, at 1 and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the inhibitory KIR2DL1 signal was measurable and thus the concentration of rituximab was 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in all subsequent experiments in this study. At this concentration, we observed lower rituximab-dependent degranulation of all NK cells from CD16-158 FF blood donors compared to CD16-158 VV and VF blood donors and no difference between the last two groups (data not shown).

Rituximab-dependent KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation was inhibited against both C2<sup>+</sup> EBV-B cell lines compared to the C2<sup>-</sup> EBV-B cell line (*p* < .0001) (**Figure 1c**). The degranulation of C2C2 KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells was significantly higher than that of their C1C1 counterparts against the C2<sup>+</sup> EBV-B cell line (*p* = .001) due to their educated status (**Figure 1d**). Indeed, the inhibition ratio against C2<sup>+</sup> EBV-B cell lines compared to the C2<sup>-</sup> EBV-B cell line was similar for C1C1, C1C2 and C2C2 donors (data not shown) and better spontaneous degranulation of educated KIR2DL1<sup>+</sup> NK cells against the C2<sup>-</sup> EBV-B cell line was observed (**Figure 1d**). Interestingly, although the KIR2DL1/C2 interaction inhibited the rituximab-dependent educated KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation (C2<sup>+</sup> target condition), the latter was brought down to the degranulation level of uneducated KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells without KIR2DL1/C2 inhibition (C2<sup>-</sup> target condition). The rituximab-dependent NK cell degranulation was associated with decreased expression of CD16 on the cell surface for all studied NK cell subsets, as illustrated for KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells (**Figure 1e**) and as previously demonstrated.<sup>27,28</sup>

The rituximab-dependent KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation was reduced with the C1<sup>+</sup> EBV-B cell line compared with both C1<sup>-</sup> EBV-B cell lines (*p* = .02) (**figure 1f**). The lower degranulation potential of uneducated C2C2 KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells was clearly observed against C1<sup>-</sup> EBV-B cell lines (*p* = .0007) and to a lesser extent with only one C1 ligand present to educate KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells (*p* = .02) (**Figure 1g**). Although the KIR2DL/HLA-C interaction inhibited the rituximab-dependent educated KIR2DL<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation, the latter was brought down to a higher level compared to uneducated KIR2DL<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells. Together, these results show a significant inhibitory effect of KIR2DL on NK ADCC and the hyporesponsiveness of uneducated KIR2DL<sup>+</sup> NK cells.

### **Inhibitory KIR3DL1-Bw4 interaction brings rituximab-dependent NK cell degranulation down to the degranulation baseline of uneducated KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells**

Rituximab-dependent KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation was significantly inhibited against the Bw4<sup>+</sup> EBV-B cell



**Figure 1. Inhibitory KIR-HLA interaction brings rituximab-dependent educated KIR<sup>+</sup> NK cell degranulation down to the degranulation baseline of uneducated counterpart.** (a) Representative density plots illustrating the strategy to target three NK cell subsets expressing either KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DS1<sup>-</sup>/2DL2/3<sup>-</sup>/3DL1<sup>-</sup>), KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DL1/2/3<sup>-</sup>/2DS1<sup>-</sup>) or KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DL1/2/3<sup>-</sup>/2DS1<sup>-</sup>) and one NK cell subset expressing only KIR2DS1<sup>+</sup> (KIR2DL1<sup>-</sup>/2DL2/3<sup>-</sup>/3DL1<sup>-</sup>) from PBMC as illustrated for a representative donor expressing KIR2DL1, KIR2DS1, KIR2DL3 and KIR3DL1. A first mAb combination led to exclude KIR3DL1/S1<sup>+</sup> and KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cells (red gate) and a second mAb combination led to select either KIR2DL1<sup>+</sup> 2DS1<sup>-</sup> NK cells or KIR2DS1<sup>+</sup> 2DL1<sup>+</sup> NK cells. Similarly, a first mAb combination led to select KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells and to exclude KIR2DL2/3<sup>+</sup> NK cells (green gate) and a second mAb combination to exclude KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells. To target KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup>, the first combination led to target KIR2DL2/3<sup>+</sup> and exclude KIR3DL1/S1<sup>+</sup> NK cells and the second one led to exclude KIR2DL1<sup>+</sup> and KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells. (b) Determination of the optimal rituximab (RTX) concentration to observe inhibiting KIR2DL1-C2 interaction on NK cell ADCC. RTX-dependent KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency against C2<sup>-</sup> and C2<sup>+</sup> EBV-B cell lines for a representative blood donor determined by flow cytometry at different RTX concentrations (0.1, 1, and 10  $\mu$ g/mL) using 1:1 PBMC:EBV-B cell line ratio. (c) RTX dependent KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency against C2<sup>-</sup> (Bw4<sup>-</sup>, n = 14) and C2<sup>+</sup> (Bw4<sup>+</sup>, n = 14 and Bw4<sup>+</sup>, n = 14) EBV-B cell lines for all blood donors determined by flow cytometry. Specific CD107a expression is reported as  $\Delta$ CD107a calculating the difference of CD107a<sup>+</sup> NK cell frequency of the test (EBV-B + RTX) and of the NK alone (medium). (d) Frequencies of RTX-dependent KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) against one C2<sup>-</sup> EBV-B cell line for C1C1 (n = 7), C1C2 (n = 3) and C2C2 (n = 4) blood donors and two C2<sup>+</sup> (Bw4<sup>-</sup> and Bw4<sup>+</sup>) EBV-B cell lines for C1C1 (n = 14), C1C2 (n = 6) and C2C2 (n = 8) blood donors. (e) Representative density plots of RTX-dependent KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation (CD107a) against C2<sup>-</sup> and C2<sup>+</sup> EBV-B cell lines. CD16 expression is evaluated on NK cells. The frequencies are indicated on the density plot and the mean fluorescent intensity of CD16 on NK cells is indicated in italic. (f) RTX-dependent KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency against C1<sup>-</sup> (Bw4<sup>-</sup>, n = 14 and Bw4<sup>+</sup>, n = 14) and C1<sup>+</sup> (n = 14) EBV-B cell lines for all blood donors. (g) RTX-dependent KIR2DL2/3<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation against C1<sup>-</sup> EBV-B cell lines for C1C1 (n = 14), C1C2 (n = 6) and C2C2 (n = 8) blood donors and against C1<sup>+</sup> EBV-B cell lines for C1C1 (n = 7), C1C2 (n = 3) and C2C2 (n = 4) blood donors. (h) RTX-dependent KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation against Bw4<sup>-</sup> (Bw4<sup>-</sup>, n = 11 and Bw4<sup>+</sup>, n = 11) and Bw4<sup>+</sup> (n = 11) EBV-B cell lines for all blood donors. (i) RTX-dependent KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation against Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell lines for Bw4<sup>-</sup> (n = 6) and Bw4<sup>+</sup> (n = 16) blood donors and against Bw4<sup>+</sup> EBV-B cell lines for Bw4<sup>-</sup> (n = 3) and Bw4<sup>+</sup> (n = 8) blood donors. (j) RTX-dependent KIR2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation (% CD107a<sup>+</sup>) against C2<sup>-</sup> (n = 7) and C2<sup>+</sup> (Bw4<sup>-</sup>, n = 7 and Bw4<sup>+</sup>, n = 7) EBV-B cell lines for all blood donors. (k) RTX-dependent KIR2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation against 2 C2<sup>+</sup> (Bw4<sup>-</sup> and Bw4<sup>+</sup>) EBV-B cell lines for C1C1 (n = 8) and C2C2 (n = 6) blood donors and against one C2<sup>-</sup> EBV-B cell line for C1C1 (n = 4) and C2C2 (n = 3) blood donors. \*p < .05, \*\*p < .01, \*\*\*\*p < .001.

line compared with the Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell line after rituximab NK cell activation ( $p = .0002$ ) (Figure 1h). Educated KIR3DL1<sup>+</sup> NK cells displayed better degranulation than uneducated ones against Bw4<sup>-</sup> and Bw4<sup>+</sup> target cells (Figure 1i). However, the differences in degranulation were not significant probably due to the broad polymorphism of KIR3DL1, which is known to drastically impact its membrane expression and inhibitory effect. As previously observed for KIR2DL, although the KIR3DL1/HLA-Bw4 interaction inhibited the rituximab-dependent educated KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell degranulation,

the latter was brought down to a higher level compared to uneducated KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cells underlying the hyporesponsiveness of these uneducated NK cells.

### Activating KIR2DS1 signal enhances rituximab-dependent NK cell degranulation from C2<sup>-</sup> blood donors

The activating KIR2DS1 recognizes HLA-C2 ligands as its inhibitory homolog KIR2DL1.<sup>11,12,29,30</sup> Using the same KIR-specific mAb combination, we further investigated the

activating potential of KIR2DS1 on rituximab-dependent NK cell degranulation. The degranulation of KIR2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> (KIR2DL1/2/3<sup>-</sup>/3DL1<sup>-</sup>) NK cell subset was higher after rituximab NK cell activation against both C2<sup>+</sup> EBV-B cell lines compared to the C2<sup>-</sup> EBV-B cell line ( $p = .0246$ ) (Figure 1j). We observed two groups of responders against the C2<sup>+</sup> EBV-B cell line. Indeed, this observation was particularly obvious for C1C1 compared to C2C2 blood donors ( $p < .0001$ ) (Figure 1k) in accordance with the fact that only KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells from C2<sup>-</sup> blood donors are C2 alloreactive.

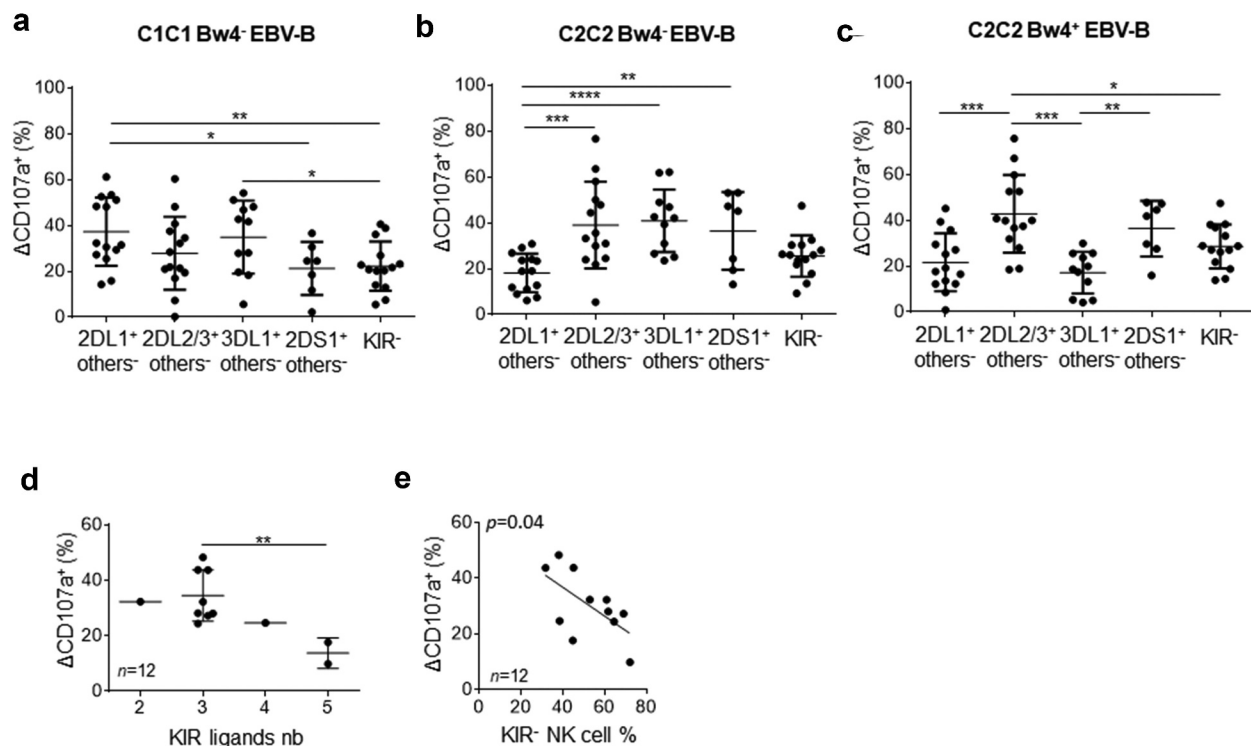
### Lower modulator effect of KIR2DL2/3 than KIR2DL1, KIR3DL1 and KIR2DS1 on rituximab-dependent NK cell degranulation

After considering each KIR<sup>+</sup> NK cell subset, we further compared them against each EBV-B target cell. The KIR<sup>-</sup> NK cell subset was included in our analysis (supplemental Figure S2A) as a control cell subset, since its rituximab-dependent degranulation was similar against all EBV-B cell lines whatever their HLA class I genotype in terms of KIR ligands (supplemental figure S2B).

Inhibitory KIR<sup>+</sup> NK cells displayed similar rituximab-dependent degranulation against the C1C1 Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell line despite potential inhibition mediated by the KIR2DL2/3/C1 interaction (Figure 2a). Of note, KIR2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> and KIR<sup>-</sup> NK cell subsets showed lower rituximab-dependent degranulation ( $p = .02$  between KIR2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> and KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell subsets,  $p = .005$  between KIR<sup>-</sup>

and KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell subsets). In contrast, KIR2DL1/C2 inhibition and KIR2DS1/C2 activation limited rituximab dependent NK cell degranulation against the C2C2 Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell line (Figure 2b) ( $p < .0001$  between KIR2DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> and KIR3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> NK cell subsets). Finally, KIR2DL1/C2 and KIR3DL1/Bw4 inhibition and KIR2DS1/C2 activation also reduced rituximab-dependent NK cell degranulation against the C2C2 Bw4<sup>+</sup> EBV-B cell line (Figure 2c). Once more, KIR<sup>-</sup> NK cell subsets showed low rituximab-dependent NK cell degranulation against these last EBV-B cell lines (Figure 2b-c). Taken together, these results highlight a lower modulator effect of KIR2DL2/3 with its C1 ligands on NK cell rituximab-dependent NK cell degranulation compared to inhibitory KIR2DL1 and KIR3DL1 and activating KIR2DS1.

In order to obtain an overview of how KIR and HLA class I molecules affect rituximab-dependent NK cell degranulation, we analyzed the NK cell degranulation of all NK cells taking into account the number of KIR ligands and the frequency of peripheral blood KIR<sup>-</sup> and KIR<sup>+</sup> NK cells in studied blood donors. For this, we chose NK cell degranulation against the EBV-B cell line, which does not express any KIR ligand susceptible to inhibiting NK cell functions. Thus, both C1C1 Bw4<sup>-</sup> and C2C2 Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell lines were identified as target cells with only one KIR ligand (C1 or C2). In parallel, we excluded all C1C2 blood donors as they possess educated KIR2DL1 and KIR2DL2/3 NK cells. We kept only the results obtained for C1C1 or C2C2 blood donors in this analysis. For instance, NK cell degranulation from C1C1 and C2C2 Bw4<sup>-</sup> or Bw4<sup>+</sup> blood



**Figure 2. Lower modulator effect of KIR2DL2/3 than KIR2DL1, KIR3DL1 and KIR2DS1 on rituximab-dependent NK cell degranulation.** RTX-dependent NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency for each targeted NK cell subset: 2DL1<sup>-</sup> others<sup>-</sup>, 2DL2/3 others<sup>-</sup>, 3DL1<sup>+</sup> others<sup>-</sup>, 2DS1<sup>+</sup> others<sup>-</sup> and KIR<sup>-</sup> NK cells against (a) C1C1 Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell line, (b) C2C2 Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell line, and (c) C2C2 Bw4<sup>+</sup> EBV-B cell line. ANOVA test. (d) RTX-dependent NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency following KIR ligands number. The Student's t-test was performed between the series with three and five KIR ligands. (e) Correlation between percentage of RTX-dependent NK cell degranulation ( $\Delta$  CD107a<sup>+</sup>) frequency and the KIR<sup>-</sup> NK cell frequency. \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .005$ , \*\*\*\* $p < .0001$ .



donors was retained against C2C2 Bw4<sup>-</sup> and C1C1Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell lines, respectively. Interestingly, the higher the cell degranulation, the more the number of KIR ligands limits the frequency of rituximab-dependent CD107a<sup>+</sup> NK cells ( $p = .01$ ) (Figure 2d). Of note, the frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells correlates inversely with rituximab-dependent CD107a<sup>+</sup> NK cells ( $p = .04$ ) (Figure 2e).

### Lower KIR ligand numbers and peripheral blood KIR<sup>-</sup> NK cell frequency are good prognostic markers of rituximab responses in lymphoma patients

The influence of CD16, the number of KIR ligands, and the frequency of peripheral blood KIR<sup>-</sup> and KIR<sup>+</sup> NK cells were evaluated in a cohort of 74 NHL patients treated with rituximab as part of immunochemotherapy (Table 1).

The distribution of CD16 genotypes in the cohort (10% VV, 47% VF, and 43% FF) was consistent with known frequencies.<sup>5,26</sup> Of note, no association between CD16-158V/F polymorphism and the rituximab response was observed (Figure 3a).

The clinical response to rituximab was analyzed according to the number of KIR ligands and the frequency of peripheral

blood KIR<sup>-</sup> NK cells. A phenotype of NK cells was obtained from patient PBMCs to determine whether KIR2DL1, KIR2DL2/3, and KIR3DL1 were expressed (supplemental Figure S3). A KIR-specific mAb combination led us to determine KIR<sup>-</sup> and KIR<sup>+</sup> NK cell frequencies. NKG2A and NKG2C were also evaluated. KIR2DL1 and KIR2DL2/3 were always expressed on NK cells from all studied patients and only six Bw4<sup>+</sup> patients did not express a membrane KIR3DL1, as illustrated for a representative patient in supplementary figure S3C-D. In parallel, from their HLA typing, we deduced the number of KIR ligands (A3/A11, Bw4, C1, and C2). We determined the number of KIR ligands for which the corresponding KIR was expressed in NK cells. C1, C2, and A3/A11 were always identified as KIR ligands as the cognate receptor was expressed in NK cells of all patients. In contrast, HLA-A and HLA-B molecules with a Bw4 motif were identified as KIR ligands only for patients expressing membrane KIR3DL1. Thus, four groups of patients were determined with two, three, four or more than 5 KIR ligands (Figure 3b). Complete responses were significantly higher in the group of patients displaying only 2 KIR ligands compared to those with more than five KIR ligands ( $p = .03$ ) (Figure 3b).

To evaluate the impact of KIR<sup>-</sup> NK cell frequency on the clinical outcome, we determined 4 groups of patients including around 16 and 20 patients with lower to higher frequencies (Figure 3c). PD is more frequent in patients displaying a high frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells ( $\geq 71.80\%$ ) compared to low frequency (44.5–56.80%,  $p = .01$ ; 56.80–71.80%,  $p = .04$ ). In contrast, CR is less frequent in patients displaying a high frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells ( $\geq 71.80\%$ ) compared to low frequency (44.5–56.80%,  $p = .02$ ; 56.80–71.80%,  $p = .01$ ) (Figure 3c). Even though it was nonsignificant, we observed that the frequency of KIR<sup>+</sup> NK cells decreased with an increased number of KIR ligands (Figure 3d).

### Low KIR ligand numbers and peripheral blood KIR<sup>-</sup> NK cell frequency are good prognostic markers of rituximab responses in low-grade lymphoma patients

Details on the treatment and pathologies of NHL patients are presented in supplemental table S2. Forty-four patients were treated for low grade (LG) NHL (FL,  $n = 24$ ; WM,  $n = 16$ ; other,  $n = 4$ ) and 30 were treated for high-grade (HG) (DLBCL,  $n = 16$ ; MCL,  $n = 12$ ; other,  $n = 2$ ). As expected, given the intensity of treatments received, a higher rate of CR was observed in patients treated for a HG NHL than LG NHL ( $p = .003$ ) (Figure 4a). The distribution of CD16 genotype, number of KIR ligands, and frequency of peripheral blood KIR<sup>-</sup> NK cells were comparable between patients treated for HG and LG NHL (Figure 4b-d).

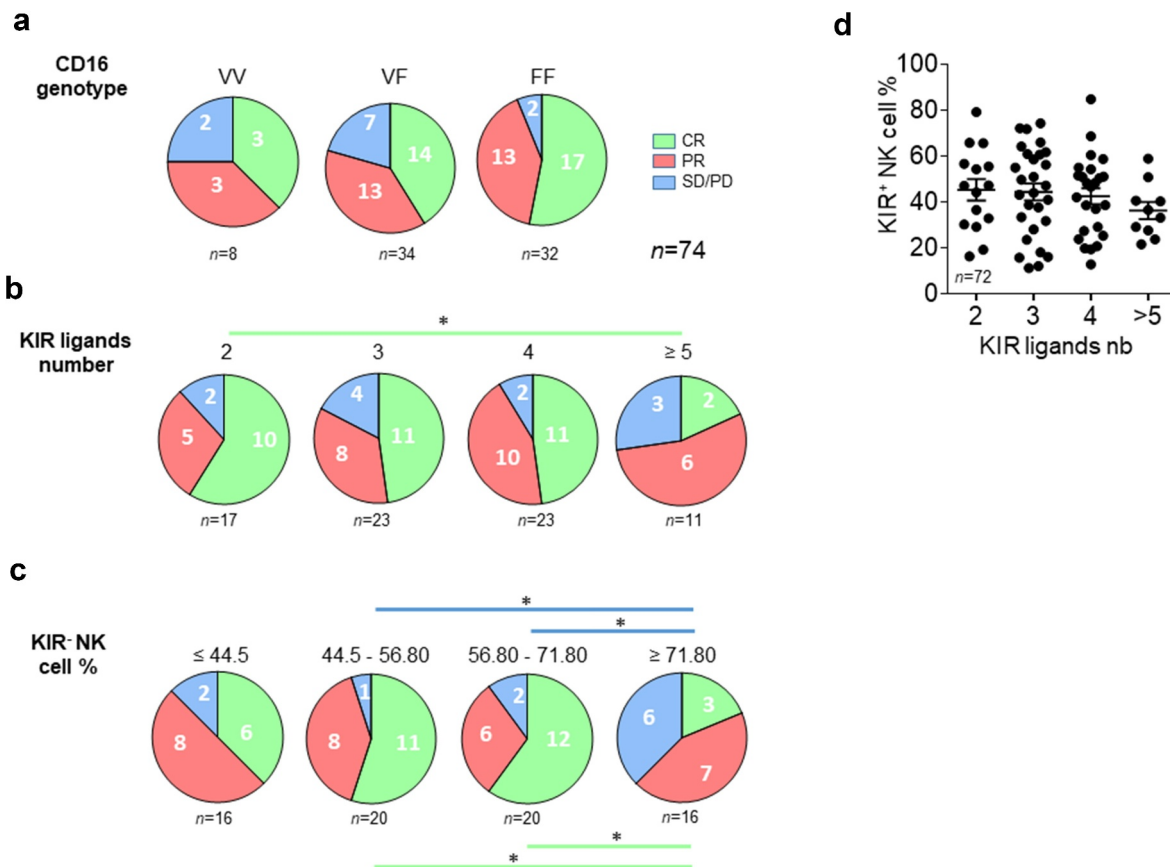
The same analysis in the LG subgroup showed analogous results, with a 75% CR rate in patients displaying 2 KIR ligands vs. 0% in patients displaying  $\geq 5$  KIR ligands ( $p = .03$ ) (Figure 5a). HG subgroup analysis showed an unfavorable trend for patients with  $\geq 5$  KIR ligands, with no significant difference, probably due to the small sample size (Figure 5b). The same result was observed when analyzing the LG subgroup; patients exhibiting higher frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells ( $\geq 71.80\%$ ) had lower CR ( $p = .01$ ) and higher PD ( $p = .01$ )

**Table 1.** Characteristics of patients.

Characteristics	CR (N = 34)	PR (N = 29)	PD/SD (N = 11)	Total (N = 74)	$p$ Value
Gender					
Female	15 (44)	15 (44)	4 (12)	34 (46)	
Male	19 (47.5)	14 (35)	7 (17.5)	40 (54)	
Age (years)					
<65	13 (56)	8 (35)	2 (9)	23 (31)	
>65	21 (41)	21 (41)	9 (18)	51 (69)	
Disease					0.0085
High grade NHL	20 (67)	6 (20)	4 (13)	30 (41)	
Other low grade NHL	14 (32)	23 (52)	7 (16)	44 (59)	
CMV status					
Positive	13 (52)	9 (36)	3 (12)	25 (34)	
Negative	13 (45)	13 (45)	3 (10)	29 (39)	
ND	8 (40)	7 (35)	5 (25)	20 (27)	
CD16 genotype					0.4656
VV	3 (37.5)	3 (37.5)	2 (25)	8 (11)	
VF	14 (41)	13 (38)	7 (21)	34 (46)	
FF	17 (53)	13 (41)	2 (6)	32 (43)	
HLA-C ligands					0.569
C1C1	10 (39)	11 (42)	5 (19)	26 (35)	
C1C2	19 (50)	13 (34)	6 (16)	38 (51)	
C2C2	5 (50)	5 (50)	0 (0)	10 (14)	
HLA-A/B Bw4 ligands					0.5216
Bw4+	22 (43)	21 (41)	8 (16)	51 (69)	
Bw4-	12 (52)	8 (35)	3 (13)	23 (31)	
HLA-A3/A11 ligands					0.8716
A3/A11+	10 (42)	10 (42)	4 (16)	24 (32)	
A3/A11-	24 (48)	19 (38)	7 (14)	50 (68)	

Data are presented as n (%).

Abbreviations: CR: Complete response; PR: partial response; SD: stable disease; PD: progressive disease; CMV: cytomegalovirus; HLA: Human Lymphocytic Antigen.



**Figure 3. Lower KIR ligand numbers and peripheral blood KIR<sup>-</sup> NK cell frequency are good prognostic markers of rituximab responses in lymphoma patients.** (a) Pie charts representing the distribution of lymphoma patients ( $n = 74$ ) following clinical outcome (CR, PR, and SD/PD) and CD16 polymorphism (VV, VF, and FF). (b) Pie charts representing the distribution of lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR, and SD/PD) and the number of KIR ligands (2, 3, 4 or  $\geq 5$ ). (c) Pie charts representing the distribution of lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR, and SD/PD) and the KIR<sup>-</sup> NK cell frequency ( $\leq 44.5$ , 44.5–56.80, 56.80–71.80 and  $\geq 71.80$ ). (d) KIR<sup>+</sup> NK cell frequencies following the number of KIR ligands for all lymphoma patients. The green and blue lines determine the significant difference between 2 groups for CR and SD/PD outcomes \* $p < .05$ .

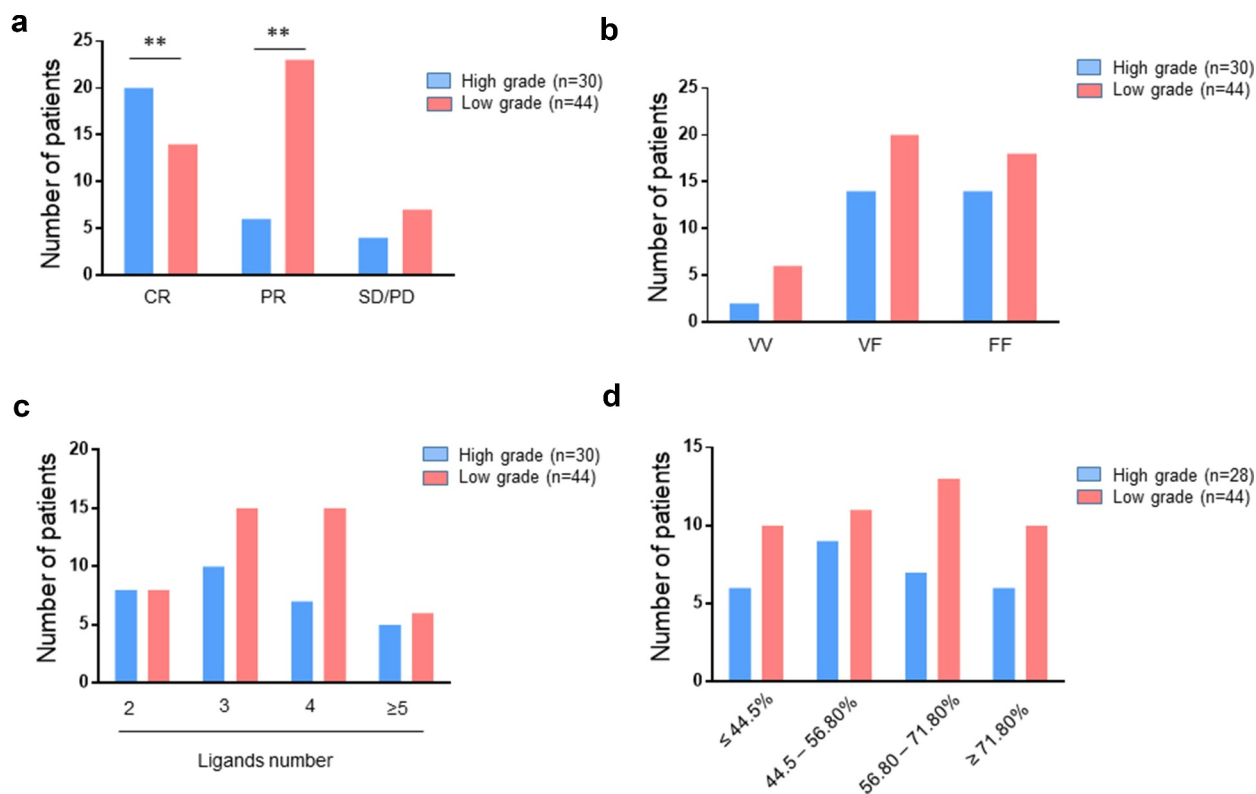
(Figure 5c). By contrast, the frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells in the HG subgroup was not an important factor for explaining the classification of patients based on their clinical outcome (Figure 5d).

## Discussion

In our *in vitro* cellular model, we determined the optimal rituximab concentration (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), in accordance with previous studies,<sup>16</sup> leading to an assessment of KIR/HLA inhibition of rituximab-dependent NK cell degranulation from blood donors with CD16-158VV or VF genotype to rule out the influence of CD16-158 FF polymorphism. All inhibitory KIR investigated in our cellular model inhibited rituximab-dependent NK cell degranulation, as previously observed by other groups with different cellular models.<sup>9,16,17</sup> Nonetheless, we observed a differential contribution of inhibitory KIR, as KIR2DL1 had a greater effect than KIR2DL2/3 or KIR3DL1. Educated KIR NK cells had higher responsiveness compared to their uneducated counterparts. However, the inhibitory effect was similar for both NK cell subsets. Thus, despite the inhibitory signal mediated by KIR/HLA interactions, educated NK cells constitute the best subset to mediate high ADCC rituximab-dependent NK cell degranulation. Our observations are along the same lines as those previously reported in HIV

models.<sup>17,18</sup> However, they disagree with previous studies showing a dominance of uneducated NK cells in anti-GD2<sup>15</sup> and in rituximab-dependent NK ADCC responses.<sup>16</sup> Finally, we observed a negative correlation between rituximab-dependent NK cell degranulation and the number of KIR ligands and between degranulation and KIR<sup>+</sup> NK cell frequency.

To elaborate further on the clinical side, we observed an increased frequency of KIR<sup>-</sup> NK cells and inversely decreased frequency of KIR<sup>+</sup> NK cells associated with disease progression in lymphoma patients. These results are in accordance with the NK cell dysfunction observed in chronic lymphocytic leukemia (CLL) associated with a striking reduction in the frequency of NK cells expressing KIR2DL1 and/or KIR3DL1, which progresses over time in most patients.<sup>31</sup> Our observation can be explained by the poor contribution of KIR<sup>-</sup> NK cells to rituximab-dependent ADCC against all EBV-B cell lines in our cellular model in contrast to educated and uneducated KIR<sup>+</sup> NK cells. It is known that the induction of ADCC resistance can be explained in part by the formation of non-optimal immune synapse.<sup>32</sup> Genetic diversity in KIRs affects membrane-proximal signaling and the formation of activating immune synapses.<sup>33</sup> KIR<sup>-</sup> NK cells may present a non-optimal immune synapses due to the absence of education via KIR/HLA interactions. Moreover, our study emphasizes the



**Figure 4. Distribution of lymphoma patients following clinical grade level.** histograms representing the distribution of high-grade and low-grade lymphoma patients (n = 74) following (a) clinical outcome (CR, PR, and SD/PD), (b) CD16 polymorphism (VV, VF, and FF), (c) the number of KIR ligands (2, 3, 4 or ≥5) and (d) the KIR<sup>-</sup> NK cell frequency (≤ 44.5, 44.5–56.80, 56.80–71.80 and ≥ 71.80). \*p < .05.

influence of the number of KIR ligands on the frequency of KIR<sup>+</sup> NK cells, showing that the frequency of cells decreases with the number of ligands, and inversely for KIR<sup>-</sup> NK cells. Thus, KIR<sup>+</sup> NK cells appear essential to drive efficient ADCC rituximab-dependent degranulation, whatever their education status, as even uneducated, KIR<sup>+</sup> NK cells demonstrate higher responsiveness than KIR<sup>-</sup> NK cells in rituximab-dependent degranulation (Figure 6).

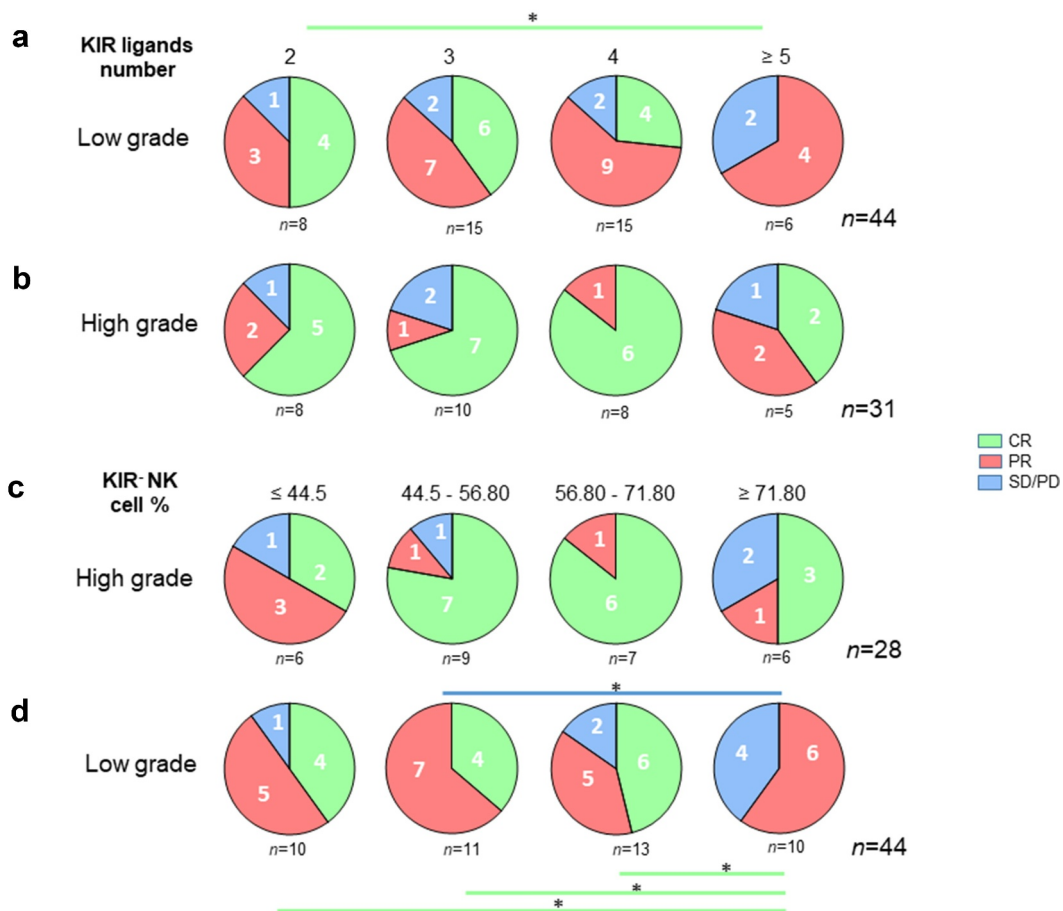
Furthermore, we describe for the first time the triggering effect of the KIR2DS1-C2 interaction on rituximab-dependent NK cell degranulation. Although the triggering effect of KIR2DS1 on the rituximab-dependent total NK cell response is limited due to the low frequency of KIR2DS1<sup>+</sup> NK cells, it can be an advantage to select KIR2DS1<sup>+</sup> C2<sup>-</sup> NK cells with the overarching goal of obtaining an efficient CD16<sup>+</sup> cell line for ADCC, as previously described.<sup>34</sup>

The deleterious influence of the CD16-158F/F genotype has been described with regard to the clinical outcomes of NHL patients after rituximab treatment.<sup>5</sup> Against this HLA background, CD16 polymorphism appears to have a collateral effect, as no association between CD16-158V/F polymorphism and rituximab responses was observed in 74 NHL patients. This discrepancy may be due to the lower number of NHL patients (n = 49) in the original study and the focus only on the CD16-158V/F polymorphism, as the authors themselves suggested other potential genetic polymorphisms to explain their observations. Moreover, it has been shown that this functional difference of NK cells between VV and FF genotyped patients is hidden when high rituximab concentrations are used.<sup>7</sup>

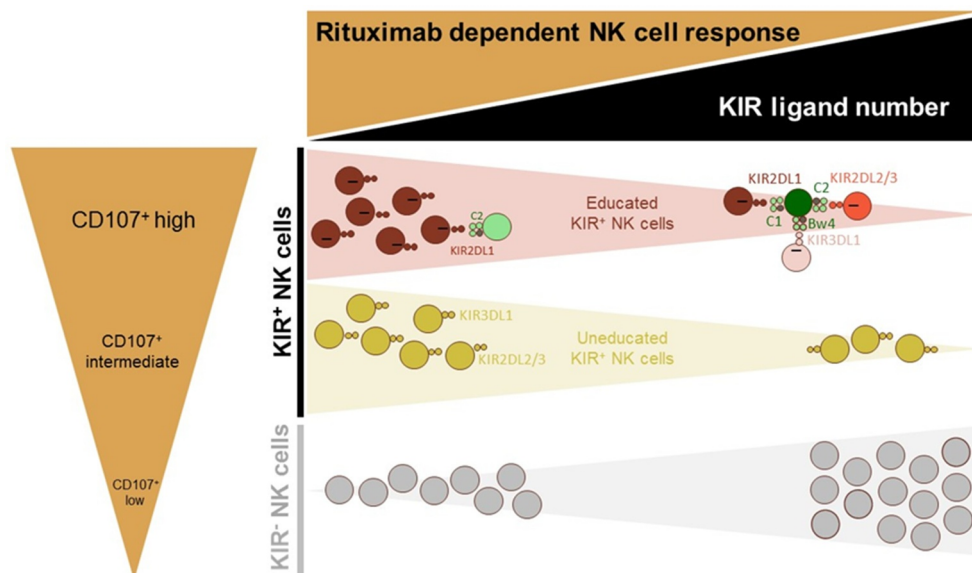
Delgado et al. showed an association between relapsed/refractory neuroblastoma (NB) patients with KIR/KIR-ligand mismatches and better response/improvement to humanized anti-GD2 monoclonal antibody linked to human IL2 in a phase II trial.<sup>35</sup> Interestingly, in their study, autologous KIR/KIR-ligand mismatches were more meaningful than the CD16 polymorphism in this study. Due to the limited number of patients and the low frequency of the CD16 158-V/V variant, no significant association between this genotype and response was determined.

In this study, we focused our investigations on KIR-HLA interactions; however, CD94/NKG2A-HLA-E interaction contributes to inhibiting NK cell function and educating NK cells. It has been shown that NKG2A<sup>+</sup> NK cell frequency is inversely correlated with KIR<sup>+</sup> NK cell frequency and KIR number.<sup>36</sup> Our results suggest that rituximab-dependent NK ADCC is improved when KIR<sup>+</sup> NK cell frequency is high and indirect when CD94/NKG2A<sup>+</sup> NK cell frequency is low. Deep investigations into the effect of CD94/NKG2A on rituximab-dependent NK ADCC should be conducted in order to evaluate the potential interest in monalizumab to improve lymphoma treatment.<sup>37</sup> Indeed, additive approaches may improve the poor clinical prognosis of NHL patients on rituximab treatment.<sup>38</sup> For instance, it has been demonstrated that the combination of rituximab and inhibitory KIR blocking mAbs yields improved NK cell-mediated lysis over rituximab alone.<sup>39,40,41</sup>

KIR and HLA gene families constitute the most polymorphic and polygenic receptor/ligand pair in humans, and



**Figure 5. Lower KIR ligand numbers and peripheral blood KIR<sup>-</sup> NK cell frequency are good prognostic markers of rituximab responses in low-grade lymphoma patients.** Pie charts representing the distribution of (a) low-grade and (b) high-grade lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR, and SD/PD) and the number of KIR ligands (2, 3, 4 or ≥5). The green line determines the significant difference between 2 groups for CR outcome. \*p < .05. Pie charts representing the distribution of (c) low-grade and (d) high-grade lymphoma patients following clinical outcome (CR, PR, and SD/PD) and the KIR<sup>-</sup> NK cell frequency (≤ 44.5, 44.5–56.80, 56.80–71.80 and ≥ 71.80). The green and blue lines determine the significant difference between 2 groups for CR and SD/PD outcomes. \*p < .05.



**Figure 6. Graphic overview of the functional articulation between the number of KIR ligands and main NK cell subsets in modulating rituximab-dependent NK ADCC responses.** A sizable KIR ligand environment favors a higher frequency of inefficient KIR<sup>-</sup> NK cells and numerous functional KIR/HLA inhibitions of educated KIR<sup>+</sup> NK cells. By contrast, a low number of KIR ligands favor higher frequency of uneducated and educated NK cells that harbor a better rituximab-dependent ADCC than KIR<sup>-</sup> NK cells.

their functional interactions drive a large diversity of NK cells with a limited number of germline-encoded genes.<sup>41</sup>

Our results illustrate in part the major impact of KIR and HLA polymorphism on the structural and functional



formation of the NK cell repertoire, as was recently shown (Makanga et al. on Cancer). Numerous approaches to NK cell immunotherapy are developed using mainly autologous or allogeneic NK cell bulk without taking into account all genetic and allelic KIR and HLA polymorphisms. More investigations are required to better define the most efficient NK cell subsets and the NK cell donors from genetic markers to improve promising NK cell immunotherapies.

Taken together, our results permit an overview on the influence of KIR, KIR ligands and CD16 polymorphisms on rituximab-dependent NK cell cytotoxicity, integrating genetic rules of the structural and functional formation of the NK cell repertoire. These results pave the way for strengthening the prediction of rituximab responses in NHL patients. Indeed, two digit HLA class I types (HLA-A, -B, and -C) determined by molecular biology and/or KIR<sup>+</sup> NK cell frequency determined by flow cytometry could be simple and useful markers for predicting rituximab responses.

### Author's contributions

Study design: BC and CR; Acquisition and analysis of flow cytometry data: DRM, GD and CW; HLA typing: AW; KIR genotyping: NL, LD and KG; FcyRIIIa (CD16) genotyping: DRM, NL and GD; Patient's sample collection and clinical documentation: MJ, CT, TG, BT, SLG, BM and PC; Data interpretation: DRM, MJ and CR; Figure and table design: DRM, MJ and CR. Manuscript writing: DRM, MJ and CR; All authors read and approved the final manuscript.

### Acknowledgments

We thank all blood donor volunteers and lymphoma patients who accepted to participate in the study. We also thank Dr Catherine Pellat-Deceunynck and Dr Fabienne Haspot for their advice.

### Funding

This work was financially supported by the Etablissement Français du Sang (EFS)/Centre Pays de la Loire and by grants from la Ligue contre le Cancer (comité de Loire-Atlantique et comité de Charente Maritime), Leucémie Espoir Atlantique Famille (LEAF) and l'Agence de Biomédecine (ABM). DRM is a PhD student supported by Industrial Agreement for Training Through Research Grants 2017/0850. LD is a PhD student supported by la Région Pays de la Loire/EFS Centre Pays de la Loire (N°2018-09766);Région Centre Pays de la Loire/EFS [N°2018-09766];ANRT [2017/0850];

### ORCID

Maxime Jullien  <http://orcid.org/0000-0001-6915-6570>  
Christelle Retière  <http://orcid.org/0000-0001-5943-6990>

### Abbreviations

HLA, human leucocyte antigen; KIR, killer cell immunoglobulin-like receptor; NK, natural killer; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity

### Ethics approval and consent to participate

The study complies with the Declaration of Helsinki. In addition, declaration of the preparation and conservation of a bio-collection (DC-2014-2340) was submitted to the French Ministry of Research and had received agreement from the IRB (2015- DC-1) to study NK cell reconstitution after transplant. This study was approved by the Ethics Review Board of the Nantes University Hospital and all included patients and blood donors provided informed consent.

### Consent for publication

Not required

### Availability of data and material

The data that support the findings of this study are included in the article or uploaded as supplementary information. Data are available from the corresponding author on reasonable request.

### Competing interests

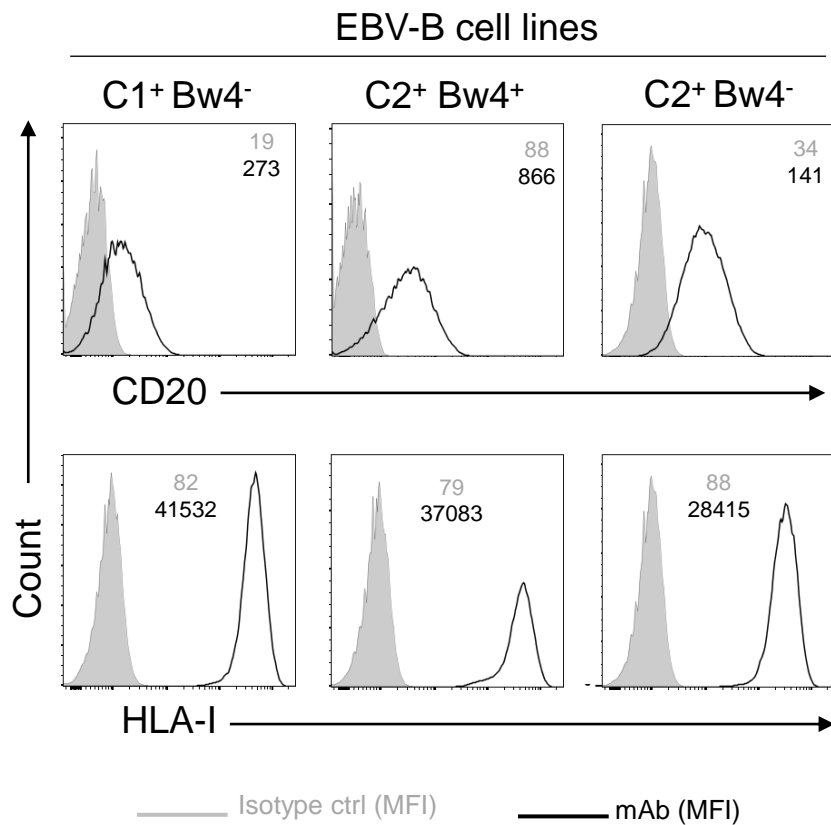
The authors declare that they have no competing interests.

### References

- Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood*. 2004;104(9):2635–2642. doi:10.1182/blood-2004-03-1110.
- Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 2007;44(16):3823–3837. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.151.
- Alderson KL, Sondel PM. Clinical Cancer Therapy by NK Cells via Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:1–7. doi:10.1155/2011/379123.
- Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, Tonn T, Seidl C. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):477–484. doi:10.1007/s00262-016-1792-y.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754–758. doi:10.1182/blood.V99.3.754.
- Veeramani S, Wang S-Y, Dahle C, Blackwell S, Jacobus L, Knutson T, Button A, Link BK, Weiner GJ. Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism. *Blood*. 2011;118(12):3347–3349. doi:10.1182/blood-2011-05-351411.
- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, Cartron G, Colombat P, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res*. 2004;64(13):4664–4669. doi:10.1158/0008-5472.CAN-03-2862.
- Borgerding A, Hasenkamp J, Engelke M, Burkhart N, Trümper L, Wienands J, Glass B. B-lymphoma cells escape rituximab-triggered elimination by NK cells through increased HLA class I expression. *Exp Hematol*. 2010;38(3):213–221. doi:10.1016/j.exphem.2009.12.007.
- Terszowski G, Klein C, Stern M. KIR/HLA interactions negatively affect rituximab- but not GA101 (obinutuzumab)-induced antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Immunol Baltim Md*. 2014;192(12):5618–5624. 1950 doi:10.4049/jimmunol.1400288.
- Anfossi N, André P, Guia S, Falk CS, Roeytncck S, Stewart CA, Bresio V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, et al. Human NK cell

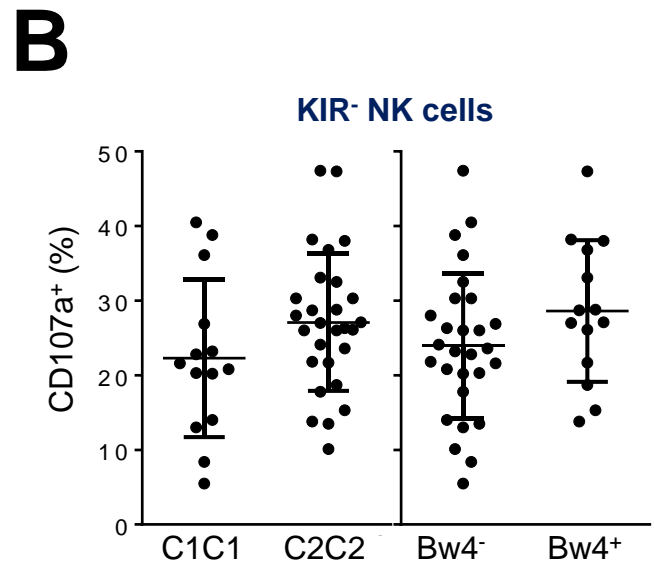
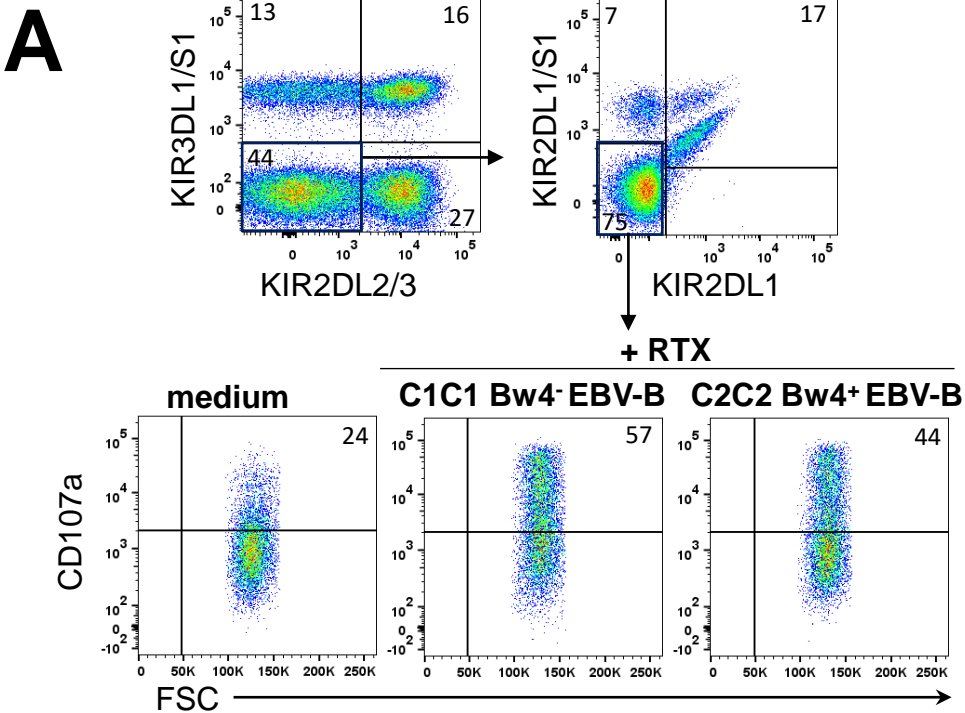
- education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331–342. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.013.
11. Morvan M, David G, Sébille V, Perrin A, Gagne K, Willem C, Kerudou N, Denis L, Clémenceau B, Folléa G, et al. Autologous and allogeneic HLA KIR ligand environments and activating KIR control KIR NK-cell functions. *Eur J Immunol*. 2008;38(12):3474–3486. doi:10.1002/eji.200838407.
  12. Chewning JH, Gudme CN, Hsu KC, Selvakumar A, Dupont B. KIR2DS1-positive NK cells mediate alloresponse against the C2 HLA-KIR ligand group in vitro. *J Immunol Baltim Md*. 2007;179(2):854–868. 1950
  13. Pittari G, Liu X-R, Selvakumar A, Zhao Z, Merino E, Huse M, Chewning JH, Hsu KC, Dupont B. NK cell tolerance of self-specific activating receptor KIR2DS1 in individuals with cognate HLA-C2 ligand. *J Immunol Baltim Md*. 2013;190(9):4650–4660. 1950 doi:10.4049/jimmunol.1202120.
  14. Uhrberg M, Valiante NM, Shum BP, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Corliss B, Tyman D, Lanier LL, Parham P. Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity*. 1997;7(6):753–763. doi:10.1016/S1074-7613(00)80394-5.
  15. Tarek N, Le Luëc J-B, Gallagher MM, Zheng J, Venstrom JM, Chamberlain E, Modak S, Heller G, Dupont B, Cheung N-KV, et al. Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *J Clin Invest*. 2012;122(9):3260–3270. doi:10.1172/JCI62749.
  16. Du J, Lopez-Verges S, Pitcher BN, Johnson J, Jung S-H, Zhou L, Hsu K, Czuczman MS, Cheson B, Kaplan L, et al. CALGB 150905 (Alliance): rituximab broadens the antilymphoma response by activating unlicensed NK cells. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(9):878–889. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0158.
  17. Lisovsky I, Kant S, Tremblay-mclean A, Isitman G, Kiani Z, Dupuy FP, Gilbert L, Bruneau J, Shoukry NH, Lebouché B, et al. Differential contribution of education through KIR2DL1, KIR2DL3, and KIR3DL1 to antibody-dependent (AD) NK cell activation and ADCC. *J Leukoc Biol*. 2019;105(3):551–563. doi:10.1002/JLB.4A0617-242RRR.
  18. Kristensen AB, Kent SJ, Parsons MS, Silvestri G. Contribution of NK Cell Education to both Direct and Anti-HIV-1 Antibody-Dependent NK Cell Functions. *J Virol*. 2018;92(11):11. doi:10.1128/JVI.02146-17.
  19. Forlenza CJ, Boudreau JE, Zheng J, Le Luëc J-B, Chamberlain E, Heller G, Cheung N-KV, Hsu KC. KIR3DL1 Allelic Polymorphism and HLA-B Epitopes Modulate Response to Anti-GD2 Monoclonal Antibody in Patients With Neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2016;34(21):2443–2451. doi:10.1200/JCO.2015.64.9558.
  20. Erbe AK, Wang W, Carmichael L, Hoefges A, Grzywacz B, Reville PK, Ranheim EA, Hank JA, Kim K, Seo S, et al. Follicular lymphoma patients with KIR2DL2 and KIR3DL1 and their ligands (HLA-C1 and HLA-Bw4) show improved outcome when receiving rituximab. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):70. doi:10.1186/s40425-019-0538-8.
  21. Cheson BD, Pfistner B, Juweid ME, Gascoyne RD, Specht L, Horning SJ, Coiffier B, Fisher RI, Hagenbeek A, Zucca E, et al. Revised response criteria for malignant lymphoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25(5):579–586. doi:10.1200/JCO.2006.09.2403.
  22. Owen RG, Kyle RA, Stone MJ, Rawstron AC, Leblond V, Merlini G, Garcia-Sanz R, Ocio EM, Morra E, Morel P, et al. Response assessment in Waldenström macroglobulinemia: update from the VITH International Workshop. *Br J Haematol*. 2013;160(2):171–176. doi:10.1111/bjh.12102.
  23. Willem C, Makanga DR, Guillaume T, Maniangou B, Legrand N, Gagne K, Peterlin P, Garnier A, Béné MC, Cesbron A, et al. Impact of KIR/HLA Incompatibilities on NK Cell Reconstitution and Clinical Outcome after T Cell-Replete Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Posttransplant Cyclophosphamide. *J Immunol*. 2019;202(7):2141–2152. doi:10.4049/jimmunol.1801489.
  24. Sun JY, Gaidulis L, Miller MM, Goto RM, Rodriguez R, Forman SJ, Senitzer D. Development of a multiplex PCR-SSP method for Killer-cell immunoglobulin-like receptor genotyping. *Tissue Antigens*. 2004;64(4):462–468. doi:10.1111/j.1399-0039.2004.00303.x.
  25. Hsu KC, Chida S, Geraghty DE, Dupont B. The killer cell immunoglobulin-like receptor (KIR) genomic region: gene-order, haplotypes and allelic polymorphism. *Immunol Rev*. 2002;190(1):40–52. doi:10.1034/j.1600-065X.2002.19004.x.
  26. Leppers-van de Straat FG, Van Der Pol WL, Jansen MD, Sugita N, Yoshie H, Kobayashi T, van de Winkel JG. A novel PCR-based method for direct Fc gamma receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods*. 2000;242(1–2):127–132. doi:10.1016/S0022-1759(00)00240-4.
  27. Bowles JA, Weiner GJ. CD16 polymorphisms and NK activation induced by monoclonal antibody-coated target cells. *J Immunol Methods*. 2005;304(1–2):88–99. doi:10.1016/j.jim.2005.06.018.
  28. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, Luo X, Cooley S, Verneris M, Walcheck B, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood*. 2013;121(18):3599–3608. doi:10.1182/blood-2012-04-425397.
  29. Fauriat C, Ivarsson MA, Ljunggren H-G, K-j M, Michaëlsson J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood*. 2010;115(6):1166–1174. doi:10.1182/blood-2009-09-245746.
  30. Foley B, De Santis D, Lathbury L, Christiansen F, Witt C. KIR2DS1-mediated activation overrides NKG2A-mediated inhibition in HLA-C C2-negative individuals. *Int Immunol*. 2008;20(4):555–563. doi:10.1093/intimm/dxn013.
  31. MacFarlane AW, Jillab M, Smith MR, Alpaugh RK, Cole ME, Litwin S, Millenson MM, Al-Saleem T, Cohen AD, Campbell KS. NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. *Oncoimmunology*. 2017;6(7):e1330235. doi:10.1080/2162402X.2017.1330235.
  32. Aldeghaither DS, Zahavi DJ, Murray JC, Fertig EJ, Graham GT, Zhang Y-W, O'Connell A, Ma J, Jablonski SA, Weiner LM. A Mechanism of Resistance to Antibody-Targeted Immune Attack. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(2):230–243. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0266.
  33. Kennedy PR, Barthen C, Williamson DJ, Pitkeathly WTE, Hazime KS, Cumming J, Stacey KB, Hilton HG, Carrington M, Parham P, et al. Genetic diversity affects the nanoscale membrane organization and signaling of natural killer cell receptors. *Sci Signal*. 2019;12(612):612. doi:10.1126/scisignal.aaw9252.
  34. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *mAbs*. 2013;5(4):587–594. doi:10.4161/mabs.25077.
  35. Delgado DC, Hank JA, Kolesar J, Lorentzen D, Gan J, Seo S, Kim K, Shusterman S, Gillies SD, Reisfeld RA, et al. Genotypes of NK cell KIR receptors, their ligands, and Fcγ receptors in the response of neuroblastoma patients to Hu14.18-IL2 immunotherapy. *Cancer Res*. 2010;70(23):9554–9561. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2211.
  36. Fauriat C, Andersson S, Björklund AT, Carlsten M, Schaffer M, Björkström NK, Baumann BC, Michaëlsson J, Ljunggren H-G, Malmberg K-J. Estimation of the Size of the Alloreactive NK Cell Repertoire: studies in Individuals Homozygous for the Group A KIR Haplotype. *J Immunol*. 2008;181(9):6010–6019. doi:10.4049/jimmunol.181.9.6010.
  37. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, Bléry M, Bonnafous C, Gauthier L, Morel A, et al. Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731–1743.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.10.014.

38. Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM, Cell-Mediated Antibody-Dependent NK. Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015;6:368. doi:10.3389/fimmu.2015.00368.
39. Binyamin L, Alpaugh RK, Hughes TL, Lutz CT, Campbell KS, Weiner LM. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol Baltim Md.* 2008;180(9):6392–6401. 1950 doi:10.4049/jimmunol.180.9.6392.
40. Kohrt HE, Thielens A, Marabelle A, Sagiv-Barfi I, Sola C, Chanuc F, Fuseri N, Bonnafous C, Czerwinski D, Rajapaksa A, et al. Anti-KIR antibody enhancement of anti-lymphoma activity of natural killer cells as monotherapy and in combination with anti-CD20 antibodies. *Blood.* 2014;123(5):678–686. doi:10.1182/blood-2013-08-519199.
41. Parham P. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. *Immunol Rev.* 2015;267(1):1–5. doi:10.1111/imr.12338.

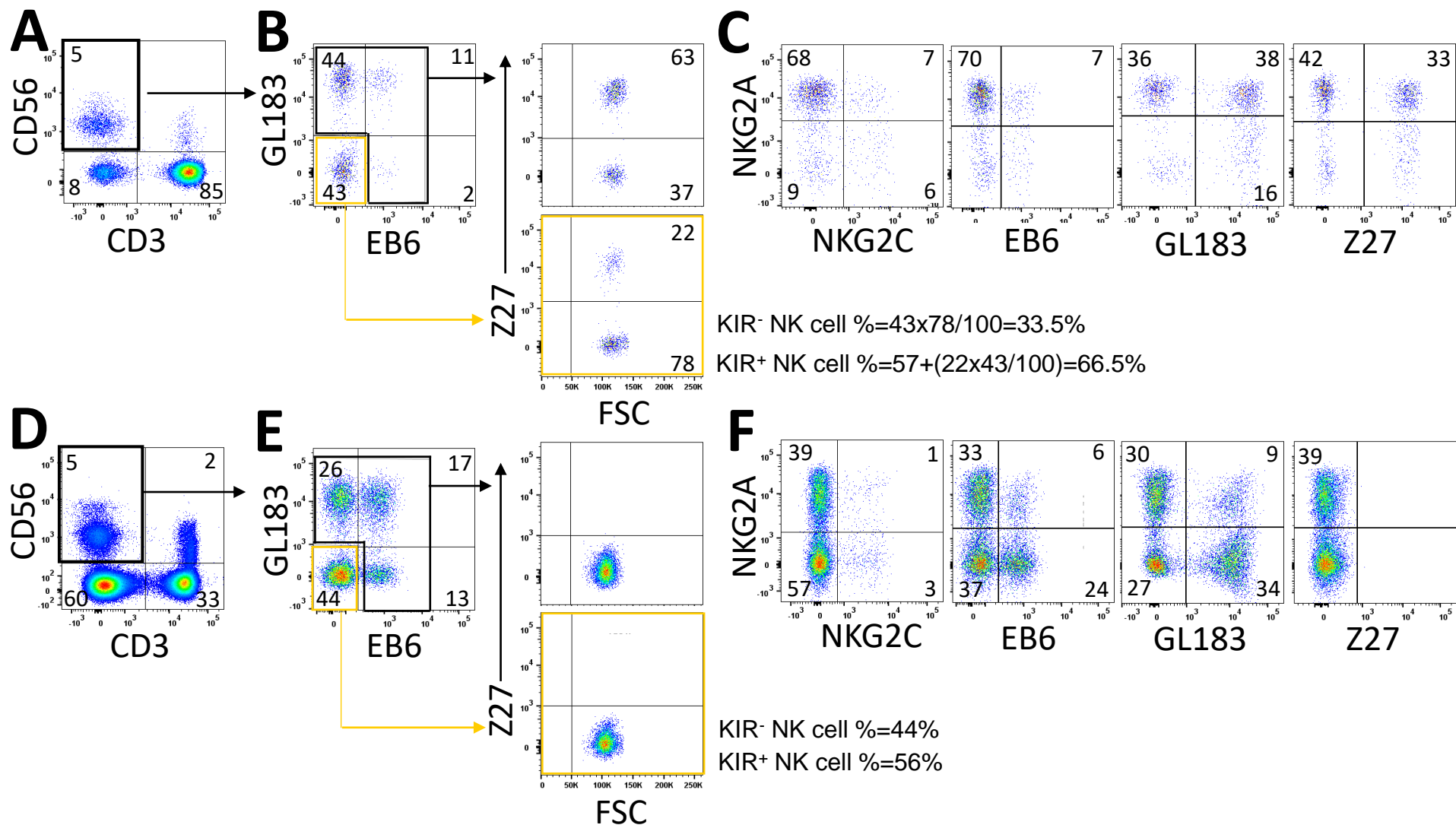


**Figure S1. Profile of CD20 and HLA class I expression of homozygous HLA EBV-B cell lines used in the cellular model to investigate the KIR/HLA modulation on rituximab dependent NK cell degranulation.** Histograms showing CD20 and HLA class I expression on C1+Bw4<sup>-</sup>, C2+Bw4<sup>+</sup> and C2+Bw4<sup>-</sup> EBV-B cell lines determined by flow cytometry using a specific mAb (open histogram) and isotype IgG controls (grey histogram). The Mean Fluorescent Intensity is indicated in each histogram following the color code.





**Figure S2. Targeting strategy of KIR<sup>-</sup> NK cells to assess its rituximab dependent degranulation.** (A) Density plots illustrating the gating strategy of KIR<sup>-</sup> NK cell subset by flow cytometry. (B) Rituximab dependent NK cell degranulation for KIR<sup>-</sup> cells against C1C1 (n=14), C2C2 (n=28), Bw4<sup>-</sup> (n=28) and Bw4<sup>+</sup> (n=14) EBV-B cell lines.



**Figure S3. Targeting strategy of KIR<sup>-</sup> and KIR<sup>+</sup> NK cells in patient PBMC.** Patient PBMC were stained using a mAbs combination including CD3, CD56, KIR2DL2/3/S3 (GL183), KIR2DL1/S1 (EB6), KIR3DL1/S1 (Z27), NKG2A and NKG2C specific mAbs by flow cytometry. **(A)** Density plots illustrates the gating strategy of NK cells (CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>). **(B)** KIR2DL2/3/S2<sup>-</sup> KIR2DL1/S1<sup>-</sup> (yellow gate) and KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell subsets were defined. KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell frequency was determined in the yellow gate. KIR<sup>-</sup> NK cell frequency is the KIR3DL1<sup>-</sup> NK cell frequency in the yellow gate based on its own frequency (43%). KIR<sup>+</sup> NK cell frequency is the sum of KIR2DL2/3/S2<sup>+</sup> KIR2DL1/S1<sup>+</sup> NK cell frequency (57%) and KIR3DL1<sup>+</sup> NK cell frequency in the yellow gate based on its own frequency (43%). **(C)** NKG2A and NKG2C expression was evaluated and NKG2A expression was documented on all KIR<sup>+</sup> NK cell subset. **(D)**, **(E)** and **(F)** correspond to **(A)**, **(B)** and **(C)** for a representative patient with non expressed KIR3DL1 on NK cells. Cell frequency is indicated on density plots.

**Table S1.** KIR and HLA genotypes and CD16 polymorphism of healthy blood donors

Donor	KIR genes <sup>a</sup>															KIR genotype	HLA typing						KIR ligands		FCGR3A V158F	CMV status
	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5	3DL1	3DL2	3DL3	2DS1	2DS2	2DS3	2DS4	1D	2DS5	3DS1		HLA-A*	HLA-B*	HLA-C*	Nature	Nb					
D1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	AB	<b>03:01</b>	68:01	07:02	40:01	<b>03:04</b>	<b>07:02</b>	A3 C1	3	V/F	+
D2	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	01:01	<b>24:02</b>	07:02	39:01	<b>07:02</b>	<b>12:03</b>	Bw4 C1	3	V/F	-
D3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	AB	02:01	<b>24:02</b>	07:02	15:01	<b>03:04</b>	<b>07:02</b>	Bw4 C1	3	V/F	-
D4	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	<b>03</b>	<b>03</b>	07	14	<b>07</b>	<b>08</b>	A3 C1	4	V/V	-
D5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	AB	31:01	68:01	18:01	39:01	<b>07:01</b>	<b>12:03</b>	C1	2	V/V	-
D6	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	<b>03:01</b>	<b>24:02</b>	<b>38:01</b>	<b>51:01</b>	<b>12:03</b>	<b>14:02</b>	A3 Bw4 C1	6	V/V	-
D7	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	AB	01:01	29:02	<b>44:03</b>	55:01	<b>01:02</b>	<b>16:01</b>	Bw4 C1	3	V/F	+
D8	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	AA	<b>24:02</b>	29:01	07:02	35:02	<b>04:01</b>	<b>14:02</b>	Bw4 C1C2	3	V/V	-
D9	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	02:01	26:01	<b>38:01</b>	<b>44:02</b>	<b>05:01</b>	<b>12:03</b>	Bw4 C1C2	4	V/V	-
D10	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	AA	02:01	02:01	<b>51:01</b>	<b>57:01</b>	<b>06:02</b>	<b>07:02</b>	Bw4 C1C2	4	V/V	+
D11	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	AB	<b>24:03</b>	31:01	<b>44:02</b>	<b>51:01</b>	<b>05:01</b>	<b>15:02</b>	Bw4 C2	5	V/F	nd
D12	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	AB	02:01	66:01	41:02	<b>51:01</b>	<b>02:02</b>	<b>17:01</b>	Bw4 C2	3	V/F	-
D13	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	AB	26:01	68:01	40:02	<b>47:01</b>	<b>02:02</b>	<b>06:02</b>	Bw4 C2	3	V/F	-
D14	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	AB	02:01	02:01	40:02	<b>51:01</b>	<b>02:02</b>	<b>04:01</b>	Bw4 C2	3	V/F	-

<sup>a</sup>0= KIR gene absence and 1= KIR gene presence. KIR ligands are indicated in bold. nd= not determined.

**Table S2. Pathologies and treatments of NHL patients (n=74)**

<b>Patient number</b>	<b>Neoplasia</b>	<b>Treatment : R+</b>	<b>Best response</b>
1	DLBCL	CHOP	PD
2	DLBCL	bendamustine	PD
3	DLBCL	CHOP	PR
4	DLBCL	CEP	CR
5	DLBCL	CHOP	PR
6	DLBCL	DHAC	CR
7	DLBCL	CHOP	CR
8	DLBCL	CHOP MTX	CR
9	DLBCL	CHOP MTX	CR
10	DLBCL	CHOP	CR
11	DLBCL	miniCHOP	PR
12	DLBCL	GEMOX	SD
13	DLBCL	CHOP	CR
14	DLBCL	miniCHOP + MTX	CR
15	DLBCL	miniCHOP	PR
16	DLBCL	CHOP / DHAC	CR
17	PMBL	CHOP	CR
18	Grey Zone	CHOP	CR
19	MCL	bendamustine	CR
20	MCL	CHOP	PR
21	MCL	miniCHOP	CR
22	MCL	CHOP	CR
23	MCL	CHOP	CR
24	MCL	DHAOX	CR
25	MCL	BVD	PR
26	MCL	CHOP	CR
27	MCL	BVD	PD
28	MCL	CHOP	CR
29	MCL	DHAOX BEAM	CR
30	MCL	CHOP/HAD	CR
31	FL	miniCHOP	CR
32	FL	CHOP	CR
33	FL	CHOP	CR
34	FL	miniCHOP	PR
35	FL	lenalidomide	PR
36	FL	R single agent	SD
37	FL	R single agent	PR
38	FL	miniCHOP	CR
39	FL	CHOP	PR
40	FL	miniCHOP	PR
41	FL	bendamustine	PR
42	FL	bendamustine	CR
43	FL	miniCHOP	PR

44	FL	bendamustine	CR
45	FL	miniCHOP	PR
46	FL	CHOP	CR
47	FL	DHAOX + Ibrutinib	CR
48	FL	miniCHOP	CR
49	FL	miniCHOP	PR
50	FL	R single agent	PR
51	FL	miniCHOP	PR
52	FL	miniCHOP	CR
53	FL	bendamustine	PR
54	FL	miniCHOP	CR
55	MZL	Chlo	CR
56	MZL	Chlo	PR
57	MZL	DHAC	PR
58	MZL	chlorambucil	SD
59	MZL	bendamustine	SD
60	WM	bendamustine	PR
61	WM	bendamustine	PR
62	WM	fludarabine	PR
63	WM	R single agent	PD
64	WM	bendamustine	PR
65	WM	bendamustine	CR
66	WM	bendamustine	PR
67	WM	chlorambucil	PR
68	WM	chlorambucil	SD
69	WM	bendamustine	PR
70	WM	chlorambucil	SD
71	WM	bendamustine	PR
72	WM	bendamustine	PR
73	WM	chlorambucil	PD
74	nodular paraganuloma	BV-DHAC	CR

---

DLBCL : diffuse large B cell lymphoma; PMBL : primary mediastinal B cell lymphoma; MCL : mantle cell lymphoma; FL : follicular lymphoma; MZL : marginal zone lymphoma; MALT : mucosa associated lymphoid tissue; WM : Waldenström Macroglobulinemia; R : rituximab ; CHOP : cyclophosphamide doxorubicine vincristine prednisone; CEP : cyclophosphamide vindesine prednisone; MTX : methotrexate; GEMOX : gemcitabine oxaliplatine; DHAC/Ox : dexamethasone cytarabine carboplatine/oxaliplatine; HAD : cytarabine; BVD : bendamustine bortezomib dexamethasone; BV : brentuximab vedotin.

**Titre :** Contribution des marqueurs polymorphes KIR et HLA sur le répertoire des cellules Natural Killer en greffes de cellules souches hématopoïétiques haplo-identiques

**Mots clés :** Cellules Natural Killer (NK), Killer cell Immunoglobulin-like receptor (KIR), HLA de classe I, Polymorphisme, Répertoire NK, Greffes de cellules souches hématopoïétiques haplo-identiques (GCSH)

**Résumé :** Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle important en greffes de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) par leur rôle anti-leucémique (GvL). Les GCSH haplo-identiques avec des incompatibilités HLA de classe I réalisées pour des patients leucémiques constituent un contexte privilégié pour une action bénéfique des cellules NK alloréactives. Cependant, le polymorphisme des marqueurs KIR et de leurs ligands HLA complexifient fortement les règles de structuration phénotypique et fonctionnelle du répertoire NK. Dans ce travail, nous avons évalué l'impact du polymorphisme allélique KIR2DL1/2/3 et des ligands HLA-C sur le répertoire et l'éducation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>. Sur le plan fondamental, nous montrons que les individus avec un motif KIR centromérique AA présentent les allotypes KIR2DL dont la fréquence des cellules NK, le niveau d'expression, le potentiel de dégranulation des cellules NK et la force d'interactions KIR/HLA

sont plus élevés par rapport aux individus CenAB ou CenBB. Sur le plan clinique, nos données montrent une incidence de rechute post-GSCH diminuée uniquement chez les patients avec des pathologies myéloïdes et greffés avec des donneurs CenAA. Au sein d'une cohorte de donneurs de sang HLA-C homozygotes, nous montrons que l'expression des molécules HLA-C dépend à la fois des populations lymphocytaires et des allotypes HLA-C. De plus, nous montrons que la nomenclature C1/C2 utilisée pour classer les ligands HLA-C des KIR2DL ne remplit pas tous les critères pour prédire l'éducation des cellules NK KIR2DL<sup>+</sup>. En conclusion, la prise en compte du polymorphisme des gènes KIR et HLA peut aider à affiner la sélection des donneurs de GCSH haplo-PTCy afin de favoriser ceux avec le meilleur effet GvL et plus largement améliorer les réponses NK dans le contexte des immunothérapies.

**Title:** Contribution of the polymorphic KIR and HLA markers on the Natural Killer cell repertoire in haplo-identical hematopoietic stem cell transplants

**Keywords:** Natural Killer cells (NK), Killer cell Immunoglobulin-like receptor (KIR), HLA class I molecules, Polymorphism, NK repertoire, Hematopoietic stem cell transplants (HSCT)

**Abstract:** Natural Killer (NK) cells have an important role in haematopoietic stem cell transplantations (HSCT) by their anti-graft-leukemic effect (GvL). Haplo-identical HSCT with HLA class I incompatibilities for leukemic patients is a privileged context for a beneficial role of alloreactive NK cells. However, the polymorphism of KIR markers and their HLA ligands highly complicate the rules of phenotypic and functional structuring of the NK cell repertoire. In this work, we evaluated the impact of KIR2DL1/2/3 and HLA-C allelic polymorphism on the repertoire and the education of KIR2DL<sup>+</sup> NK cells. At the fundamental level, we show that individuals with a centromeric KIR AA motif display KIR2DL allotypes with a higher NK cell frequency, a higher mean expression level, NK cell degranulation potential and strength of KIR/HLA interactions compared to

CenAB or CenBB individuals. Clinically, our data show a decreased incidence of relapse after haplo-identical HSCT only in patients with myeloid diseases and grafted with CenAA donors. In a cohort of HLA-C homozygous blood donors, we show both cell types and HLA-C allotypes impact on the expression of HLA-C molecules. Furthermore, we show that the C1/C2 nomenclature used to classify KIR2DL ligands does not fulfil all the criteria to predict KIR2DL<sup>+</sup> NK cell education. In conclusion, the inclusion of KIR and HLA gene polymorphism can help to refine the selection of haplo-PTCy HSCT donors in order to favour those with the best GvL effect and more broadly to improve NK responses in the context of immunotherapies.